

Aus der  
Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen  
Abteilung Kinderheilkunde IV

**In vitro und in vivo Auswirkungen von Probiotika auf  
neonatale Immunzellen**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von  
Rückle, Xenia  
2024

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. N. Köstlin-Gille

2. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. M. Märklin

Tag der Disputation: 29.09.2023

Meiner Familie und meinen Freunden

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	1
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>3</b>
1.1 Frühgeburtlichkeit und deren Komplikationen.....	3
1.2 Das Mikrobiom des Neugeborenen .....	4
1.3. Das neonatale Immunsystem .....	5
1.4 Probiotika als präventiver Ansatz in der Neonatologie .....	5
1.5. Ziel der Arbeit .....	6
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>7</b>
2.1 Material.....	7
2.1.1 Patientenkollektiv.....	7
2.1.2 Versuchstiere .....	7
2.1.3 Material biologischen Ursprungs .....	7
2.1.4 Material nicht biologischen Ursprungs .....	8
2.1.5 Antikörper für die Durchflusszytometrie .....	9
2.1.6 Puffer und Kulturmedien.....	11
2.1.7 Glas- und Plastikmaterialien .....	12
2.1.8 Geräte und Software.....	12
2.2 Methoden.....	13
2.2.1 <i>in vitro</i> -Versuche.....	13
2.2.1.1 Aufreinigung von CBMC aus Nabelschnurblut.....	13
2.2.1.2 Anzucht der Probiotikastämme und Bestimmung der colony forming units (CFU).....	14
2.2.1.3 Stimulation von CBMC mit Probiotika.....	16
2.2.1.4 Durchflusszytometrie .....	17
2.2.1.5 Fluoreszenzfärbung für die Durchflusszytometrie .....	18
2.2.1.6 Intrazelluläre Färbung von Zytokinen nach Stimulation mit LPS ..	18
2.2.1.7 ROS-Produktion .....	19
2.2.2 <i>in vivo</i> -Analyse der Wirkung von Probiotika auf intestinale Immunzellen bei neugeborenen Mäusen.....	20
2.2.2.1 Tierhaltung und Behandlung mit Probiotika.....	20

2.2.2.2 Tötung der Versuchstiere und Organentnahme.....	21
2.2.2.3 Isolation von Immunzellen aus dem murinen Darm .....	21
2.2.3 Statistische Methodik .....	22
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>22</b>
3.1 <i>in vitro</i> Wirkung von Probiotika auf den Phänotyp neonataler Immunzellen .....	22
3.1.1 Auswirkungen einer Stimulation mit <i>L. rhamnosus</i> auf den Phänotyp neonataler Immunzellen .....	22
3.1.2 <i>L. rhamnosus</i> führt zu einer Induktion von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen in neonatalen Monozyten.....	27
3.1.3 <i>L. rhamnosus</i> erhöht die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) durch neonatale Monozyten.....	32
3.1.4. <i>L. acidophilus</i> und <i>B. bifidum</i> führen zu einer geringeren Induktion pro- und antiinflammatorischer Zytokine in neonatalen Monozyten.....	33
3.1.5. Eine Stimulation mit <i>L. acidophilus</i> und <i>B. bifidum</i> beeinflusst die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) durch neonatale Monozyten nicht.....	39
3.2 Wirkung einer oralen Probiotikatherapie auf die Immunzellkomposition im Darm neugeborener Mäuse.....	40
3.2.1 Wirkung einer oralen Probiotikatherapie auf myeloide Zellpopulationen im Darm neugeborener Mäuse.....	40
3.2.2 Wirkung einer oralen Probiotikatherapie auf Lymphozyten-Subpopulationen im Darm neugeborener Mäuse .....	43
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>45</b>
4.1 <i>In vitro</i> -Versuche .....	45
4.2 <i>In vivo</i> -Versuche.....	50
<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>55</b>
<b>6. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>57</b>
<b>7. Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>62</b>
<b>8. Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>63</b>
<b>9. Erklärung zum Eigenanteil .....</b>	<b>64</b>
<b>10. Veröffentlichungen .....</b>	<b>65</b>
<b>11. Danksagung.....</b>	<b>66</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ACK	Ammoniumchlorid-Kalium
BPD	Bronchopulmonale Dysplasie
BB	<i>Bifidobacterium bifidum</i> ( <i>B. bifidum</i> )
CBMC	Cord blood mononuclear cell (mononukleäre Zellen aus Nabelschnurblut)
CD	Cluster of differentiation
CFU	Colony forming unit
DHR	Dihydrorhodamine
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	Fluorescent activated cell sorting
FBS	Fetal bovine serum (Fetales Rinderserum)
FSC	Forward Scatter (Vorwärtsstreulicht)
IL-1 $\beta$	Interleukin-1 $\beta$
IL-8	Interleukin-8
LA	<i>Lactobacillus acidophilus</i> ( <i>L.</i> <i>acidophilus</i> )
LPS	Lipopolysaccharid
LR	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ( <i>L. rhamnosus</i> )
MFI	Mean fluorescence intensity
MOI	Multiplicity of infection (Multiplizität der Infektion)
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
GR/MO- MDSC	granulocytic/ monocytic myeloid derived suppressor cells (granulozytäre/monozytäre myeloide Suppressorzellen)
OD	Optical density (optische Dichte)
PBS	Phosphate buffered saline

ROS	Reactive oxygen species (reaktive Sauerstoff Spezies)
Rpm	Rounds per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (Zellkulturmedium)
rRNA	Ribosomal ribonucleic acid (ribosomale Ribonukleinsäure)
SSC	Sideward Scatter (Seitwärtsstreulicht)
TNF- $\alpha$	Tumor Necrosis Factor- $\alpha$
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor- $\beta$

# 1. Einleitung

## 1.1 Frühgeburtlichkeit und deren Komplikationen

Frühgeburtlichkeit ist definiert als Geburt eines Säuglings mit einem Gestationsalter von weniger als 37 Wochen. [1] Weltweit liegt die Frühgeborenenrate bei 10,6% [1] während sie in Deutschland seit mehreren Jahren 9% beträgt. Die wichtigsten Ursachen sind Infektionen in der Schwangerschaft [2], Plazentationsstörungen [3], Uteruspathologien [4] und fetale Pathologien. [5] Frühgeburtlichkeit gilt als Hauptursache perinataler Mortalität und Morbidität. [1] Eine der wichtigsten Komplikationen bei der Behandlung von Frühgeborenen ist die neonatale Sepsis.

Die Inzidenz der neonatalen Sepsis beträgt 1-5:1000 und steigt mit abnehmendem Gestationsalter auf bis zu 55% an. [6] Neben einer Mortalitätsrate von 10-20% kommt es häufig zu postinflammatorischen Folgen der Sepsis wie der nekrotisierenden Enterokolitis (NEC) oder der Bronchopulmonalen Dysplasie (BPD), sowie zu einem schlechteren neurologischen Outcome.[7]

Die nekrotisierende Enterokolitis ist eine akute, inflammatorische Darmerkrankung mit einer Inzidenz von 5-10% bei Frühgeborenen mit einem Gestationsgewicht von unter 1,5 kg. Neben einem hohen Mortalitätsrisiko leiden die Neugeborenen infolge einer NEC häufig unter der Entwicklung eines Kurzdarmsyndroms und dem Bedarf an parenteraler Ernährung.[8]

Die Bronchopulmonale Dysplasie, eine chronische Lungenerkrankung von Frühgeborenen, manifestiert sich in 40% der Frühgeborenen mit einem Gestationsalter unter 28 Wochen. Die Erkrankung wird über zusätzlichen Sauerstoff- oder Beatmungsbedarf im korrigierten Alter von 36 Schwangerschaftswochen definiert und äußert sich in einer respiratorischen Insuffizienz aufgrund einer Beeinträchtigung der Alveolisierung und Vaskularisierung der Lunge. [9-11]

Zu den Langzeitfolgen der BPD gehören eine schlechtere Lungenfunktion [12], eine erhöhte Anfälligkeit für pulmonale Infekte, Asthma bronchiale und eine schlechtere neurokognitive Entwicklung der betroffenen Kinder bis ins Erwachsenenalter.[13]

## 1.2 Das Mikrobiom des Neugeborenen

Das Mikrobiom wird definiert als die Gesamtheit aller Bakterien, die die Körperoberflächen besiedeln.[14] Mit ungefähr 100 Trillionen Bakterien macht das menschliche Mikrobiom etwa die zehnfache Anzahl der körperlichen Zellen aus.[15]

Die meisten der den Menschen besiedelnden Bakterien befinden sich im Darmtrakt und bilden dort die Darmflora. Daneben gibt es jedoch diverse Mikrobiota, die auf der Haut und den Schleimhäuten verschiedener menschlicher Organe lokalisiert sind. Somit beherbergen neben dem Gastrointestinaltrakt auch die Nasen- und Mundhöhle, der Respirationstrakt, die Speiseröhre, der Magen, der Urogenitaltrakt, die Vagina und die äußeren Geschlechtsorgane spezifisch zusammengesetzte Mikrobiota.[16]

Das menschliche Mikrobiom beginnt sich unmittelbar nach der Geburt zu etablieren. [17] Faktoren wie das Gestationsalter, der Geburtsmodus und die kindliche Ernährung spielen eine wichtige Rolle für die Entwicklung eines gesunden Mikrobioms.[17]

Prä- und perinatale Antibiotikagabe, Infektionen in Schwangerschaft und Stillzeit und Frühgeburtlichkeit stellen in dieser Zeit Störfaktoren für die mikrobielle Besiedelung dar.[18]

Das Mikrobiom des Neugeborenen scheint einen Einfluss sowohl auf die Entwicklung des Immunsystems als auch auf die Entwicklung des zentralen Nervensystems zu haben.[19, 20] Somit spielt es eine wichtige Rolle für den Gesundheitszustand des Neugeborenen und dessen Suszeptibilität für Infektionen.[19]

Eine fehlerhafte Zusammensetzung des intestinalen Mikrobioms (sog. Dysbiose) ist mit einer Vielzahl von Erkrankungen im Erwachsenenalter wie chronisch entzündliche Darmerkrankungen [21], allergische Erkrankungen, kardiovaskuläre Erkrankungen, Diabetes, Übergewicht, neurodegenerative Erkrankungen sowie Tumorerkrankungen [22, 23] assoziiert.

### **1.3. Das neonatale Immunsystem**

Die Anforderungen an das Immunsystem eines Neu- und Frühgeborenen sind sehr komplex. Während der Zeit im Mutterleib ist die „Hauptaufgabe“, die sogenannte feto-maternale Immuntoleranz aufrechtzuerhalten, damit es zu keiner gegenseitigen Abstoßungsreaktion zwischen Mutter und Fetus kommt. Nach der Geburt muss sich das Immunsystem des Neugeborenen an die mikrobielle Umgebung außerhalb des Mutterleibs anpassen und eine effektive Immunabwehr gegen Pathogene entwickeln, gleichzeitig aber die Besiedlung von Haut und Schleimhäuten mit Kommensalen „tolerieren“. [24, 25]

Die regelrechte Entwicklung des neonatalen Immunsystems wird neben epigenetischen und metabolischen Einflüssen entscheidend durch das Mikrobiom beeinflusst. [26] Beispielsweise zeigten tierexperimentelle Studien an Labormäusen eine Vermehrung CD8-positiver Gedächtniszellen nach Exposition mit kommensalen Keimen von Mäusen aus natürlicher Umgebung. [27] Auch der Anteil regulatorischer T-Zell-Populationen im Darm war bei konventionell gehaltenen Mäusen gegenüber keimfrei gehaltenen Mäusen erhöht. Bakterielle Metabolite, die von Mikroorganismen produziert werden, scheinen eine Rolle in dieser Mikrobiom-Immunsystem-Interaktion zu spielen. [28]

### **1.4 Probiotika als präventiver Ansatz in der Neonatologie**

Probiotika sind definiert als lebendige Mikroorganismen, die bei Verabreichung in adäquaten Mengen einen gesundheitlichen Nutzen für den Wirt haben können. [29] Wichtige Vertreter von Probiotika sind die Spezies *Lactobacilli* und *Bifidobacteraceae*. [29] Die günstige Wirkung von Probiotika wird auf verschiedene Mechanismen zurückgeführt. [30, 31] Als wichtigster Mechanismus modulieren Probiotika das Mikrobiom, indem sie die Eliminierung pathogener Spezies unterstützen. Dies geschieht beispielsweise durch kompetitive Exklusion, Verhinderung der Adhäsion am Epithel, Verbesserung der epithelialen Barrierefunktion und Produktion antimikrobieller Metabolite.[31] Daneben beeinflussen Probiotika speziesabhängig aber auch

immunologische Prozesse sowohl auf zellulärer als auch auf genetischer Ebene [32, 33]. Hierzu zählen eine Aktivierung von regulatorischen dendritischen Zellen und regulatorischen T-Zellen, eine Verminderung proinflammatorischer Zytokine und eine Induktion antiinflammatorischer Zytokine, wie IL-10 und TGF- $\beta$ . [33]

Eine im Jahr 2018 veröffentlichte Metaanalyse von 51 randomisiert-kontrollierten Studien an über 10 000 Frühgeborenen zeigte eine Wirksamkeit von nur wenigen Einzel- bzw. Kombinationspräparaten zur Prävention der NEC und der LOS. [34]

Die Europäische Gesellschaft für Pädiatrische Gastroenterologie, Hepatologie und Ernährung (European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition, ESPHGAN) befürwortet aktuell den Einsatz von *L. rhamnosus* allein oder einer Kombination aus *Bifidobacterium infantis* Bb-02, *Bifidobacterium lactis*, und *Streptococcus thermophilus* TH-4 zur Prävention der NEC. [35]

## **1.5. Ziel der Arbeit**

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Wirkung von Probiotika auf Immunzellen des Neugeborenen *in vitro* und *in vivo* zu analysieren. Hierzu wurde ein *in vitro*-Kulturmodell mit Nabelschnurblutzellen und verschiedenen Probiotikastämmen etabliert, in dem der Einfluss von Probiotika insbesondere auf den Phänotyp von Monozyten untersucht wurde. Daneben wurde in einem *in vivo*-Modell die Wirkung von oral an das Muttertier verabreichten Probiotika auf die Immunzellpopulationen im Darm neugeborener Mäuse untersucht.

Folgende Hypothesen wurden in der Arbeit überprüft:

- (1) Probiotika modulieren die neonatale Immunantwort *in vitro*
- (2) Eine perinatale Probiotikatherapie verändert die Immunzellkomposition im Darm

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Patientenkollektiv

Für die *in vitro*-Versuche wurden Vollblut- Proben aus der abgetrennten Nabelschnur reifer Neugeborener nach Entbindung mittels Sectio caesarea verwendet. Die Probenentnahme von Nabelschnurblut erfolgte nach vorausgegangener schriftlicher Einwilligung der Eltern. Für die Studie liegt eine Genehmigung durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Eberhard-Karls-Universität Tübingen mit dem Ethikvotum 248/2005A vor.

#### 2.1.2 Versuchstiere

Für die *in vivo*-Versuche wurden weibliche Wildtyp-Mäuse des Stammes C57BL/6J des Charles River Laboratories verwendet, die in einem Alter von 6-8 Wochen geliefert wurden. Die Mäuse wurden in offenen Typ II-Käfigen (530 cm<sup>2</sup>) bei einem Tag-Nacht-Zyklus von 12 h unter S1-Bedingungen in der Tierhaltung der HNO-Klinik Tübingen gehalten. Die Tierversuche wurden vom Regierungspräsidium Tübingen unter der Antragsnummer K10/18G beraten und genehmigt.

#### 2.1.3 Material biologischen Ursprungs

**Tabelle 1: Liste Materialien biologischen Ursprungs**

<i>Bifidobacterium bifidum</i>	Leibniz Insitute DSMZ
<i>Brefeldin A</i>	Sigma, Taufkirchen
<i>CBMC</i>	Cord blood mononuclear cells isoliert aus dem Nabelschnurblut reifer Neugeborener
<i>Fetal calf serum (FCS)</i>	Biochrom, Berlin
Glutamin	Biochrom, Berlin
Infloran®	Laboratorio Farmaceutico, Mede

<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Zur Verfügung gestellt von Prof. Matthias Marschal, Institut für Mikrobiologie und Hygiene des Universitätsklinikums Tübingen
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Zur Verfügung gestellt von Prof. Matthias Marschal, Institut für Mikrobiologie und Hygiene des Universitätsklinikums Tübingen
Liberase TM Research Grade	Roche, Basel
LPS	Sigma, Taufkirchen

#### 2.1.4 *Material nicht biologischen Ursprungs*

**Tabelle 2: Liste Materialien nicht biologischen Ursprungs**

Ammoniumchlorid (NH <sub>4</sub> Cl)	SigmaAldrich, St. Louis
Ampicillin	Ratiopharm, Ulm
Ampuwa	Fresenius, Bad Homburg
AnaeroGen 2,5L	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
BD Cytotfix/Cytoperm	BD Biosciences, Heidelberg
BD Perm/Wash Buffer	BD Biosciences Heidelberg
Bifidobacterium Agar	Aurosan, Essen
Columbia SB-Agarplatten	Mibius, Düsseldorf
Dihydrorhodamine 123	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe
Fluorescence-activated cell sorting FACS Flow	BD Biosciences, Heidelberg
Filter (40 microm, 100 microm)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Gentamicin	Rotexmedica, Trittau
Heparin-Natrium (5000 I.E./ 0,5 ml)	Ratiopharm, Ulm
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES) (0,05 M)	SigmaAldrich, St. Louis

Kaliumhydrogencarbonat ( $\text{KHCO}_3$ )	SigmaAldrich, St. Louis
Lennox-L-Broth-medium	Invitrogen, Karlsruhe
De Man, Rogosa and Sharpe (MRS)- Agarplatten	Mibius, Düsseldorf
Natriumazid ( $\text{NaN}_3$ )	SigmaAldrich, St. Louis
Pancoll	PAN Biotech, Aidenbach
Percoll	GE Healthcare, Uppsala
PBS-Dulbecco	Biochrom, Berlin
Tryptanblau 0,4%	SigmaAldrich, St. Louis
Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium	Biochrom, Berlin

### 2.1.5 Antikörper für die Durchflusszytometrie

**Tabelle 3: Liste der verwendeten Antikörper**

#### *Maus-Antikörper*

<b>Zellpopulation</b>	<b>Antikörper, Fluorochrom</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Firma</b>
<b>Myeloide Zellen (Neutrophile Zellen, Dendritische Zellen)</b>	CD11b, FITC	1:800	BD Biosciences, Heidelberg
	CD11c, BV421	1:600	Biolegend, San Diego
	CD45, PerCP	1:300	BD Biosciences, Heidelberg
	CD103, PE	1:300	Biolegend, San Diego
	F4/80, APC	1:100	Biolegend, San Diego
	Gr-1, Pe-Cy7	1:600	Biolegend, San Diego
	Ly6-C, Pe-Cy7	1:1000	Biolegend, San Diego
	Ly6-G, APC	1:300	Biolegend, San Diego
	MHC II, APC-Cy7	1:600	Biolegend, San Diego
	TLR4, PE	1:200	BD Biosciences, Heidelberg
<b>Lymphoide Zellen (T-Zellen, B-Zellen,</b>	CD3, FITC	1:300	BD Biosciences, Heidelberg
	CD4, APC-Cy7	1:600	Biolegend, San Diego
	CD8a, APC-Cy7	1:100	BD Biosciences, Heidelberg

<b>NK-Zellen)</b>	CD19, PE	1:300	BD Biosciences, Heidelberg
	CD25, APC	1:300	Biologend, San Diego
	CD44, BV421	1:600	Biologend, San Diego
	CD45, PerCP	1:300	BD Biosciences, Heidelberg
	CD62L, BV421	1:5000	BD Biosciences, Heidelberg
	CD69, Pe-Cy7	1:600	Biologend, San Diego
	NKp46, Pe-Cy7	1:100	Biologend, San Diego
<b>Lebend/Tot</b>	Fixable Viability	1:1000	BD Biosciences, Heidelberg
<b>Farbstoff</b>	Stain 510, AmCyan		

### *Humane Antikörper*

<b>Zellpopulation</b>	<b>Antikörper, Fluorochrom</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Firma</b>
<b>Monozyten</b>	CD11b, APC	1:200	Milteniy Biotech, Bergisch Gladbach
	CD14, PerCP	1:200	Milteniy Biotech, Bergisch Gladbach
	CD16, PE	1:50	BD Biosciences, Heidelberg
	CD18, FITC	1:33	Milteniy Biotech, Bergisch Gladbach
	CD80, PE	1:100	BD Biosciences, Heidelberg
	CD86, FITC	1:200	BD Biosciences, Heidelberg
	TLR2, APC	1:20	BD Biosciences, Heidelberg
	TLR4, PE	1:33	BD Biosciences, Heidelberg
	PD-L1, APC	1:1000	Biologend, San Diego
	PD-L2, PE	1:100	Biologend, San Diego
<b>Monozyten</b>	IL-1b, PE	1:16,67	BD Biosciences, Heidelberg
<b>Zytokine</b>	IL-8, PE	1:125	BD Biosciences, Heidelberg
	TNF- $\alpha$ , PE	1:16,67	BD Biosciences, Heidelberg
	TGF- $\beta$ , PE	1:100	BD Biosciences, Heidelberg
	ZAP-70, PE	1:100	BD Biosciences, Heidelberg
	<b>T-Zellen</b>	CCR4, FITC	1:100
	CCR6, APC	1:500	Biologend, San Diego

	CD3, Pe-Cy7	1:500	Biolegend, San Diego
	CD4, PerCP	1:200	BD Biosciences, Heidelberg
	CD25, BV421	1:100	Biolegend, San Diego
	CD44, FITC	1:500	Biolegend, San Diego
	CD45, APC-Cy7	1:500	Biolegend, San Diego
	CD62L, BV421	1:1000	Biolegend, San Diego
	CD69, PE	1:50	BD Biosciences, Heidelberg
	CXCR3, PE	1:50	BD Biosciences, Heidelberg
	PD-1, APC	1:500	BD Biosciences, Heidelberg
<b>Lebend/Tot</b>	Fixable Viability	1:1000	BD Biosciences, Heidelberg
<b>Farbstoff</b>	Stain 510, AmCyan		

### 2.1.6 Puffer und Kulturmedien

**Tabelle 4: Liste der Puffer und Kulturmedien**

Ammoniumchlorid Puffer	900-950 ml DI water 83 g NH <sub>4</sub> Cl 10 g KHCO <sub>3</sub> 0.3772 g EDTA
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) Puffer	22,5 ml PBS 2,5 ml FCS 250 µl 0,5M EDTA
Fluorescence-activated cell sorting FACS Puffer	FACS Flow 0.1% NaN <sub>3</sub>
Liberase Puffer	3 ml RPMI 500 µl FCS 500 µl 5mM HEPES 0,5 mg Liberase
Percoll Puffer, 30%	3,35 ml PBS 1,5 ml Percoll 150 µl 10x PBS
Percoll Puffer, 40%	2,3 ml PBS 1,6 ml Percoll 160 µl 10x PBS
Percoll Puffer, 70%	3,5 ml Percoll 1,2 ml RPMI 350 µl 10x PBS
Roswell Park Memorial Institute (RPMI) Zellkulturmedium	RPMI 1640 10% FCS

---

1% L-Glutamin

---

### 2.1.7 Glas- und Plastikmaterialien

**Tabelle 5: Liste der Glas- und Plastikmaterialien**

15 ml und 50 ml Zentrifugenröhrchen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
48 well Cell culture Cluster, f-bottom	Costar, Bodenheim
5 ml Polystyrene Round-Bottom Tubes ("FACS-Röhrchen")	BD Biosciences, Heidelberg
Cover glass	VWR International
Cryo.S Einfrierröhrchen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Eppendorf-Cup Reaction Tubes	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Eppendorf-Cup	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Knopfsonde	B. Braun, Melsungen
Neubauer-Zählkammer	Fa. Karl Hecht GmbH & Co. KG „Assistent“, Sondheim/Rhön
Pasteur Pipette	Wu, Mainz
Pipettenspitzen blau (500-1000 µl) und gelb (20-200 µl)	Fa. Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Pipettenspitzen farblos (10 µl)	Viozym Scientific, Oldendorf
Spritze (1 ml)	B. Braun, Melsungen

### 2.1.8 Geräte und Software

**Tabelle 6: Geräte und Software**

8-Kanal-Transferpipette (20-200 µl)	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Brutschrank (5% CO <sub>2</sub> , 37°C, wasserdampfgesättigt)	Heraeus Instruments, Stuttgart
Diva 10	BD Biosciences, Heidelberg
Durchflusszytometer „FACS Canto 2“	BD Biosciences, Heidelberg
FlowJo 10	BD Biosciences, Heidelberg
Gefrierschrank „Igloo GreenLine 570L“	Telstar, Terassa, Spanien

(-80°C)	
GraphPadPrism 8.1.0	GraphPad Software, San Diego, USA
Kühlschrank „Bosch economic“	Bosch, Stuttgart
Lichtmikroskop	Olympus, Hamburg
Microsoft Excel 2019	Microsoft Corporation, Unterschleißheim
Microsoft Word 2019	Microsoft Corporation, Unterschleißheim
Pipetten (2, 10, 20, 100, 200, 1000 µl)	Abimed, Langenfeld
Photometer	Eppendorf, Hamburg
Schüttelmixer Certomat H	B. Braun Biotech International, Göttingen
Sterilbank	Heraeus Instruments, Stuttgart
Vortexer	Bender & Hobein AG, USA
SYSMEX-XP300	Sysmex GmbH, Norderstedt
Zentrifuge „Rotanta 460 RS“ und „46 RS“	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge „Biofuge fresco“	Heraeus Instruments, Stuttgart
Photometer	Eppendorf AG, Hamburg
Thermomixer „compact“	Eppendorf AG, Hamburg
Wasserbad	Eppendorf AG, Hamburg

## 2.2 Methoden

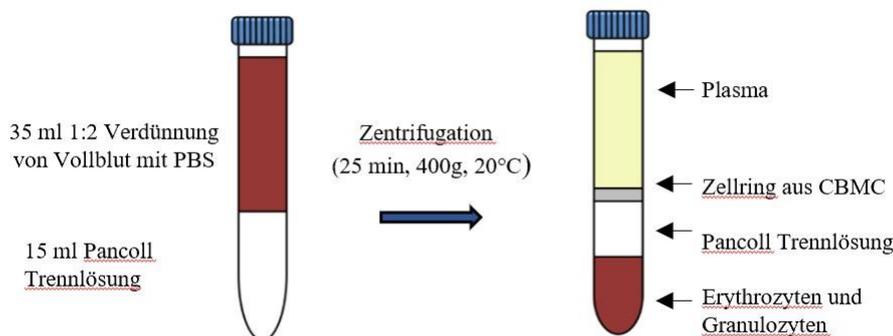
### 2.2.1 *in vitro*-Versuche

#### 2.1.1.1 *Aufreinigung von CBMC aus Nabelschnurblut*

Die Entnahme von Vollblut aus der Nabelschnur erfolgte in 50 ml Falcons unter Antikoagulation durch 2 ml Heparin-Natrium (c=100 IE/ml). Aus dem Vollblut wurden dann mithilfe der Dichtegradientenzentrifugation nach Boyum mononukleäre Zellen (CBMC, *cord blood mononuclear cells*) isoliert.

Hierfür wurden 15 ml Vollblut mit 20 ml PBS verdünnt und auf 15 ml Pancoll-Trennlösung in einem 50 ml Falcon aufgeschichtet und anschließend mit 400g bei 20°C für 25 Minuten ohne Bremse zentrifugiert.

Die Separation der Zellpopulationen wurde erreicht, indem sich durch die Zentrifugation 4 Phasen unterschiedlicher Dichte aus Granulozyten und Erythrozyten am Boden und darüber Pancoll, CBMC und Plasma auftrennten. Der Zellring aus CBMC zwischen Pancoll und Plasma wurde mit der Pipette abgesaugt und erneut bei 500g und 10°C für 10 Minuten zentrifugiert. Nach Abkippen des Überstands wurde das Zellpellet für 10 Minuten in 10 ml ACK-Lösung (1:10-Verdünnung mit Ampuwa Spüllösung) zur Lyse erythroider Zellen gelöst, um eine höhere Reinheit der Zellen zu erhalten. Nach Zugabe von 10 ml PBS und anschließender Zentrifugation bei 400g bei 4°C für 10 Minuten erfolgte die Zellzahlbestimmung aus 100 µl dieser Lösung mittels dem Zellzählgerät Sysmex XP-300. Nach einer weiteren Zentrifugation mit 310g bei 4°C für 5 Minuten wurde das Zellpellet auf die benötigte Konzentration von  $2 \cdot 10^6$  Zellen/ml mit RPMI-Kulturmedium (+10% fetal bovine serum (FBS) und 1% Glutamin) eingestellt und in einer 48-Wellplatte mit je 500 µl Zellen ( $1 \cdot 10^6$  Zellen) pro Well über Nacht kultiviert.



**Abb. 1: Dichtegradientenzentrifugation nach Boyum**

Nach Zentrifugation von auf Pancoll aufgeschichtetem Vollblut erhält man eine Auftrennung der Bestandteile nach ihrer Dichte. Von oben nach unten befinden sich der Dichte aufsteigend Plasma, CBMC, Pancoll und Erythrozyten und Granulozyten.

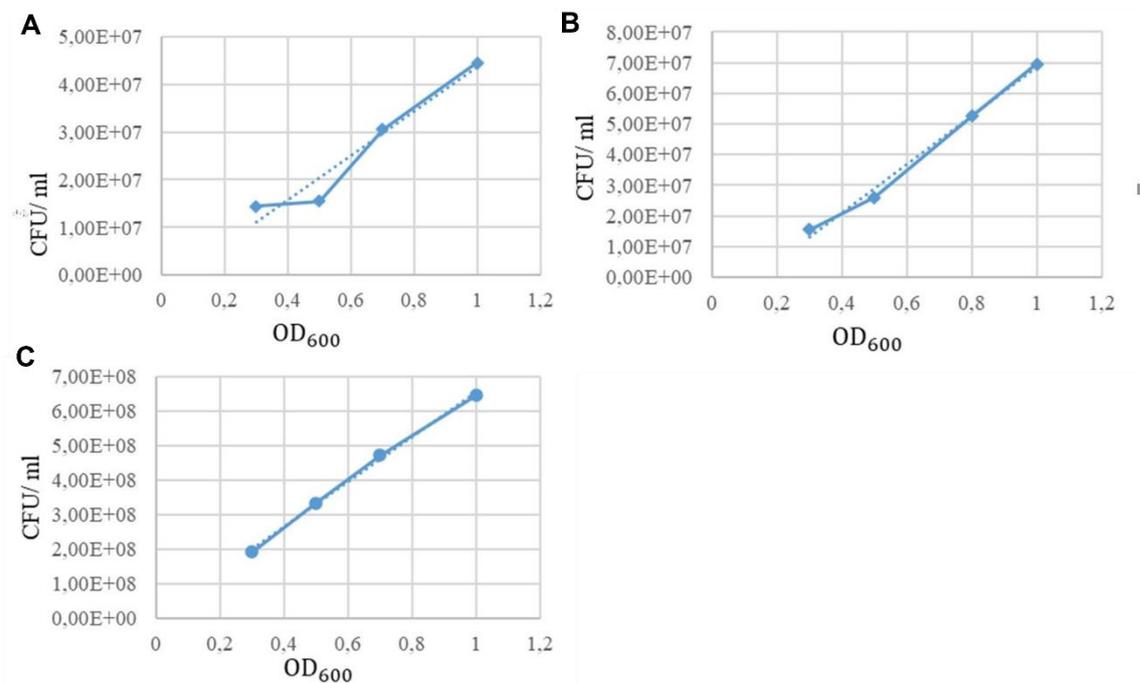
### 2.2.1.2 Anzucht der Probiotikastämme und Bestimmung der colony forming units

(CFU)

Die Probiotikastämme *Lactobacillus rhamnosus* (LR), *Lactobacillus acidophilus* (LA) und *Bifidobacterium bifidum* (BB) wurden bei -80°C als Stock gelagert und nach Ausplattierung auf Agarplatten und anschließender Inkubation bei 37°C für 3 bis 4 Tage

als Bakteriensuspension für *in vitro*-Versuche verwendet. Nach Testung unterschiedlicher Wachstumsbedingungen und Sauerstofftoleranz der ausgewählten Stämme wurde der Stamm LR auf „Columbia Sheep Blood Agar“-Platten unter aeroben Bedingungen, der Stamm LA auf „De Man-, Rogosa- und Sharpe-Agar“ unter anaeroben Bedingungen und der Stamm BB auf „Bifidobacterium-Agar“ unter anaeroben Bedingungen kultiviert. Für die *in vitro*-Versuche wurden Bakterienkolonien von der Platte entnommen, in PBS gelöst und durch Zentrifugation bei 13000g zwei Mal für 3 Minuten bei 23°C gewaschen und zur Inkubation der Zellen verwendet.

Vor Beginn der Versuche wurde eine Verdünnungsreihe erstellt. Hierfür wurden die in PBS gelösten Bakterien so verdünnt, dass definierte Werte für die optische Dichte (OD) (0,3, 0,5, 0,7 und 1) gemessen wurden. Die auf diese Werte verdünnten Bakteriensuspensionen wurden dann nochmals 1:100.000 verdünnt und ausplattiert. Es wurden dann nach 72 Stunden die Kolonien ausgezählt und eine Titrationskurve mitsamt Eichgerade mit zugehöriger Lebendkeimzahl, auch CFU (colony forming units), erstellt. Diese diente im Folgenden der Berechnung des benötigten Volumens an Bakteriensuspension für die Probiotikastimulation der Immunzellen.



**Abb. 2:** Titrationskurven der Verdünnungsreihe von *L. rhamnosus* (A), *L. acidophilus* (B) und *B. bifidum* (C)

Nach Ausplattieren und anschließender Kultivierung der 1:100 000-Verdünnung von LR, LA und BB auf Agarplatten konnten die Kolonien ausgezählt werden und mit der vorher gemessenen optischen Dichte korreliert werden.

**A-C** Es bestehen annähernd lineare Zusammenhänge zwischen der gemessenen optischen Dichte (  $OD_{600}$  ) und den ausgezählten Kolonien von (A) LR (B) LA (C) BB umgerechnet in CFU/ml. Formeln der Trendlinie zur Berechnung der Bakterienkonzentration in CFU/ml anhand der optischen Dichte:  $c = 46074766,3551402x - 2546729,0$  für LR,  $c = 78879310,3448276x - 10396551$  für LA und  $c = 650887850,46729x + 4570093,5$  für BB.

### 2.2.1.3 Stimulation von CBMC mit Probiotika

Die sogenannte MOI (*multiplicity of infection*) beschreibt, in welchem Verhältnis sich Immunzellen und Bakterien in Lösung befinden. Bei einer MOI von 1:10 kommen beispielsweise 10 Bakterien auf 1 Immunzelle. Da in der Literatur sehr unterschiedliche Angaben zu MOI für die Probiotikastimulation *in vitro* zu finden sind, wurde zunächst getestet, wie sich Monozyten unter Probiotikastimulation bei MOIs von 1:0,1, 1:1, 1:10 und 1:100 für 1,2, 4 und 8 Stunden verhalten. Da sich die eindeutigsten Veränderungen der Antigen-Expression bei MOIs von 1:0,1 und 1:1 zeigten und höhere MOIs zu einem vermehrten Absterben der Zellen führten, wurden für alle Versuche diese beiden Zell: Bakterien-Verhältnisse gewählt. Zur Berechnung des benötigten Volumens in Bakteriensuspension für eine MOI von 1:1 wurde die Formel der linearen Funktion der Titrationskurve verwendet. Für eine MOI von 1:0,1 wurde das gleiche Volumen einer 1:10 Verdünnung dieser Suspension auf die Immunzellen gegeben.

Beispielrechnung für das Volumen einer Bakteriensuspension von LA einer OD von 1:

1. Berechnung der Bakterienkonzentration über

$$c = 78879310,3448276 \cdot x - 10396551,7$$

$$c = 78\,879\,310,34 \cdot 1 - 10\,396\,551,7 = 68\,482\,758,6 \text{ CFU/ml} = 68482,8 \text{ CFU/}\mu\text{l}$$

2. Berechnung des Volumens für eine MOI von 1:1 (auf  $1 \cdot 10^6$  CBMC)

$$V = \frac{n}{c}$$

$$V = \frac{1 \cdot 10^6 \text{ CFU}}{68482,8 \text{ CFU/}\mu\text{l}} = 14,6 \mu\text{l}$$

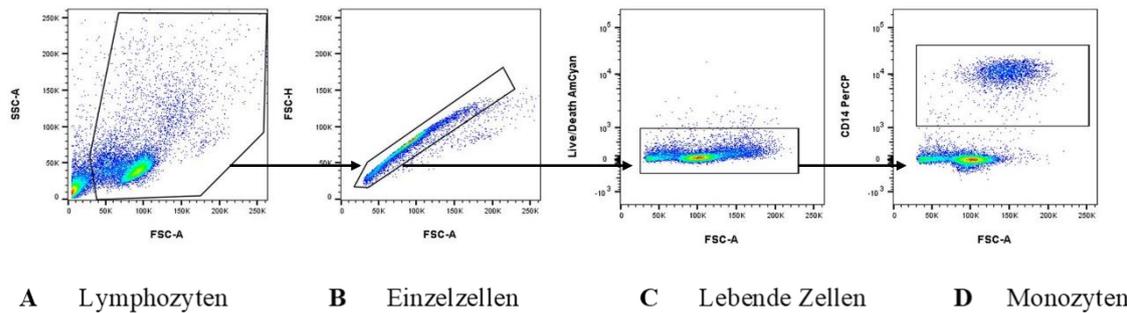
CBMC wurden anschließend bei 37°C mit dem berechneten Volumen in PBS gelöster Probiotika stimuliert. Die Stimulationszeit betrug 1 h für die Phänotypisierung der Monozyten und die ROS-Bestimmung, 5 h für die Bestimmung der monozytären Zytokinexpression und 24 h für die Phänotypisierung der T-Zellen.

#### **2.2.1.4 Durchflusszytometrie**

Die Durchflusszytometrie (auch FACS, *fluorescent-activated cell sorting*) ist ein Verfahren zur Analyse von Zellen anhand ihrer Größe, Granularität und exprimierten Antigenen.

Über ein dünnes Rohr werden Zellen einzeln aufgesogen und von Laserlicht unterschiedlicher Wellenlänge angeregt. Das von den Zellen emittierte Licht wird anschließend über mehrere Detektoren quantifiziert und über eine Software visualisiert. Die relative Größe der Zellen lässt sich durch die Messung des Vorwärtsstreulichts (FSC) erfassen. Das Seitwärtsstreulicht (SSC) liefert Aussagen über die Granularität der Zellen. Die Expression von Antigenen wird durch Färbung der Zellen mit Fluoreszenzfarbstoffmarkierten Antikörpern gemessen. Sobald die an die Zellen gebundenen Fluoreszenzfarbstoffe von Laserlicht angeregt sind, emittieren sie Licht einer spezifischen Wellenlänge, das von den Detektoren registriert und quantifiziert wird. Mithilfe einer Software kann dann der Anteil positiv gefärbter Zellen und die Menge an gebundenem Antikörper pro Zelle ausgedrückt als MFI (*mean fluorescence intensity*) ermittelt werden.

Die durchflusszytometrischen Messungen in dieser Arbeit wurden mit dem Gerät FACS Canto 2 der Firma Becton Dickinson (BD) durchgeführt. Die Auswertung und Visualisierung erfolgte mithilfe der Softwareprogramme DIVA™ (BD Bioscience Version 9.0) und FlowJo™ (BD Bioscience Version 10.7.1).



**Abb. 3: Darstellung der Gatingstrategie von Monozyten aus CBMC im FACS**

Die Gates repräsentieren: **A** die Lymphozyten ausgewählt aus allen Zellen (FSC-A vs SSC-A), **B** Alle einzelnen Zellen aus den Lymphozyten (FSC-A vs FSC-H), vorgegated wie in A dargestellt, **C** alle lebenden Zellen aus den einzelnen Zellen (FSC-A vs Live/Death in AmCyan), vorgegated wie in A und B dargestellt, **D** alle Monozyten von allen lebenden Zellen (FSC-A vs CD14 in PerCP) vorgegated wie in A, B und C dargestellt.

### ***2.2.1.5 Fluoreszenzfärbung von Oberflächenantigenen für die Durchflusszytometrie***

Zur Messung der Oberflächenantigene von Monozyten aus dem Nabelschnurblut nach Stimulation mit Probiotika (LR, LA, BB und Kombination von LA und BB) wurden CBMC wie unter 2.2.1.3 beschrieben mit den Bakterien kultiviert. Für die Phänotypisierungen von Monozyten und T-Zellen nach Stimulation mit LR wurden  $1 \cdot 10^5$  Zellen in 50  $\mu$ l PBS gelöst mit den unter 2.1.5 genannten Antikörpern für 10 Minuten bei 4°C im Dunkeln in FACS-Röhrchen inkubiert. In Vorversuchen wurde die benötigte Verdünnung der Antikörper durch Titrationen bestimmt. Auf Hinzufügen von FACS-Flow-Waschlösung folgte ein Zentrifugationsschritt mit 330g bei 4°C für 5 Minuten. Nach Abkippen des Überstands fand die durchflusszytometrische Messung im FACS statt.

### ***2.2.1.6 Intrazelluläre Färbung von Zytokinen nach Stimulation mit LPS***

Zur Messung der Zytokinproduktion von Monozyten aus dem Nabelschnurblut nach Stimulation mit Probiotika (LR, LA, BB und Kombination von LA und BB) wurden CBMC wie unter 2.2.1.3 beschrieben mit den Bakterien kultiviert. Es erfolgte dann die Zugabe von LPS (Endkonzentration= 1  $\mu$ g/ml) und Brefeldin A (Endkonzentration= 1  $\mu$ g/ml) oder von Brefeldin A allein und die erneute Inkubation für 4 Stunden bei 37°C. Brefeldin A induziert einen retrograden Transport sekretorischer Proteine vom Golgi-Apparat zum Endoplasmatischen Retikulum und stoppt damit die Ausschüttung

intrazellulärer Substanzen. Im Anschluss wurden die Zellen aus der 48well-Platte entnommen und in einem 15 ml Falconröhrchen bei 310g bei 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde resuspendiert und extrazellulär wie unter 2.2.1.5 beschrieben mit CD14 gefärbt.

Für die Intrazellulärfärbung von Zytokinen erfolgte zunächst eine Permeabilisierung der Zellen durch Zufügen von 200 µl BD Fix/Perm und Inkubation für 20 Minuten bei 4°C. Anschließend wurden 4 ml BD Perm/Wash hinzugegeben und erneut zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in 300 µl Perm/Wash in FACS-Röhrchen überführt. Es folgte die Intrazellulärfärbung der Zytokine TNF $\alpha$ , TGF $\beta$ , IL-1 $\beta$  und IL-8 durch Zugabe der entsprechenden Antikörper (s. unter 2.1.5) und Inkubation für 30 Minuten bei 4°C. Als Kontrolle für die erfolgreiche Permeabilisierung erfolgte eine Färbung von ZAP70. Dies ist eine in T-Zellen und NK-Zellen exprimierte Tyrosinkinase, die an vielen Signaltransduktionsketten und somit auch an der Zytokinexpression aktivierter Zellen beteiligt ist.

#### **2.2.1.7 ROS-Produktion**

Zur Untersuchung der Produktion von Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS, *reactive oxygen species*) durch CBMC mit oder ohne Probiotika-Stimulation analog zum Zytokinversuch erfolgte eine Färbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Dihydrorhodamine 123 (DHR). Sobald DHR in die Zelle eindringt und an ROS bindet, oxidiert er zu Rhodamin 123 und weist dadurch eine grüne Fluoreszenz auf, die im FACS detektiert werden kann. CBMC wurden zunächst wie unter 2.2.1.3 beschrieben kultiviert und dann auf eine Zellzahl von  $5 \cdot 10^5$  Zellen/ml in RPMI-Kulturmedium ohne Zusätze eingestellt. Pro Ansatz wurden 500 µl Zellsuspension verwendet. Diese wurden in einem FACS-Röhrchen mit 5 µl DHR mit einer Endkonzentration von 100 µM für 15 Minuten im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Die FACS-Röhrchen wurden anschließend auf Eis gestellt und mit 1 ml eisgekühltem PBS aufgefüllt, um die weitere Reaktion zu stoppen. Nach einem Waschschrift erfolgte die Extrazellulärfärbung mit CD14-Antikörper und die Messung im FACS.

## 2.2.2 *in vivo*-Analyse der Wirkung von Probiotika auf intestinale Immunzellen bei neugeborenen Mäusen

### 2.2.2.1 Tierhaltung und Behandlung mit Probiotika

Zur Untersuchung der Auswirkungen einer perinatalen oralen Antibiotika- sowie Probiotikatherapie auf die Immunzellkomposition im Darm neugeborener Mäuse wurden weibliche Wildtyp-Mäuse (C57BL/6J) aus einem Wurf und gemeinsamer Käfighaltung seit der Geburt mit Männchen verpaart, die ebenfalls aus einem Wurf stammen. Damit sollte erreicht werden, dass sich das Mikrobiom der Elterntiere der für die Versuche verwendeten Jungtiere möglichst wenig unterscheidet. Nach Verpaarung der Tiere erfolgte eine zweitägige Gewichtskontrolle der Weibchen. Bei Zunahme von mindestens 2g in zehn Tagen wurden die Tiere als trächtig angesehen. Ab dem Trächtigkeitstag 10 wurden die Muttertiere dann täglich mit Probiotika behandelt. Hierfür wurden  $2 \cdot 10^9$  CFU BB und LA (Infloran®) in 400 µl Wasser gelöst und mit Hilfe einer Knopfsonde an die trächtigen Muttertiere verfüttert. Ab einem Alter von sieben Tagen wurden die Probiotika auch an die Jungtiere verfüttert. Die Probiotikabehandlung wurde bis zum Absetzen bzw. Töten der Jungtiere fortgeführt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Tiere.

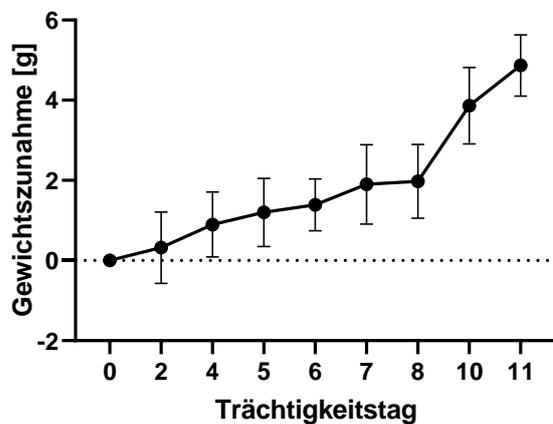


Abb. 4: Gewichtszunahme der Versuchstiere nach Verpaarung

Die Feststellung der Trächtigkeit der weiblichen Versuchstiere erfolgte mittels Gewichtskontrolle nach Verpaarung. Die Grafik zeigt die mittlere Gewichtszunahme der Versuchstiere nach berechnetem Trächtigkeitstag 0 ausgehend von durchschnittlich 2g Gewichtszunahme innerhalb von 10 Tagen.

### ***2.2.2.2 Tötung der Versuchstiere und Organentnahme***

Die Jungtiere der mit Probiotika behandelten Muttertiere, sowie die Kontrolltiere wurden an den Lebenstagen 1 (P1), 3 (P3), 7 (P7), 14(P14) oder 21 (P21) getötet. Die Tötung an P1, P3 und P7 erfolgte durch Dekapitation, die Tötung an P14 und P21 durch CO<sub>2</sub>-Einleitung in den Käfig und anschließende zervikale Dislokation. Unmittelbar nach Tötung der Tiere wurde das Abdomen mittels einer Schere eröffnet und der Darm wurde entnommen und bis zur weiteren Verarbeitung in kaltem PBS gelagert.

### ***2.2.2.3 Isolation von Immunzellen aus dem murinen Darm***

Die entnommenen Därme der Jungtiere wurden unter Befeuchtung mit PBS vorsichtig geöffnet und der Stuhl entfernt. Anschließend wurde der leere Darm in einen Falcon mit PBS gegeben und geschüttelt. Mithilfe eines 100 µm- Filters wurden die Därme so vier Mal mit PBS gewaschen und dann in EDTA- Puffer für 30 Minuten bei 37°C und 200g unter Schütteln inkubiert, um die intestinalen Epithelzellen abzulösen. Nach erneutem Waschen erfolgte dann die Zerkleinerung des Darms in 1-2 mm große Stücke mithilfe einer Schere. Darauf folgte der Gewebsverdau in 0,5 mg Liberase mit Liberase-Puffer bei Schütteln für 1 h bei 37°C. Hiernach erfolgte eine Zentrifugation mit 310g bei 4°C für 5 Minuten. Das Zellpellet wurde in 4 ml 40%iger Percoll-Lösung aufgenommen und mittels Pasteur-Pipette wurde eine 70% ige Percoll-Lösung dieser Lösung untergeschichtet. Nach Zentrifugation mit 1000g bei 20°C für 20 Minuten entstand zwischen den Schichten ein Zellring bestehend aus mononukleären Zellen, der mit einer Pipette abgesaugt wurde und in ein 15 ml Falcon überführt wurde. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde die Zellzahl mithilfe der Neubauer-Zählkammer mittels folgender Formel bestimmt.

$$\text{Zellzahl pro ml} = \frac{\text{Anzahl der gezählten Zellen}}{\text{Anzahl Quadranten}} * \text{Verdünnungsfaktor} * 10^4 (\text{Zählkammerfaktor})$$

Nach Einstellen der gewünschten Zellzahl von  $6 \cdot 10^5$  Zellen in einem Volumen von 300 µl mit PBS wurden die Zellen für die durchflusszytometrische Untersuchung verwendet.

### ***2.2.3 Statistische Methodik***

Als Statistik-Software diente GraphPad Prism 9.1.2. Die Werte wurden mittels D'Agostino and Pearson omnibus normality test auf das Vorliegen einer Normalverteilung getestet. Bei den *in vitro* Versuchen wurden Unterschiede in den MFIs mittels Gepaartem Student's t-Test und Unterschiede im prozentualen Anteil positiv gefärbter Zellen mittels Wilcoxon-Rangsummen-Test analysiert. Bei der Quantifizierung von Immunzellen im Darm von neugeborenen Mäusen mit und ohne Probiotikabehandlung wurde der Mann-Whitney test angewandt. Bei den statistischen Analysen galt jeweils ein Ergebnis mit einem p-Wert kleiner als 0,05 als signifikant.

## **3. Ergebnisse**

Die Ergebnisse mitsamt der Grafiken dieses Teiles der Dissertationsschrift wurden bereits veröffentlicht.[36]

### **3.1 *in vitro* Wirkung von Probiotika auf den Phänotyp neonataler Immunzellen**

#### ***3.1.1 Auswirkungen einer Stimulation mit *L. rhamnosus* auf den Phänotyp neonataler Immunzellen***

Zunächst wurde die Wirkung einer Stimulation mit LR auf den Phänotyp von neonatalen Monozyten und T-Zellen untersucht. Hierzu wurden CBMC für 1 Stunde (Analyse der Monozyten) oder 24 Stunden (Analyse der T-Zellen) mit LR stimuliert und dann durchflusszytometrisch analysiert.

Nach einer Stunde exprimierten alle Nabelschnurblutmonozyten (CD14+ Zellen) die Integrine CD11b und CD18, das ko-stimulatorische Molekül CD86 und den Toll-like-Rezeptor 2 (TLR2), während nur ein Teil der Nabelschnurblutmonozyten den Fc-Rezeptor CD16, TLR4 und das ko-inhibitorische Molekül Programmed Death Ligand

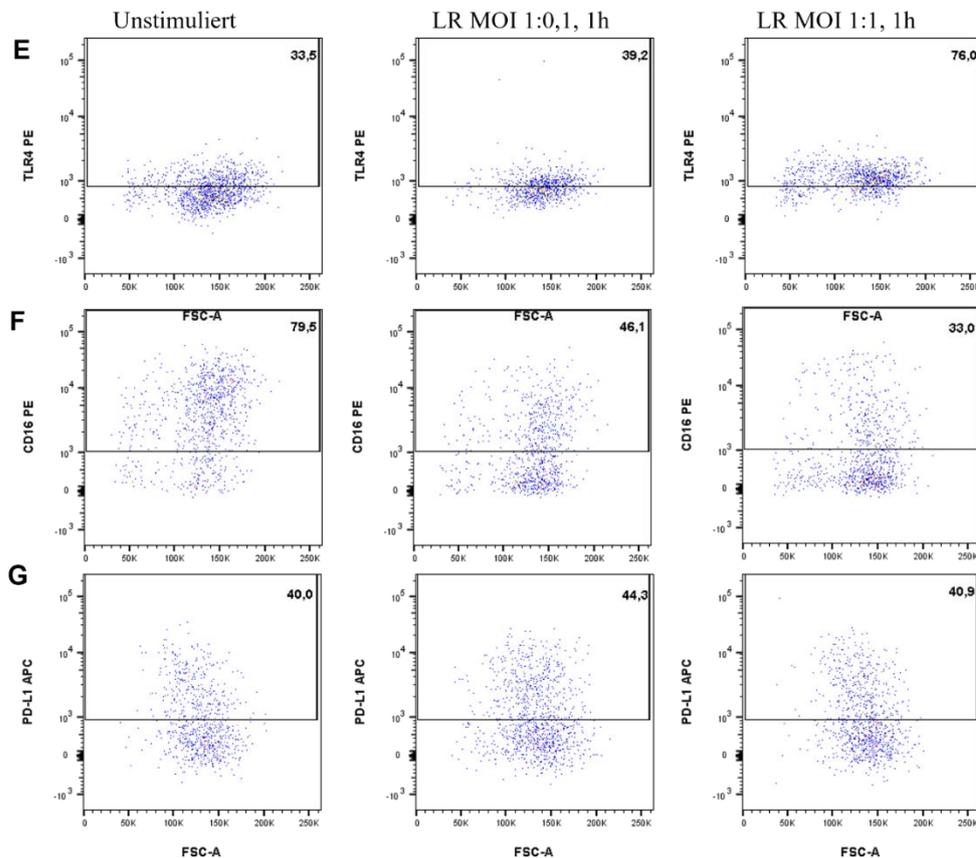
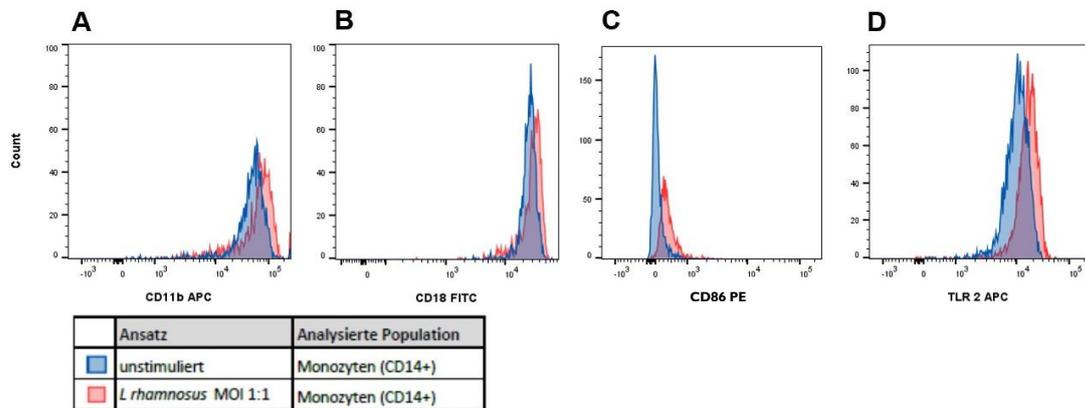
PD-L1 exprimierte. Für die Oberflächenmarker, die von allen Monozyten exprimiert wurden, wurde daher die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) bestimmt, für die anderen Marker der prozentuale Anteil der positiv gefärbten Zellen.

Die Stimulation mit LR induzierte eine konzentrationsabhängige, erhöhte Expression von CD11b, CD18, CD86, TLR2 und TLR4 auf Nabelschnurblutmonozyten. Die Expression von CD16 und PD-L1 blieb hingegen unverändert (Tabelle 7 und Abbildungen 5 und 6).

**Tabelle 7: Antigenexpression von nicht stimulierten und mit *L. rhamnosus* stimulierten Monozyten**

Antigen	Kontrolle	LR MOI 1:0.1	LR MOI 1:1	n	p-Wert*	Abb.
CD11b (MFI)	30583±11312	37418±16963	39801±17421	9	<b>p&lt;0,01</b>	6A
CD18 (MFI)	23754±3845	26005±5046	27709±5030	9	<b>p&lt;0,001</b>	6D
CD86 (MFI)	1598±916	2068±978	2104±976	9	<b>p&lt;0,01</b>	6B
TLR2 (MFI)	7964±2586	10337±3187	10894±2437	9	<b>p&lt;0,01</b>	6C
TLR4 (%)	25,7±18,2	37,2±18,7	46,3±26,7	8	<b>p&lt;0,05</b>	6E
CD16 (%)	77,20±29,20	71,42±28,29	62,77±26,94	9	p>0,05	6F
PD-L1 (%)	20,34±20,22	21,48±18,15	20,19±17,18	9	p>0,05	6G

\*für den Vergleich zwischen Kontrolle und LR MOI 1:1

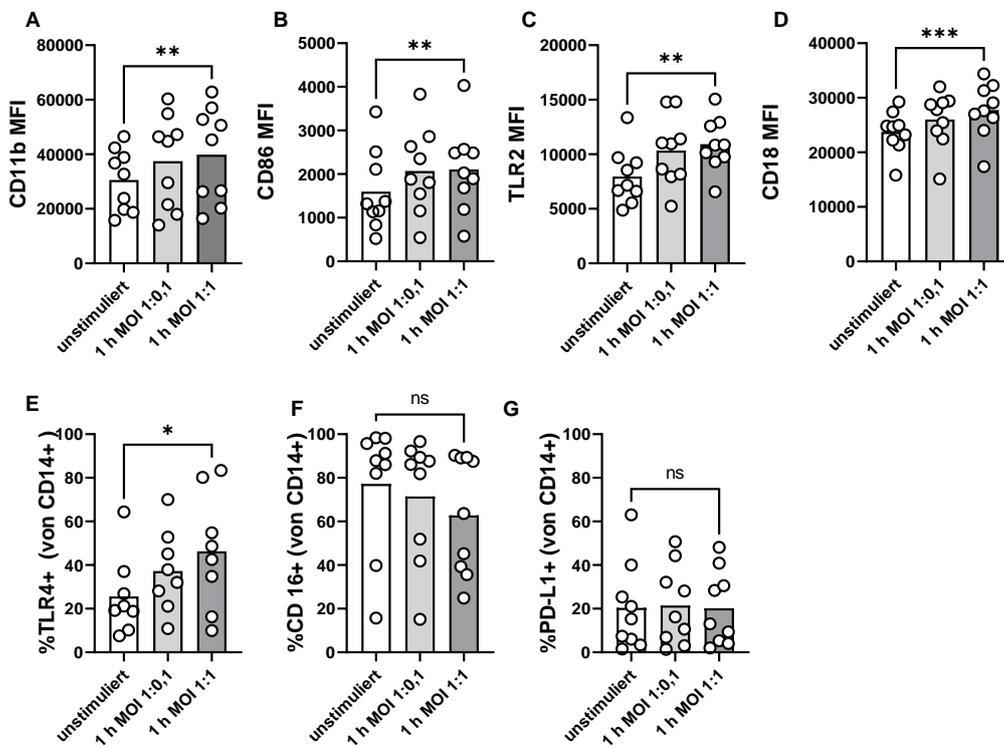


**Abb. 5:** Die Antigenexpression von CD11b, CD18, CD86, TLR2 und TLR4 auf Monozyten steigt nach Stimulation mit *L. rhamnosus*

CBMC wurden für 1h mit LR mit einer MOI von 1:0,1 und 1:1 stimuliert und anschließend mittels FACS auf die Expression monozytärer Oberflächenmarker analysiert. Als Kontrolle dienen unstimulierte Zellen.

**A-D:** Darstellung exemplarischer Histogramme der MFI (*median fluorescence intensity*) von **A** CD11b, **B** CD18, **C** CD86 und **D** TLR2 auf Monozyten nach Stimulation mit LR für 1h. Die blauen Kurven zeigen die Antigenexpression der unstimulierten Probe, die roten Kurven zeigen die Antigenexpression nach Stimulation mit LR (MOI 1:1).

**E-G:** Darstellung exemplarischer Dotplots der Expression von **E** TLR4, **F** CD16 und **G** PD-L1 nach Stimulation mit LR. Hierbei wurde der prozentuale Anteil positiv gefärbter Monozyten an den gesamten Monozyten analysiert. Als Kontrolle dienten unstimulierte Zellen. Die Dotplots zeigen die Expression der jeweiligen Antikörper (Y-Achse) auf unstimulierten Zellen und mit LR stimulierten Zellen (MOI 1:0,1 und MOI 1:1).



**Abb. 6: Erhöhte Antigenexpression von Oberflächenmarkern auf neonatalen Monozyten nach Stimulation mit *L. rhamnosus***

Für die Analyse der Expression verschiedener Aktivitätsmarker auf Monozyten wurden CBMC für 24 h mit LR mit einer MOI von 1:0,1 und 1:1 stimuliert. Als Kontrolle dienten unstimulierte Zellen. Balkendiagramme zeigen die Expression der Aktivitätsmarker **A** CD11b, **B** CD86, **C** TLR2, **D** CD18 **E** TLR4, **F** CD16 und **G** PD-L1 auf unstimulierten Zellen und stimulierten Zellen (MOI 1:0,1 und MOI 1:1). Dargestellt sind die Einzelwerte (weiße Punkte) und die Mittelwerte (Balken). n=9, \* p<0,05, \*\* p<0,05,

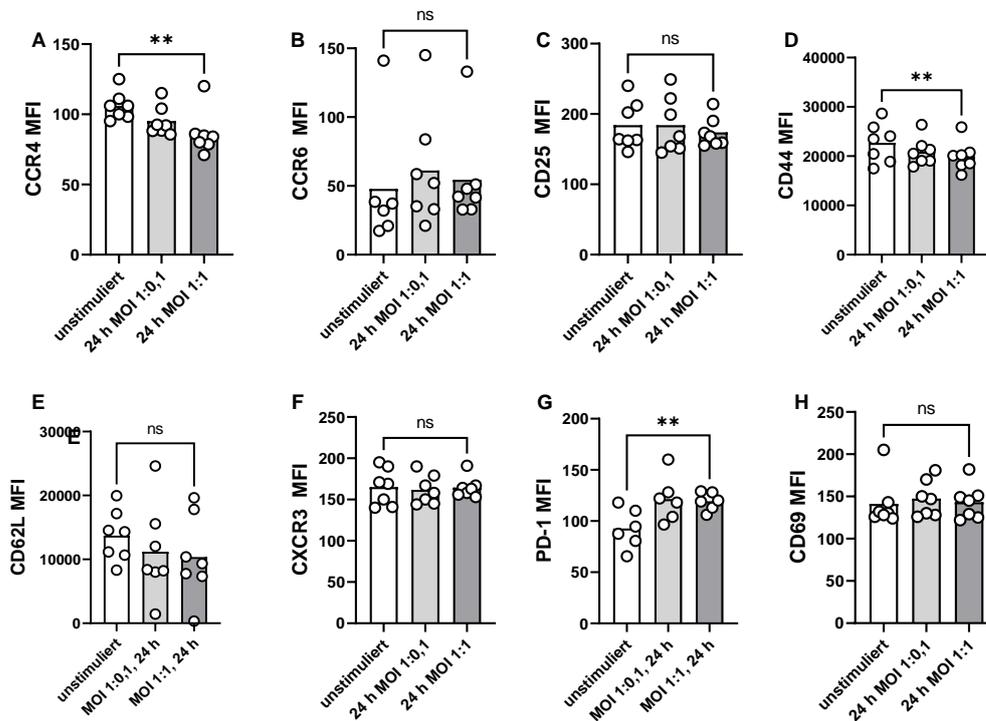
\*\*\*  $p < 0,01$ , ns  $p > 0,05$ , Gepaarter Student's t-Test für MFIs und Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test für prozentuale Werte.

Auf T-Zellen (CD4+ Zellen) war die Expression der untersuchten Antigene CCR4, CCR6, CD25, CXCR3, PD-1 und CD69 insgesamt sehr gering, während alle T-Zellen CD44 und CD62L exprimierten. Die Auswertung der Expression aller Oberflächenmarker auf T-Zellen erfolgte anhand der MFI. Die Stimulation mit LR für 24 h führte auf T-Zellen zu einer konzentrationsabhängigen Verringerung der Expression der Antigene CCR4, CD44 und einer leichten Erhöhung des Antigens PD-1 (Tabelle 8 und Abbildung 7).

**Tabelle 8: Antigenexpression von nicht stimulierten und mit *L. rhamnosus* stimulierten T-Zellen**

Antigen	Kontrolle	LR MOI 1:0.1	LR MOI 1:1	n	p-Wert*	Abb.
CCR4 (MFI)	105,9±10,0	95,1±10,6	86,4±15,7	7	<b>p&lt;0,01</b>	7A
CCR6 (MFI)	47,8±46,5	61,2±42,2	54,5±35,3	7	p>0,05	7B
CD25 (MFI)	184,1±34,2	184±40,1	173,9±21,4	7	p>0,05	7C
CD44 (MFI)	22694±3975	20894±2833	19966±3036	7	<b>p&lt;0,01</b>	7D
CD62L (MFI)	13724±4020	11177±7322	10374±6573	7	p>0,05	7E
CXCR3 (MFI)	165±22,4	162,0±17,7	164,6±12,6	7	p>0,05	7F
PD-1 (MFI)	92,7±19,3	121,4±22,2	119,2±8,8	6	<b>p&lt;0,01</b>	7G
CD69 (MFI)	141,1±28,8	147,4±21,5	143,3±29,8	7	p>0,05	7H

\*für den Vergleich zwischen Kontrolle und LR MOI 1:1



**Abb. 7: Phänotyp von neonatalen T-Zellen nach Stimulation mit *L. rhamnosus***

Für die Analyse verschiedener Aktivitätsmarker auf T-Zellen wurden CBMC für 24 h mit LR mit einer MOI von 1:0,1 und 1:1 stimuliert. Als Kontrolle dienten unstimulierte Zellen. Balkendiagramme zeigen die MFI der Aktivitätsmarker **A** CCR4 **B** CCR6 **C** CD25, **D** CD44, **E** CD62L, **F** CXCR3, **G** PD-1 und **H** CD69 auf unstimulierten Zellen und stimulierten Zellen (MOI 1:0,1 und MOI 1:1). Dargestellt sind die Einzelwerte (weiße Punkte) und die Mittelwerte (Balken). n=7, \*\* p<0,01, ns p>0,05, Gepaarter Student's t-Test.

### 3.1.2 *L. rhamnosus* führt zu einer Induktion von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen in neonatalen Monozyten

Da die deutlicheren phänotypischen Veränderungen nach Stimulation mit LR auf Monozyten beobachtet wurden, konzentrierten wir uns bei den weiteren Versuchen auf diese Zellpopulation. Im nächsten Schritt wurde der Effekt einer Stimulation mit LR auf die Zytokinproduktion von neonatalen Monozyten analysiert.

Hierfür wurden CBMC nach einer einstündigen Stimulation mit LR für 4 weitere Stunden mit Brefeldin inkubiert, um die Zytokinsekretion zu stoppen. Anschließend erfolgte die

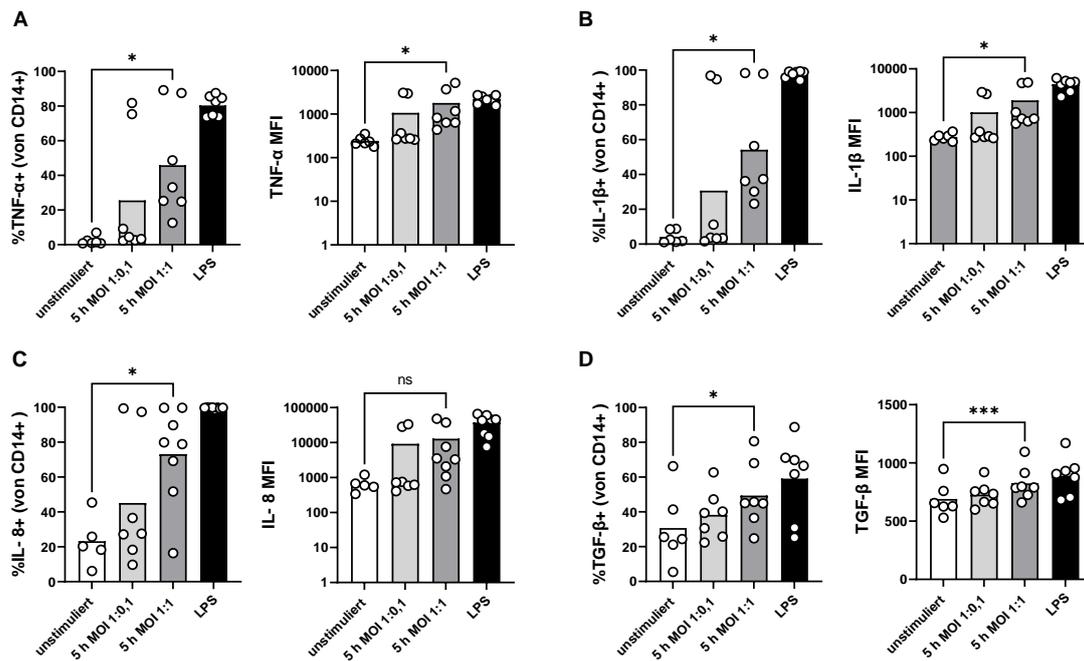
Intrazellulärfärbung und die durchflusszytometrische Analyse. Mit LPS stimulierte Zellen dienten als Positivkontrolle. Die Zytokinexpression wurde sowohl prozentual als auch mittels MFI ausgewertet.

Hierbei zeigte sich nach der Stimulation mit LR eine konzentrationsabhängige Erhöhung aller untersuchten Zytokine (Tabelle 9 und Abbildung 8)

**Tabelle 9: Zytokinexpression von nicht stimulierten und mit *L. rhamnosus* stimulierten Monozyten**

Antigen	Kontrolle	LR MOI 1:1	n	p-Wert*	Abb.
TNF- $\alpha$ (%)	2,2 $\pm$ 2,4	45,9 $\pm$ 31,0	6-7	<b>p&lt;0.05</b>	8A
TNF- $\alpha$ (MFI)	243 $\pm$ 61	1797 $\pm$ 1865	6-7	<b>p&lt;0,05</b>	8A
IL-1 $\beta$ (%)	4,0 $\pm$ 3,6	30,7 $\pm$ 44,5	6-7	<b>p&lt;0.05</b>	8B
IL-1 $\beta$ (MFI)	276 $\pm$ 55	1894 $\pm$ 1991	6-7	<b>p&lt;0,05</b>	8B
IL-8 (%)	23,2 $\pm$ 14,4	73,2 $\pm$ 27,9	5-8	<b>p&lt;0.05</b>	8C
IL-8 (MFI)	674 $\pm$ 325	12903 $\pm$ 18668	5-8	p>0,05	8C
TGF- $\beta$ (%)	30.7 $\pm$ 20.9	49,4 $\pm$ 18,9	6-7	<b>p&lt;0,05</b>	8D
TGF- $\beta$ (MFI)	690 $\pm$ 146	824 $\pm$ 142	6-7	<b>P&lt;0,001</b>	8D

\*für den Vergleich zwischen Kontrolle und LR MOI 1:1



**Abb. 8: Erhöhte Zytokinexpression von neonatalen Monozyten nach Stimulation mit *L. rhamnosus***

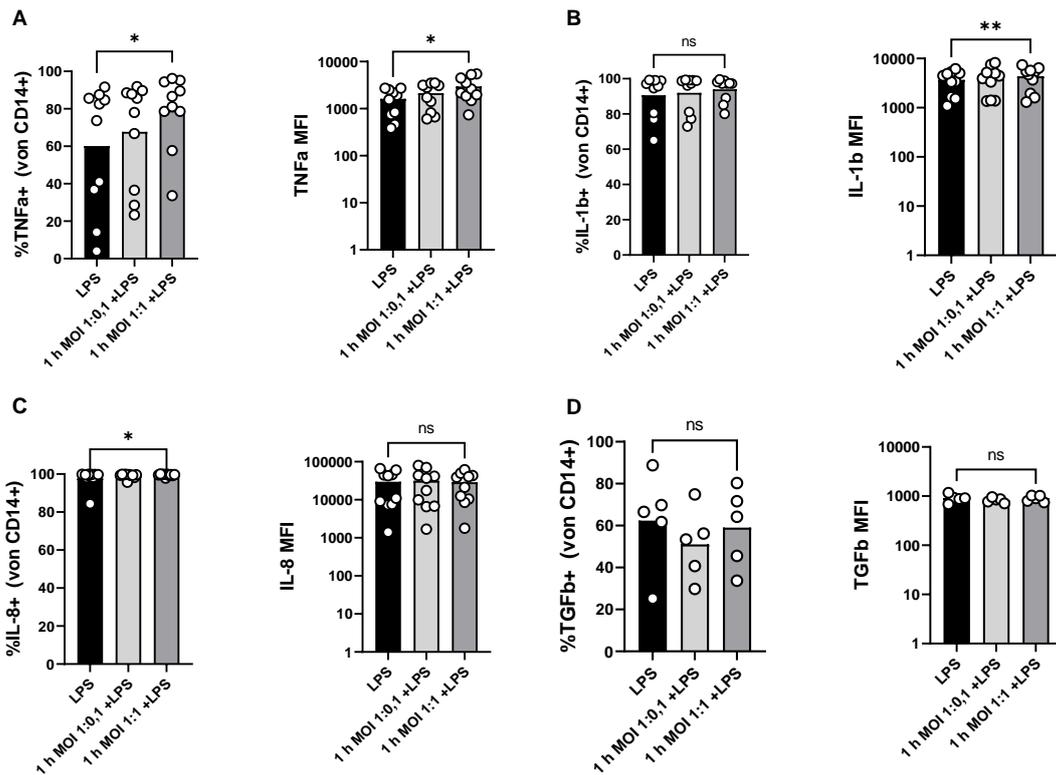
Für die Analyse der Expression der Monozyten- Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8 und TGF- $\beta$  wurden CBMC für 1 h mit LR in einer MOI von 1:0,1 und 1:1 stimuliert. Als Negativkontrolle dienten unstimulierte Zellen und als Positivkontrolle dienten mit LPS stimulierte Zellen. Danach erfolgte eine vierstündige Zugabe von Brefeldin zur Hemmung der Zytokinsekretion und dann die durchflusszytometrische Messung. Balkendiagramme zeigen jeweils den prozentualen Anteil Zytokin-exprimierender Monozyten an allen Monozyten und die MFI der Zytokinexpression von **A** TNF- $\alpha$ , **B** IL-1 $\beta$  und **C** IL-8 und **D** TGF- $\beta$  von unstimulierten Monozyten, mit LR stimulierten Monozyten (MOI 1:0,1 und MOI 1:1) und mit LPS-stimulierten Monozyten. Dargestellt sind die Einzelwerte (weiße Punkte) und die Mittelwerte (Balken). n=5-8, \* p<0,05, \*\*\* p<0,001, ns p>0,05, Gepaarter Student's t-Test für MFIs und Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test für prozentuale Werte.

Als nächstes wurde untersucht, welche Wirkung LR bei gleichzeitiger Stimulation mit LPS auf die Zytokinexpression neonataler Monozyten hat. Hierzu wurden CBMC erneut eine Stunde lang mit LR in einer MOI von 1:0,1 und 1:1 und dann 10  $\mu$ g/ml LPS und Brefeldin für 4 Stunden stimuliert. Auch unter gleichzeitiger Stimulation mit LPS kam es durch LR zu einer Induktion der Zytokinexpression von TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-8, nicht jedoch von TGF- $\beta$  im Vergleich zur Stimulation mit LPS allein (Tabelle 10 und Abbildung 9).

**Tabelle 10: Zytokinexpression von mit LPS stimulierten und mit LPS+*L. rhamnosus* stimulierten Monozyten**

Antigen	Kontrolle	LR MOI 1:1	n	p-Wert*	Abb.
TNF- $\alpha$ (%)	60,2 $\pm$ 33,1	79,2 $\pm$ 19,7	10	<b>p&lt;0,05</b>	9A
TNF- $\alpha$ (MFI)	1610 $\pm$ 940	2962 $\pm$ 1652	10	<b>p&lt;0,05</b>	9A
IL-1 $\beta$ (%)	90,6 $\pm$ 12,1	93,4 $\pm$ 6,8	10	p>0,05	9B
IL-1 $\beta$ (MFI)	3680 $\pm$ 1768	4353 $\pm$ 2121	10	<b>p&lt;0,01</b>	9B
IL-8 (%)	97,8 $\pm$ 4,8	99,5 $\pm$ 0,6	10	<b>p&lt;0,05</b>	9C
IL-8 (MFI)	29598 $\pm$ 24679	28823 $\pm$ 20412	10	p>0,05	9C
TGF- $\beta$ (%)	62,4 $\pm$ 23,2	59,1 $\pm$ 19,1	5	p>0,05	9D
TGF- $\beta$ (MFI)	913 $\pm$ 174	899 $\pm$ 127	5	p>0,05	9D

\*für den Vergleich zwischen Kontrolle und LR MOI 1:1



**Abb. 9: Erhöhte Zytokinexpression von neonatalen Monozyten nach gleichzeitiger Stimulation mit *L. rhamnosus* und LPS**

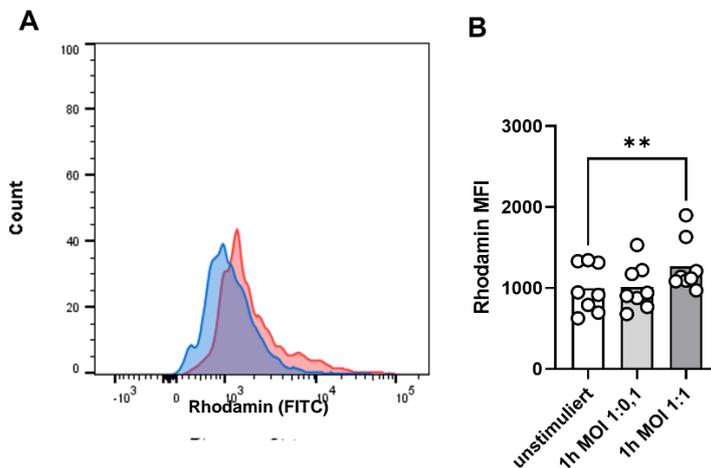
Für die Analyse der Expression der Monozyten- Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8 und TGF- $\beta$  wurden CBMC für 1 h mit LR in einer MOI von 1:0,1 und 1:1 vorstimuliert und anschließend für 4 h mit LPS unter gleichzeitiger Zugabe von Brefeldin stimuliert. Als Kontrolle dienten nur mit LPS stimulierte Zellen. Balkendiagramme zeigen jeweils den prozentualen Anteil Zytokin-exprimierender Monozyten an allen Monozyten und die MFI der Zytokinexpression von **A** TNF- $\alpha$ , **B** IL-1 $\beta$  und **C** IL-8 und **D** TGF- $\beta$  durch Monozyten nach alleiniger LPS-Stimulation und nach gleichzeitiger Stimulation mit LR (MOI 1:0,1 und MOI 1:1). Dargestellt sind die Einzelwerte (weiße Punkte) und die Mittelwerte (Balken). n=10, \* p<0,05, \*\* p<0,01, ns p>0,05, Gepaarter Student's t-Test für MFIs und Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test für prozentuale Werte.

### 3.1.3 *L. rhamnosus* erhöht die Produktion von reaktiven

#### *Sauerstoffspezies (ROS) durch neonatale Monozyten*

Eine weitere wichtige Funktion von Monozyten ist die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). Daher wurde die ROS-Produktion von neonatalen Monozyten nach einstündiger Stimulation mit LR untersucht.

Sowohl stimulierte als auch unstimulierte Monozyten produzierten ROS. Es zeigte sich bei mit LR stimulierten Zellen eine leichte Erhöhung der ROS-Produktion im Vergleich zu unstimulierten Zellen (MFI  $996 \pm 296$  versus  $1011 \pm 280$  (MOI 1:0,1) versus  $1267 \pm 322$  (MOI 1:1),  $n=8$ ,  $p<0,01$  für nicht stimulierte Zellen gegenüber MOI 1:1 (Abbildung 10B).



**Abb. 10: Vermehrte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies durch neonatale Monozyten nach Stimulation mit *L. rhamnosus***

Für die Analyse der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) wurden CBMC für 1 h mit LR in einer MOI von 1:0,1 und 1:1 stimuliert. Als Kontrolle dienten unstimulierte Zellen. **A** Repräsentatives Histogramm für die MFI von Rhodamin auf unstimulierten Monozyten (blaue Kurve) und auf mit LR (MOI 1:1) stimulierten Monozyten (rote Kurve). **B** Das Balkendiagramm zeigt die MFI von Rhodamin auf Monozyten ohne und mit Stimulation mit LR (MOI 1:0,1 und MOI 1:1). Dargestellt sind die Einzelwerte (weiße Punkte) und die Mittelwerte (Balken).  $n=7-8$ ,  $** p<0,05$ , Gepaarter Student's t-Test.

### 3.1.4 *L. acidophilus* und *B. bifidum* führen zu einer geringen Induktion

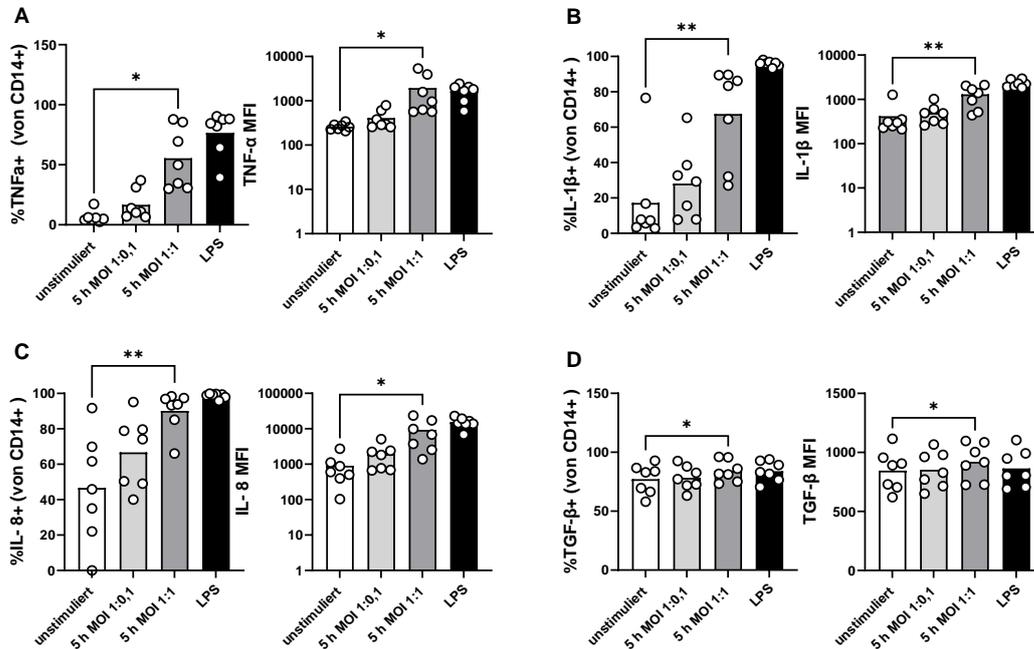
#### *pro- und antiinflammatorischer Zytokine in neonatalen Monozyten*

Im nächsten Schritt wurde der Effekt zweier weiterer Probiotikastämme und deren Kombination auf die Zytokinexpression neonataler Monozyten untersucht. Die Versuchsbedingungen entsprachen dabei den Versuchen mit LR. Hierbei zeigte sich nach der Stimulation mit LA analog zur Stimulation mit LR eine konzentrationsabhängige Erhöhung der Zytokinexpression für alle untersuchten Zytokine (Tabelle 11 und Abbildung 11). Im Gegensatz dazu zeigte BB nur eine stimulierende Wirkung auf die IL-8-Expression, aber nicht auf die Expression von IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  oder TGF- $\beta$  (Tabelle 12, und Abbildung 12). Die Stimulation mit einer Kombination aus LA und BB induzierte die Expression von TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-8, nicht aber die von TGF- $\beta$  (Tabelle 13 und Abbildung 13).

**Tabelle 11: Zytokinexpression von unstimulierten und mit *L. acidophilus* stimulierten Monozyten**

Antigen	Kontrolle	LA MOI 1:1	n	p-Wert*	Abb.
TNF- $\alpha$ (%)	6,5 $\pm$ 4,9	55,4 $\pm$ 25,4	7	<b>p&lt;0,05</b>	11A
TNF- $\alpha$ (MFI)	260 $\pm$ 45	1943 $\pm$ 1928	7	<b>p&lt;0,05</b>	11A
IL-1 $\beta$ (%)	17,2 $\pm$ 26,6	67,5 $\pm$ 27,3	7	<b>p&lt;0,01</b>	11B
IL-1 $\beta$ (MFI)	417 $\pm$ 379	1302 $\pm$ 684	7	<b>p&lt;0,01</b>	11B
IL-8 (%)	46,6 $\pm$ 30,9	90,1 $\pm$ 11	7	<b>p&lt;0,01</b>	11C
IL-8 (MFI)	902 $\pm$ 867	9302 $\pm$ 8279	7	<b>p&lt;0,05</b>	11C
TGF- $\beta$ (%)	77,2 $\pm$ 12,6	84,1 $\pm$ 9,1	7	<b>p&lt;0,05</b>	11D
TGF- $\beta$ (MFI)	846 $\pm$ 171	920 $\pm$ 154	7	<b>p&lt;0,05</b>	11D

\*für den Vergleich zwischen Kontrolle und LA MOI 1:1



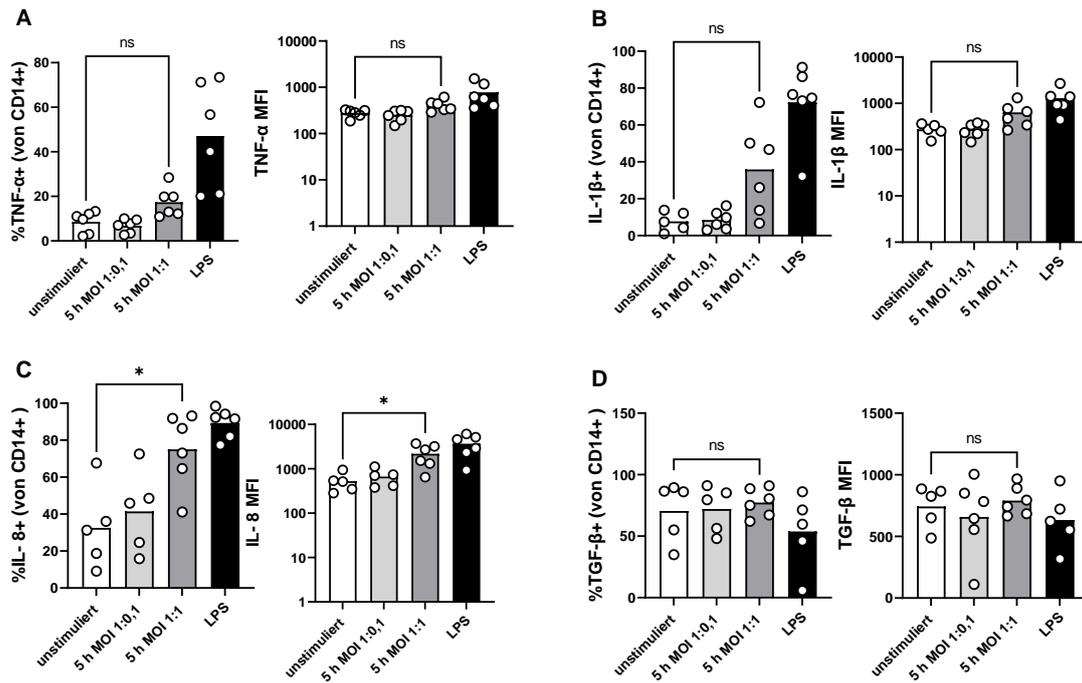
**Abb. 11: Erhöhte Zytokinexpression von neonatalen Monozyten nach Stimulation mit *L. acidophilus***

Für die Analyse der Expression der Monozyten-Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-8 und TGF- $\beta$  wurden CBMC für 1 h mit LA mit einer MOI von 1:0,1 und 1:1 stimuliert. Danach erfolgte eine vierstündige Zugabe von Brefeldin. Als Negativkontrolle dienten unstimulierte Zellen und als Positivkontrolle dienten mit LPS stimulierte Zellen. Balkendiagramme zeigen jeweils den prozentualen Anteil Zytokin-exprimierender Monozyten an allen Monozyten und die MFI der Zytokinexpression von **A** TNF- $\alpha$ , **B** IL-1 $\beta$  und **C** IL-8 und **D** TGF- $\beta$  in unstimulierten Monozyten, mit LA stimulierten Monozyten (MOI 1:0,1 und MOI 1:1) und mit LPS- stimulierten Monozyten. Dargestellt sind die Einzelwerte (weiße Punkte) und die Mittelwerte (Balken). n=7, \* p<0,05, \*\* p<0,01, Gepaarter Student's t-Test für MFIs und Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test für prozentuale Werte.

**Tabelle 12: Zytokinexpression von unstimulierten und mit *B. bifidum* stimulierten Monozyten**

<b>Antigen</b>	<b>Kontrolle</b>	<b>BB MOI 1:1</b>	<b>n</b>	<b>p-Wert*</b>	<b>Abb.</b>
TNF- $\alpha$ (%)	8,5 $\pm$ 4,8	17,4 $\pm$ 6,7	6	p>0,05	12A
TNF- $\alpha$ (MFI)	278 $\pm$ 52	414 $\pm$ 120	6	p>0,05	12A
IL-1 $\beta$ (%)	7,7 $\pm$ 5,3	35,9 $\pm$ 24,8	6	p>0,05	12B
IL-1 $\beta$ (MFI)	274 $\pm$ 81	638 $\pm$ 382	6	p>0,05	12B
IL-8 (%)	32,5 $\pm$ 22,3	75,0 $\pm$ 20,0	6	<b>p&lt;0,05</b>	12C
IL-8 (MFI)	525 $\pm$ 258	2181 $\pm$ 1197	6	<b>p&lt;0,05</b>	12C
TGF- $\beta$ (%)	70,4 $\pm$ 24,3	77,4 $\pm$ 11,5	6	p>0,05	12D
TGF- $\beta$ (MFI)	743 $\pm$ 171	790 $\pm$ 119	6	p>0,05	12D

\*für den Vergleich zwischen Kontrolle und BB MOI 1:1



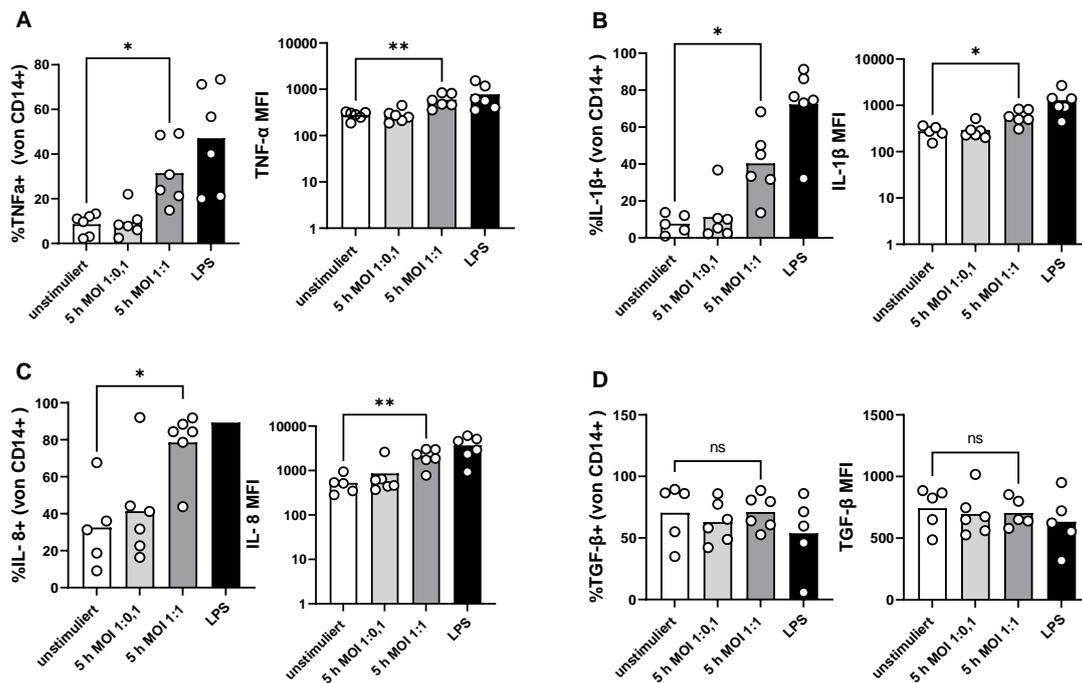
**Abb. 12:** Nur leicht erhöhte Zytokinexpression von neonatalen Monozyten nach Stimulation mit *B. bifidum*

Für die Analyse der Expression der Monozyten-Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-8 und TGF- $\beta$  wurden CBMC für 1 h mit BB mit einer MOI von 1:0,1 und 1:1 stimuliert. Danach erfolgte eine vierstündige Zugabe von Brefeldin. Als Negativkontrolle dienten unstimulierte Zellen und als Positivkontrolle dienten mit LPS stimulierte Zellen. Balkendiagramme zeigen jeweils den prozentualen Anteil Zytokin-exprimierender Monozyten an allen Monozyten und die MFI der Zytokinexpression von **A** TNF- $\alpha$ , **B** IL-1 $\beta$  und **C** IL-8 und **D** TGF- $\beta$  in unstimulierten Monozyten, mit BB stimulierten Monozyten (MOI 1:0,1 und MOI 1:1) und mit LPS- stimulierten Monozyten. Dargestellt sind die Einzelwerte (weiße Punkte) und die Mittelwerte (Balken). n=5-6, \* p<0,05, ns p>0,05, Gepaarter Student's t-Test für MFIs und Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test für prozentuale Werte.

**Tabelle 13: Zytokinexpression von unstimulierten und mit *L. acidophilus*+*B. bifidum* stimulierten Monozyten**

<b>Antigen</b>	<b>Kontrolle</b>	<b>LA+BB MOI 1:1</b>	<b>n</b>	<b>p-Wert*</b>	<b>Abb.</b>
TNF- $\alpha$ (%)	8,5 $\pm$ 4,8	31,4 $\pm$ 14,5	6	<b>p&lt;0,05</b>	13A
TNF- $\alpha$ (MFI)	278 $\pm$ 52,2	590 $\pm$ 199	6	<b>p&lt;0,01</b>	13A
IL-1 $\beta$ (%)	7,7 $\pm$ 5,3	40,4 $\pm$ 18,6	6	<b>p&lt;0,05</b>	13B
IL-1 $\beta$ (MFI)	274 $\pm$ 81	586 $\pm$ 202	6	<b>p&lt;0,05</b>	13B
IL-8 (%)	32,5 $\pm$ 22,3	78,6 $\pm$ 17,6	6	<b>p&lt;0,05</b>	13C
IL-8 (MFI)	526 $\pm$ 258	2120 $\pm$ 848	6	<b>p&lt;0,01</b>	13C
TGF- $\beta$ (%)	70,4 $\pm$ 24,3	71,0 $\pm$ 13,9	5	p>0,05	13D
TGF- $\beta$ (MFI)	743 $\pm$ 171	704 $\pm$ 116	5	p>0,05	13D

\*für den Vergleich zwischen Kontrolle und LA+BB MOI 1:1

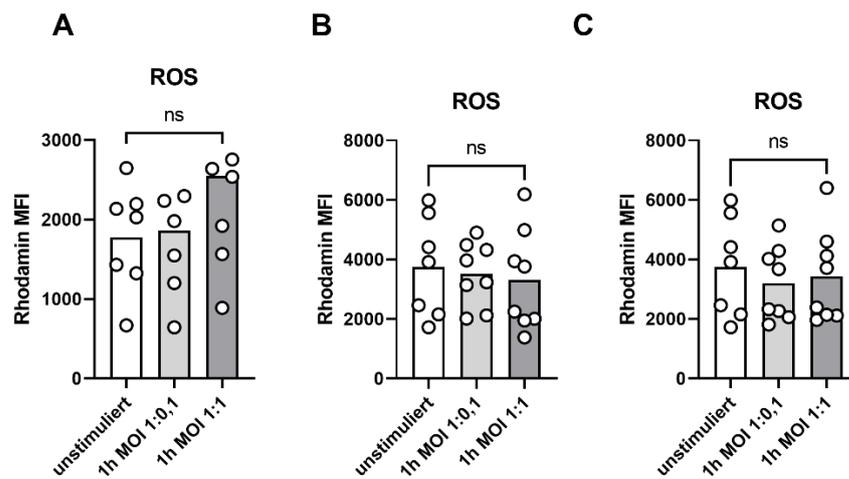


**Abb. 13: Erhöhte Zytokinexpression von neonatalen Monozyten nach Stimulation mit *L. acidophilus* und *B. bifidum***

Für die Analyse der Expression der Monozyten-Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-8 und TGF- $\beta$  wurden CBMC für 1 h mit LA und BB im gleichen Verhältnis mit einer MOI von 1:0,1 und 1:1. Danach erfolgte eine vierstündige Zugabe von Brefeldin. Als Negativkontrolle dienten unstimulierte Zellen und als Positivkontrolle dienten mit LPS stimulierte Zellen. Balkendiagramme zeigen jeweils den prozentualen Anteil Zytokin-exprimierender Monozyten an allen Monozyten und die MFI der Zytokinexpression von **A** TNF- $\alpha$ , **B** IL-1 $\beta$  und **C** IL-8 und **D** TGF- $\beta$  in unstimulierten Monozyten, mit LA und BB stimulierten Monozyten (MOI 1:0,1 und MOI 1:1) und mit LPS- stimulierten Monozyten. Dargestellt sind die Einzelwerte (weiße Punkte) und die Mittelwerte (Balken). n=5-6, \*\* p<0,01, \* p<0,05, ns p>0,05, Gepaarter Student's t-Test für MFIs und Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test für prozentuale Werte.

### 3.1.5. Eine Stimulation mit *L. acidophilus* und *B. bifidum* beeinflusst die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) durch neonatale Monozyten nicht

Analog zu der Stimulation mit LR wurden CBMC mit LA, BB und mit einer Kombination aus LA und BB stimuliert und die ROS-Produktion der Monozyten gemessen. Weder eine Stimulation mit LA oder BB allein noch eine Stimulation mit LA und BB in Kombination führte zu einer signifikanten Steigerung der ROS-Produktion (Abbildung 14A-C).



**Abb. 14: Keine erhöhte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies durch neonatale Monozyten nach Stimulation mit *L. acidophilus*, *B. bifidum* und der Kombination aus *L. acidophilus* und *B. bifidum***

Für die Analyse der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) über den ROS-Indikator Rhodamin wurden CBMC für 1 h mit LA, BB und einer Kombination aus LA und BB im gleichen Verhältnis mit einer MOI von 1:0,1 und 1:1 stimuliert. Als Kontrolle dienten unstimulierte Zellen. Balkendiagramme zeigen die MFI von Rhodamin auf **A** Monozyten nach Stimulation mit LA **B** Monozyten nach Stimulation mit BB und **C** Monozyten nach Stimulation mit LA und BB (jeweils MOI 1:0,1 und MOI 1:1). Dargestellt sind die Einzelwerte (weiße Punkte) und die Mittelwerte (Balken). n=7, ns p>0,05, Gepaarter Student's t-Test.

Zusammenfassend konnten wir mit unseren *in vitro*-Versuchen zeigen, dass LR sowohl bei alleiniger Verwendung als auch in Kombination mit LPS einen proinflammatorischen Phänotyp in neonatalen Monozyten hervorruft. T-Zellen hingegen wurden von LR weniger stark beeinflusst und zeigten eher einen antiinflammatorischen Phänotyp nach Stimulation mit LR. Außerdem zeigten wir, dass LR und LA stärker als BB die

Expression vor allem proinflammatorischer Zytokine fördern. Die ROS-Produktion von neonatalen Monozyten wurde nur durch Stimulation mit LR, nicht aber durch die Stimulation mit LA und/oder BB begünstigt.

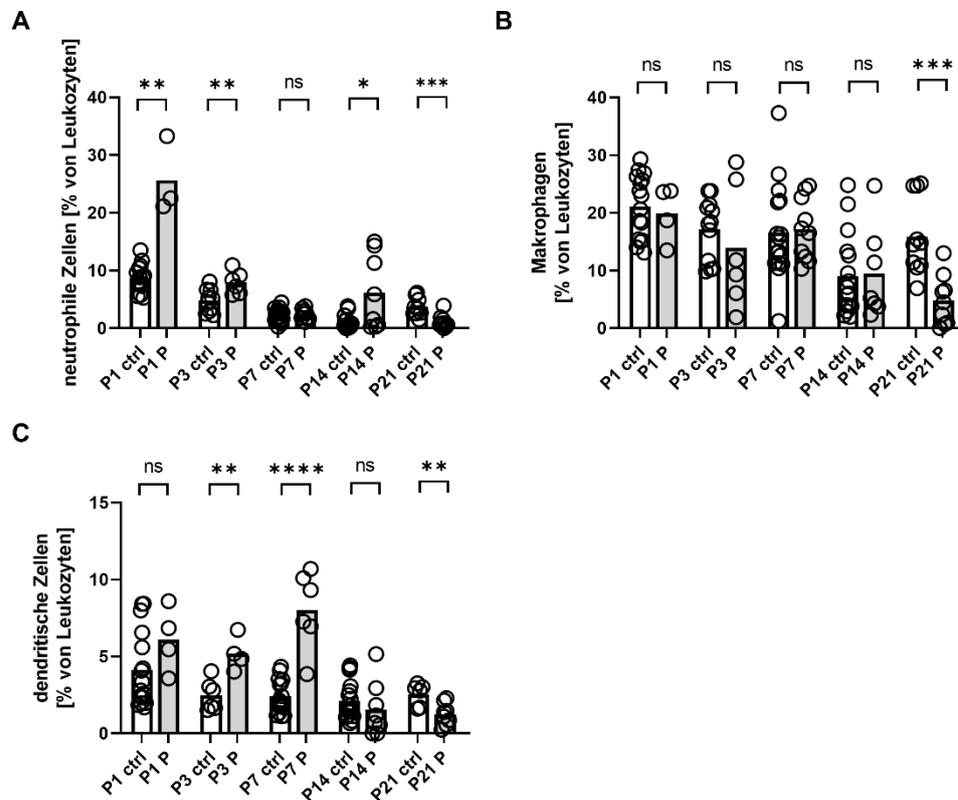
### **3.2 Wirkung einer oralen Probiotikatherapie auf die Immunzellkomposition im Darm neugeborener Mäuse**

Um die Auswirkungen von Probiotika auf die Immunzellkomposition im Darm *in vivo* zu analysieren, wurden trächtige Mäuse ab Tag 10 der Trächtigkeit über die Geburt hinweg bis zum Absetzen bzw. der Tötung der Jungtiere täglich mit Probiotika ( $2 \cdot 10^9$  CFU von in Wasser gelöstem BB und LA (Infloran®)) mittels Knopfsonde gefüttert. Ab dem 14. Lebenstag der Jungtiere wurden auch die Jungtiere mittels der Knopfsonde mit Probiotika gefüttert. Die Jungtiere wurden an Tag 1, 3, 7, 14 und 21 getötet und verschiedene Immunzellpopulationen im Darm wurden durchflusszytometrisch untersucht.

#### ***3.2.1 Wirkung einer oralen Probiotikatherapie auf myeloide Zellpopulationen im Darm neugeborener Mäuse***

Jungtiere von mit Probiotika behandelten Muttertieren zeigten im Vergleich zu Jungtieren unbehandelter Mütter einen erhöhten Anteil neutrophiler Zellen in der Darmschleimhaut unmittelbar nach der Geburt an P1 ( $25,6 \pm 6,7\%$  versus  $8,7 \pm 2,3\%$ ,  $n=3-15$ ,  $p < 0,01$ , Abbildung 15A), während der Anteil von Makrophagen und dendritischen Zellen zu diesem Zeitpunkt unverändert blieb. Dendritische Zellen waren an P3 und P7 bei mit Probiotika behandelten Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren erhöht ( $5,2 \pm 1,1\%$ , versus  $2,5 \pm 1,0\%$ ,  $n=4-6$ ,  $p < 0,01$  an P3 und  $8,0 \pm 2,5\%$  versus  $2,4 \pm 1,1\%$ ,  $n=7-11$ ,  $p < 0,0001$  an P7; Abbildung 15C). An P21, dem Zeitpunkt des Absetzens, war der Anteil von Neutrophilen ( $1,2 \pm 1,2\%$  versus  $3,7 \pm 1,6\%$ ,  $n=6-10$ ,  $p < 0,001$ ; Abbildung 15A), Makrophagen ( $4,9 \pm 4,4\%$  versus  $15,9 \pm 6,6\%$ ,  $n=6-10$ ,  $p < 0,001$ ; Abbildung 15B) und dendritischen Zellen ( $1,3 \pm 0,7\%$  versus  $2,5 \pm 0,7\%$ ,  $n=6-10$ ,  $p < 0,01$ ; Abbildung 15C) bei

den Jungtieren der mit Probiotika behandelten Muttertiere im Vergleich zu den Kontrolltieren vermindert.

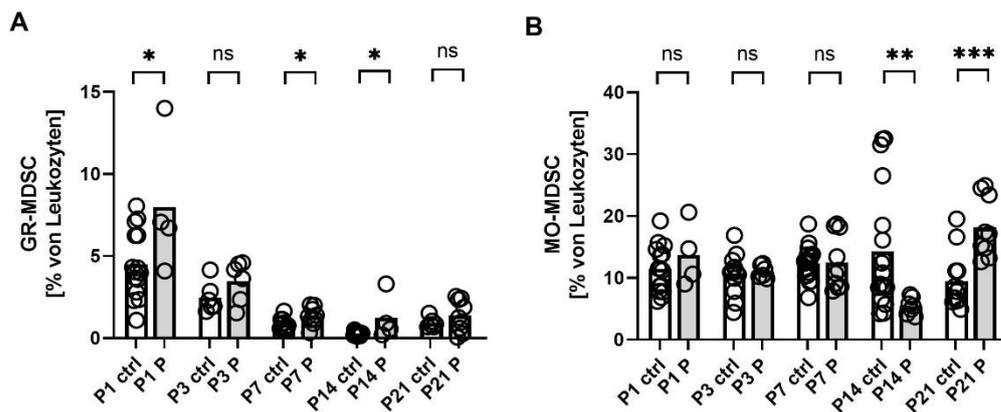


**Abb. 15: Veränderungen in der Komposition myeloider Zellpopulationen im Darm von neugeborenen Mäusen nach perinataler Probiotikagabe**

Muttertiere wurden ab der zweiten Hälfte der Trächtigkeit bis zum Absetzen der Jungtiere mit  $2 \cdot 10^9$  CFU von in Wasser gelösten BB und LA (Infloran®) gefüttert. Ab dem 14. Lebenstag erfolgte auch eine Fütterung der Jungtiere. Die Jungtiere wurden an den Lebenstagen 1, 3, 7, 14 und 21 getötet, der Darm entnommen und intestinale Leukozyten aufgereinigt, aus denen verschiedene Immunzellpopulationen mittels FACS quantifiziert wurden. Als Kontrolle dienten mit Wasser gefütterte Kontrolltiere. Balkendiagramme zeigen den prozentualen Anteil von **A** neutrophilen Zellen **B** Makrophagen und **C** dendritischen Zellen an der Gesamtheit der Leukozyten der Kontrolltiere (weiße Balken) und der mit Probiotika behandelten Tiere (graue Balken). Dargestellt sind die Einzelwerte (weiße Punkte) und die Mittelwerte (Balken). n=4-20, \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001, \*\*\*\* p<0,0001, ns p>0,05, Mann-Whitney-Test.

Myeloide Suppressorzellen (MDSC) spielen eine wichtige Rolle bei der Immunregulation des Neugeborenen. Daher wurde der Anteil granulozytärer MDSC

(GR-MDSC) und monozytärer MDSC (MO-MDSC) im Darm der Jungtiere durch Färbung der beiden Epitope des Gr-1-Moleküls Ly6G und Ly6C quantifiziert. Der Anteil von GR-MDSC an allen Leukozyten war im Darm der probiotikabehandelten Jungtiere fast durchgängig bis zum Absetzen erhöht im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren (8,0±4,2% versus 4,5±2,1% an P1; 3,5±1,3% versus 2,5±0,9% an P3; 1,3±0,5% versus 0,9±0,3% an P7; 1,2±1,4% versus 0,3±0,1% an P14 und 1,4±1,0% versus 0,9±0,3% an P21, n=4-15, p<0,05 für P1, P7 und P14, p>0,05 für P3 und P21; Abbildung 16A); der Anteil von MO-MDSC dagegen zeigte keine konstanten Tendenzen und war bei den probiotikabehandelten Jungtieren im Vergleich zu den Kontrolltieren an P14 vermindert und an P21 erhöht (14,3±9,8% versus 5,5±1,3% an P14, n=8-18, p<0,01 und 9,5±4,5% versus 18,1±4,9% an P21, n=9-12, p<0,001; Abbildung 16B).



**Abb. 16: Erhöhter Anteil von GR-MDSC im Darm neugeborener Mäuse nach perinataler Probiotikagabe**

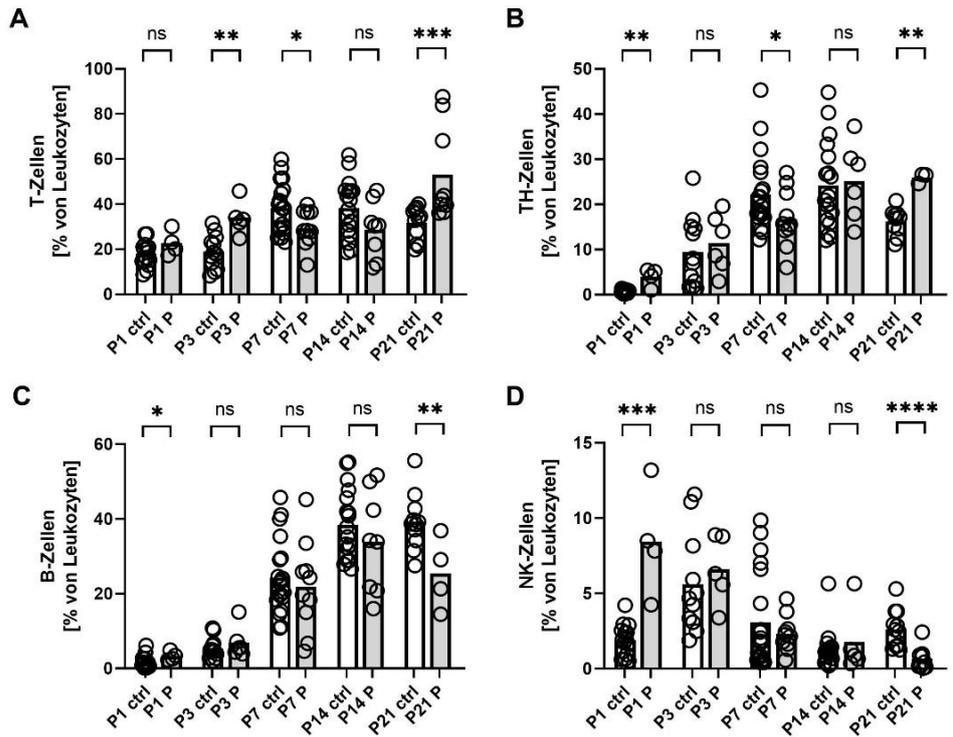
Muttertiere wurden ab der zweiten Hälfte der Trächtigkeit bis zum Absetzen der Jungtiere mit  $2 \cdot 10^9$  CFU von in Wasser gelöstem BB und LA (Infloran®) gefüttert. Ab dem 14. Lebensstag erfolgte auch eine Fütterung der Jungtiere. Die Jungtiere wurden an den Lebenstagen 1, 3, 7, 14 und 21 getötet, der Darm entnommen und intestinale Leukozyten aufgereinigt, aus denen verschiedene Immunzellpopulationen mittels FACS quantifiziert wurden. Als Kontrolle dienten mit Wasser gefütterte Kontrolltiere.

Balkendiagramme zeigen den prozentualen Anteil von **A** granulozytären MDSC (GR-MDSC) und **B** monozytären MDSC (MO-MDSC) an der Gesamtheit der Leukozyten der Kontrolltiere (weiße Balken) und der mit Probiotika behandelten Tiere (graue Balken). Dargestellt sind die Einzelwerte (weiße Punkte)

und die Mittelwerte (Balken). n=4-20, \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001, ns p>0,05, Mann-Whitney-Test.

### ***3.2.2 Wirkung einer oralen Probiotikatherapie auf Lymphozyten-Subpopulationen im Darm neugeborener Mäuse***

Bei den Lymphozyten zeigten sich erhöhte Level an T-Zellen bei den probiotikabehandelten Jungtieren im Vergleich zu den Kontrollen sowohl an P3 nach Geburt als auch zum Zeitpunkt des Absetzens ( $33,9 \pm 7,6\%$  versus  $18,9 \pm 7,5\%$  an P3, und  $35,1 \pm 20,9\%$  versus  $31,8 \pm 7,1\%$  an P21, n=4-15, p<0,01; Abbildung 17A). Ein ähnliches Bild zeigte sich für die Subpopulation der T-Helfer-Zellen ( $3,9 \pm 2,0\%$  versus  $0,7 \pm 0,4\%$  an P1 und  $25,9 \pm 1,1\%$  versus  $16,2 \pm 2,9\%$  an P21, n=4-15, p<0,01; Abbildung 17B). Eine Analyse der Subpopulation der zytotoxischen T-Zellen war leider nicht möglich, da der Marker CD8 nach Verdau des Gewebes nicht mehr nachweisbar war. B-Zellen waren bei den probiotikabehandelten Tieren unmittelbar nach Geburt ebenfalls erhöht, zeigten jedoch deutlich erniedrigte Level zum Zeitpunkt des Absetzens ( $3,3 \pm 1,2\%$  versus  $1,8 \pm 1,7\%$  an P1 und  $25,5 \pm 9,7\%$  versus  $39,2 \pm 7,5\%$  an P21, n=4-15, p<0,05; Abbildung 17C). Außerdem beobachteten wir ähnlich wie bei den myeloiden Zellen erhöhte Level von NK-Zellen unmittelbar nach der Geburt bei den probiotikabehandelten Tieren, aber erniedrigte Level an P21 ( $8,4 \pm 3,7\%$  versus  $1,9 \pm 1,0\%$  an P1 und  $0,7 \pm 0,8\%$  versus  $2,6 \pm 1,2\%$  an P21, n=4-15, p<0,001; Abbildung 17D).



**Abb. 17: Veränderungen in der Komposition intestinaler Lymphozyten nach perinataler Probiotikatherapie**

Muttertiere wurden ab der zweiten Hälfte der Trächtigkeit bis zum Absetzen der Jungtiere mit  $2 \cdot 10^9$  CFU von in Wasser gelösten BB und LA (Infloran®) gefüttert. Ab dem 14. Lebenstag erfolgte auch eine Fütterung der Jungtiere. Die Jungtiere wurden an den Lebenstagen 1, 3, 7, 14 und 21 getötet, der Darm entnommen und intestinale Leukozyten aufgereinigt, aus denen verschiedene Immunzellpopulationen mittels FACS quantifiziert wurden. Als Kontrolle dienten mit Wasser gefütterte Kontrolltiere. Balkendiagramme zeigen den prozentualen Anteil von **A** T-Zellen **B** TH-Zellen **C** B-Zellen, **D** NK-Zellen an der Gesamtheit der Leukozyten der Kontrolltiere (weiße Balken) und der mit Probiotika behandelten Tiere (graue Balken). Dargestellt sind die Einzelwerte (weiße Punkte) und die Mittelwerte (Balken).  $n=3-20$ , \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ , ns  $p > 0,05$ , Mann-Whitney-Test.

## 4. Diskussion

In der hier vorliegenden Arbeit wurden Effekte von Probiotika auf die neonatale Immunantwort *in vitro* und *in vivo* analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass Probiotika sowohl *in vitro* die Reaktion von neonatalen Immunzellen verändern als auch *in vivo* die Komposition von Immunzellpopulationen im Darm beeinflussen.

### 4.1 *In vitro*-Versuche

In den *in vitro*-Versuchen konnte gezeigt werden, dass eine Stimulation mit LR die Expression des Chemokinrezeptors CCR4 und des Adhäsionsmoleküls CD44 auf T-Zellen verminderte und die Expression des co-inhibitorischen Moleküls PD-1 erhöhte. CCR4 ist ein Rezeptor für verschiedene proinflammatorische Zytokine und wird vorwiegend von Th2-Zellen und regulatorischen T-Zellen exprimiert. Interessanterweise konnte eine kürzlich veröffentlichte Studie zeigen, dass die Blockade von CCR4 sich protektiv auf die Entzündungsreaktion im Rahmen einer NEC auswirkt. Die Herunterregulation der CCR4-Expression auf T-Zellen könnte damit ein zugrundeliegender Mechanismus für die günstige Wirkung von Probiotika in der NEC-Prävention sein.[37] CD44 ist einer der klassischen Aktivierungsmarker von T-Zellen. Eine verminderte CD44-Expression nach Stimulation mit LR deutet damit darauf hin, dass LR die Aktivierung von T-Zellen vermindert und so möglicherweise antiinflammatorische Effekte hat. [38, 39]

PD-1 bewirkt über eine Bindung an seine Liganden PD-L1 oder PD-L2 eine Hemmung der T-Zellaktivierung.[40] Zusammenfassend scheint LR sich damit auf T-Zellen eher aktivierungshemmend auszuwirken.

Auf Monozyten zeigte sich, dass eine LR-Stimulation eine erhöhte Expression der Aktivierungsmarker CD11b, CD18, CD86, TLR2 und TLR4 auf Monozyten hervorrief. CD11b und CD18 bilden als Heterodimer den zu den Integrinen zählenden Komplementrezeptor CR3, der über verschiedene zelluläre Vorgänge maßgeblich an der Phagozytose beteiligt ist.[41] Vorangegangene Studien zeigten, dass eine Stimulation mit Laktobazillen die Phagozytosefähigkeit von Makrophagen steigert. [42, 43] Entsprechend führte eine orale *Lactobacillus*-Supplementation im Mausmodell zur

Induktion der Phagozytosekapazität von peritonealen und alveolären Makrophagen. [44, 45] Die von uns beobachtete Induktion von CD11b und CD18 könnte eine Erklärung für diese Effekte sein. Ähnlich wie in unseren Ergebnissen konnte auch in einer anderen Studie gezeigt werden, dass die Genexpression von TLR2 durch Lactobacillus-Stimulation induziert wird. [46] *In vivo* führte eine Probiotikatherapie mit *B. longum* analog zu unseren *in vitro*-Versuchen ebenfalls zur Induktion verschiedener TLR-Signalwege.[47] Auch die erhöhte Expressionsrate des kostimulatorischen Moleküls CD86 steht in Einklang mit vorangegangenen Studien, die eine Induktion von CD86 nach Lactobacillus-Stimulation auf dendritischen Zellen (DC) beobachteten. [48, 49] Insgesamt zeigte sich auf phänotypischer Ebene eine Induktion proinflammatorischer Oberflächenmarker auf Monozyten durch die Stimulation mit LR.

Die gegensätzlichen Effekte von LR auf den Phänotyp von T-Zellen und Monozyten des Neugeborenen erscheinen zunächst paradox. Es könnte aber spekuliert werden, dass Probiotika durch eine Induktion eines proinflammatorischen Phänotyps in angeborenen Immunzellen wie Monozyten auf der einen Seite die Fähigkeit zur frühen Infektabwehr verbessern und andererseits durch eine Hemmung der T-Zell-Aktivierung vor einer überschießenden Immunantwort schützen.

Weiter konnte gezeigt werden, dass eine Stimulation mit LR die Expression der Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-8, TNF- $\alpha$  und TGF- $\beta$  in Monozyten induzierte. Eine Vielzahl früherer *in vitro*-Studien untersuchte die Zytokinexpression adulter mononukleärer Zellen nach Stimulation mit verschiedenen probiotischen Stämmen. Insgesamt zeigten alle Studien eine Induktion sowohl pro- als auch anti-inflammatorischer Zytokine durch Probiotika.[50-52] Hierbei erfolgte die Aktivierung der proinflammatorischen Zytokine über Toll-like-Rezeptor-abhängige Signalwege, deren Aktivierung sich auch in unseren Versuchen zeigte.[53] Für neonatale Zellen gibt es bislang wenige Untersuchungen hinsichtlich des Effekts einer Probiotikastimulation. Eine andere Studie beobachtete entsprechend unseren Ergebnissen einen leichten Anstieg der Zytokinproduktion durch neonatale Zellen nach Stimulation mit Probiotika, der jedoch im Vergleich zu einer Stimulation mit *E. coli* deutlich geringer ausgeprägt war.[54]

Auch nach zusätzlicher Stimulation mit LPS beobachteten wir einen stimulierenden Effekt von Probiotika auf die Zytokinproduktion von Monozyten. Diese Ergebnisse

stehen im Gegensatz zu Erkenntnissen einer Studie von Hart et al., die bei mononukleären Zellen aus der Lamina propria des Darms eine verminderte LPS-induzierte Expression proinflammatorischer Zytokine nach Probiotikastimulation zeigten.[55] Diese unterschiedlichen Ergebnisse können damit erklärt werden, dass Immunzellen der Lamina propria im Gegensatz zu Immunzellen aus dem Blut bereits ein Priming durch bakterielle Antigene des Mikrobioms erfahren haben.

Anders als unsere *in vitro*-Versuche zeigten auch verschiedene *in vivo*-Studien eine supprimierende Wirkung von Probiotika auf die Zytokinproduktion. Beispielsweise konnte bei Mäusen nach Induktion eines Asthmas durch eine orale Supplementation mit *Lactobacillus plantarum* die Expression proinflammatorischer Zytokine in der Bronchiallavage verringert werden. [56] Im Rahmen der murinen Sepsis verminderte eine LR-Therapie ebenfalls die Expression proinflammatorischer Zytokine im Serum und ging mit einer reduzierten Sterblichkeit einher. [57] Die unterschiedlichen Effekte von Probiotika *in vitro* und *in vivo* werden etwas weiter unten ausführlicher diskutiert.

Auch hinsichtlich der Produktion von ROS durch neonatale Monozyten beobachteten wir einen induzierenden Effekt von LR. Dies entspricht Ergebnissen von Rocha-Ramírez et al, die wie wir eine erhöhte ROS-Produktion durch kindliche Makrophagen nach Stimulation mit *Lactobacillus casei* beobachteten. [42] Im Gegensatz hierzu zeigten andere Studien antioxidative Eigenschaften einiger *Lactobacillus*- und *Bifidobacterium*-Stämme, welche auf genetischer Ebene vermittelt zu werden scheinen, indem die Produktion antioxidativer Enzyme durch Probiotia aktiviert wird.[58, 59] Das Potential, diese antioxidativen Enzyme zu induzieren, scheint jedoch sehr stammspezifisch zu sein und ist bisher nur unzureichend untersucht.[60]

Bei der Untersuchung der Effekte weiterer Probiotikastämme auf die Monozytenfunktion zeigte sich ähnlich wie bei LR eine signifikante proinflammatorische Reaktion nach Stimulation mit LA und der Kombination aus LA und BB. BB allein hingegen erhöhte nur die Produktion von IL-8 signifikant und hatte allgemein einen weit geringeren Einfluss auf die Zytokinexpression. Bei genauerem Fokus auf die stammesabhängige Zytokininduktion in vorangegangenen Studien wird deutlich, dass ähnlich wie in unseren Versuchen *Lactobacillus*-Spezies sehr potent proinflammatorische Zytokine induzieren, während *Bifidobakterien* auf diese einen weniger starken Einfluss haben und potenter die

Produktion antiinflammatorischer Zytokine anregen.[50] In einer Studie von Lee et al verminderten hitzeinaktivierte BB die Expression von IL-1 $\beta$  durch LPS-stimulierte Makrophagen, während die Expressionsrate von IL-8 und TNF- $\alpha$  unverändert blieb. [61] Darüber hinaus konnten weitere Studien zeigen, dass BB die Expression des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 erhöht.[62] Während in unseren Versuchen Bifidobakterien nur weniger stark proinflammatorische Effekte provozierten, haben diese in den bisher aus der Literatur bekannten Untersuchungen sogar antiinflammatorisches Potential. An dieser Stelle muss erwähnt werden, dass in unserer Versuchsreihe die Analyse weiterer antiinflammatorischer Zytokine neben TGF- $\beta$  zur vollständigen Beurteilung des immunologischen Wirkungsprofils von Bifidobakterien aufgrund mangelnder Auswertbarkeit fehlt. In nachfolgenden Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe wurde der Effekt einer Stimulation mit LR auf die Expression des antiinflammatorischen IL-10 untersucht, wobei sich auch auf dieses Zytokin eine induzierende Wirkung zeigte. Da sich hier aber insgesamt nur sehr niedrige Expressionslevel zeigten, wurden diese Untersuchungen nicht für die anderen Probiotikastämme wiederholt.

Weiter führte die Stimulation von Monozyten mit LA, BB oder der Kombination beider Stämme im Gegensatz zu einer Stimulation mit LR zu keinem signifikanten Anstieg der ROS-Produktion. Über LR ist bekannt, dass dessen antioxidative Kapazität weniger suffizient ist als bei anderen Probiotika, was ein Hinweis auf die stärkere ROS-Induktion nach Stimulation mit LR im Vergleich zu einer Stimulation mit LA und BB sein könnte. [63] LA induzierte in einer Studie am stärksten die Superoxid-Dismutase-Aktivität [59] und auch BB erzeugte antioxidative Effekte über diesen Signalweg.[64] Wenngleich LA und BB in unseren Versuchen die ROS-Produktion nicht verminderten, sondern unbeeinflusst ließen, so kann man dennoch vermuten, dass die beiden Stämme ein günstigeres Profil hinsichtlich der Aktivierung von ROS-Signalwegen im Gegensatz zu LR haben.

Der ausbleibende Einfluss auf die ROS-Produktion kann möglicherweise auf die kürzere Zeitspanne der Probiotika-Stimulation zurückgeführt werden, die mit 1 Stunde in unserem Versuch im Vergleich zu einer Studie mit 24-stündiger Stimulation durch *L. casei* und anschließender Analyse der ROS-Produktion deutlich geringer ausfiel.[42]

Bezüglich aller Versuchsteile muss erwähnt werden, dass die Probiotika in unseren Versuchen nur in sehr niedrigen Konzentrationen (MOI 1:0,1 und MOI 1:1) im Vergleich zu anderen Studien eingesetzt wurden. Der Grund hierfür war die Herunterregulation des Monozyten-Markers CD14, die bei Konzentrationen ab einer MOI von 1:10 eintrat und mit höheren Konzentrationen an Probiotika stark zunahm, bis es ab einer MOI von 1:100 zu deutlicher Apoptose der Zellen kam. Dadurch war es nicht mehr möglich, Monozyten durchflusszytometrisch zu identifizieren. Diese im Vergleich zu anderen Studien frühen toxischen Wirkungen in unseren Versuchen könnten auf unterschiedliche Verarbeitung der Bakterien und unterschiedliche Kulturbedingungen zurückgeführt werden. Des Weiteren stimulierten wir in unseren Versuchen deutlich kürzer als vergleichbare andere Studien. In weiteren hier nicht gezeigten Versuchen untersuchten wir die phänotypischen Marker auf Monozyten auch nach 4 Stunden. Hier kam es im Vergleich zur frühen Messung wieder zu einer Abnahme der Expression der untersuchten Oberflächenmarker, was möglicherweise ebenfalls auf beginnende toxische Effekte zurückzuführen ist.

Ein letzter wichtiger Diskussionspunkt ist die bereits oben genannte Diskrepanz zwischen unseren (und anderen) *in vitro*-Versuchen und publizierten *in vivo*-Studien. Da im *in vitro*-Modell nur die Interaktion von Probiotika mit einzelnen Immunzellen untersucht werden kann und indirekte Effekte auf die Immunantwort beispielsweise über die Modulation des Mikrobioms nicht abgebildet werden, können *in vitro*-Untersuchungen nur einen Teil des Wirkungsspektrums von Probiotika wiedergeben. Beispielsweise zeigten Flinterman et al., dass Probiotika im *in vitro*-Modell die Zytokine TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und IL-10 induzierten, während dieselben nach *in vivo* Applikation zu einer Abnahme der Zytokinproduktion von TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-10 führten.[51] Dennoch können *in vitro*-Modelle bezüglich der Auswirkungen von Probiotika auf Immunzellen als erste Screening-Methode für potenzielle vorteilhafte Effekte individueller Stämme geeignet sein. [65, 66]

## 4.2 *In vivo*-Versuche

Hinsichtlich der Immunzellkomposition im Darm von neugeborenen Mäusen mit und ohne Probiotikaexposition fanden wir Unterschiede insbesondere unmittelbar nach der Geburt und dann wieder an P21 zum Zeitpunkt des Absetzens der Jungtiere vom Muttertier. Diese Beobachtung ist bemerkenswert, da beides Zeitpunkte sind, zu denen es sehr akut (unmittelbar nach der Geburt) oder schleichend (beim Absetzen) zu Veränderungen im Mikrobiom der Tiere kommt. Unmittelbar nach der Geburt wird der bis dahin weitestgehend sterile Darm der neugeborenen Tiere rasch mit Mikroorganismen besiedelt; zum Zeitpunkt des Absetzens hat die Umstellung der Nahrungsaufnahme von Muttermilch zu fester Nahrung während dem sog. Weaning ebenfalls maßgebliche Auswirkungen auf das Mikrobiom im Sinne vermehrter Quantität, Diversität und Stoffwechselaktivität. [67, 68] Die Beobachtung, dass gerade zu diesen Zeitpunkten eine Probiotikasupplementation einen Einfluss auf die Immunzellpopulationen hat, während in der Phase dazwischen deutlich stabilere Verhältnisse herrschen, deutet daraufhin, dass die immunmodulatorischen Effekte durch Probiotika insbesondere in „Umbruchsphasen“ des Mikrobioms relevant sind.

Unmittelbar nach der Geburt unterliegt das neonatale Immunsystem vielen Veränderungen. Anfangs sind insbesondere die angeborenen Immunzellen, darunter myeloide Zellpopulationen und NK-Zellen für die Immunabwehr verantwortlich, indem sie den Körper unspezifisch vor Pathogenen verteidigen.[69] Im Laufe der ersten Lebenswochen nimmt die Zahl der angeborenen Immunzellen bis zum Zeitpunkt des Absetzens deutlich ab.[70] Dies konnte auch in unseren Analysen bestätigt werden. Das adaptive Immunsystem bestehend aus vor allem B- und T-Lymphozyten entwickelt sich erst in den Wochen unmittelbar nach der Geburt [70]. Dies spiegelte sich in einem Anstieg der intestinalen B-Lymphozyten von ca. 2% bis ca. 40% und der intestinalen T-Lymphozyten von ca. 20% bis ca. 40% von P1 bis P 21 in unseren Versuchen wieder.

Zwischen der Geburt und dem Weaning nach ca. 21 Tagen bei Mäusen und ungefähr 4-6 Monaten beim Menschen vollzieht sich eine immunologische Prägung, die für das

spätere immunologische Gedächtnis eine entscheidende Rolle spielt.[68] Da sich zum Zeitpunkt des Weanings auch das Mikrobiom hinsichtlich Quantität und Diversität weiterentwickelt, fördern neben verschiedenen Metaboliten wie kurzkettigen Fettsäuren und Retinsäure hier auch mikrobielle Antigene die Immunzellentwicklung. [68, 71]

In unseren Untersuchungen zeigten sich bei mit Probiotika behandelten Tieren erhöhte Zahlen myeloider Zellen, insbesondere neutrophiler Zellen unmittelbar nach Geburt. Dies könnte darauf hindeuten, dass Probiotika zu einem Zeitpunkt, zu dem das adaptive Immunsystem noch unausgereift ist, angeborene Immunfunktionen stärken. Der Anteil dendritischer Zellen war bei mit Probiotika behandelten Jungtieren im Vergleich zu den Kontrolltieren im Laufe der ersten Lebenswoche signifikant erhöht. In der Neonatalperiode regen dendritische Zellen bei antigenvermittelter Aktivierung erste adaptive T-Zell-Reaktionen über IL-2 an, fördern aber im Falle einer geringen Antigen-Dosis eine immunologische Toleranz durch T-Zell-Deletion und T-Zell-Supprimierung.[72, 73] Daher kann spekuliert werden, dass Probiotika einen günstig modulierenden Effekt auf die T-Zellentwicklung über die Aktivierung dendritischer Zellen in den ersten Lebenstagen haben könnten. Zum Zeitpunkt des Weanings zeigten sich im Unterschied zum Zeitpunkt unmittelbar nach der Geburt verminderte Zahlen neutrophiler Zellen, dendritischer Zellen und Makrophagen bei den mit Probiotika behandelten Tieren. In Untersuchungen zu Immunzellpopulationen von neugeborenen Mäusen, deren Mütter in der Stillzeit mit *Lactobacillus casei* supplementiert wurden, zeigte sich ähnlich wie bei uns eine verminderte Anzahl an intestinalen Makrophagen und dendritischen Zellen an Tag 12 nach Geburt.[74] Eine Verminderung der phagozytotischen Aktivität und der Antigenpräsentation könnte zum Zeitpunkt des Absetzens vorteilhaft für die Diversität des sich entwickelnden Mikrobioms im Sinne eines Schutzes vor überschießenden Abwehrreaktionen gegenüber den sich neu ansiedelnden kommensalen Keimen sein.[74]

Eine während der Schwangerschaft und Neonatalperiode funktionell sehr relevante myeloide Zellpopulation sind MDSC. MDSC vermitteln über immunsuppressive Eigenschaften während der Schwangerschaft eine Immuntoleranz zwischen Mutter und Fetus und tragen postnatal zur Inflammationskontrolle beim Neugeborenen bei. [75] MDSC lassen sich in zwei Subtypen unterteilen – granulozytäre MDSC oder GR-

MDSC und monozytäre MDSC oder MO-MDSC – von welchen insbesondere GR-MDSC für die Immunregulation in der Perinatalzeit eine Rolle zu spielen scheinen.[76-78]

Unsere Analysen zeigten einen erhöhten Anteil von GR-MDSC an P1, P7 und P14 bei mit Probiotika behandelten Jungtieren im Vergleich zur Kontrolle, während MO-MDSC nicht eindeutig verändert waren. Auch hier kann spekuliert werden, dass erhöhte intestinale GR-MDSC-Zahlen nach der Geburt dazu beitragen, dass eine Toleranz gegenüber dem sich etablierenden Mikrobiom gewährleistet ist. Diese Überlegungen werden durch parallele Arbeiten unserer Gruppe unterstützt, die zeigten, dass neugeborene Mäuse mit genetisch bedingter verminderter MDSC-Akkumulation (durch knockout des Transkriptionsfaktors HIF-1- $\alpha$  in der myeloiden Zellreihe) eine veränderte Mikrobiomzusammensetzung und eine veränderte Immunaktivierung im Darm aufwiesen (in Revision).

Bei den lymphatischen Zellen beobachteten wir nach Probiotikatherapie erhöhte Level an T-Zellen vor allem zum Zeitpunkt des Weanings sowie erhöhte Level an T-Helfer-Zellen unmittelbar nach Geburt. Ähnliche Beobachtungen machten Moreno de le Blanc et al. [74] während beispielsweise Galdeano et al. keine Vermehrung von T-Zellen nach Lactobacillus-Supplementation feststellten.[79] Eindeutig geht jedoch aus der Literatur hervor, dass verschiedene Probiotikastämme sowohl *in vitro* als auch *in vivo* regulatorische T-Zellen induzieren können, die eine zentrale Rolle beim Schutz vor überschießenden Inflammationsprozessen und der Vorbeugung allergischer Erkrankungen spielen.[47, 80-82] Auch Ekmekci et al. stellten fest, dass infolge einer 8-wöchigen Breitspektrum-Antibiotikatherapie nach Rekolonisierung durch Probiotika systemisch und organbezogen Populationen an regulatorischen T-Zellen und T-Gedächtniszellen wiederhergestellt werden konnten.[83] Leider existieren aus unseren Versuchen keine Ergebnisse zum Vorhandensein von regulatorischen T-Zellen im Darm der Jungtiere.

Im Gegensatz zu den T-Zellen beobachteten wir einen verminderten Anteil an B-Zellen zum Zeitpunkt des Weanings nach Probiotikasupplementation. Diese Erkenntnis lässt sich nur schwer in einen Zusammenhang mit der Literatur bringen. Eine Gabe des probiotischen Stammes *L. casei* führte im Gegensatz zu unseren Ergebnissen bei

neugeborenen Mäusen zu einer Induktion von IgA-produzierenden B-Zellen, die eine wichtige Rolle in der mukosalen Abwehr übernehmen, da IgA-Antikörper fremde Antigene der Darmmukosa oder intraepithelialer Zellen neutralisieren können und zudem eine Migration von Immunzellen in anderes mukosales Gewebe herbeiführen.[74]

Da wir keine funktionellen Untersuchungen der B-Zellen in unseren Jungtieren durchführten, können wir hinsichtlich dieses Aspektes keine Aussage treffen. Auch ist an dieser Stelle wichtig zu erwähnen, dass es sich bei den von uns gemessenen Zellmengen um keine absoluten, sondern um relative Mengen handelt, sodass klar ist, dass es bei Vermehrung einer Population (wie hier zb. den T-Zellen) zu einer Verminderung anderer Populationen kommen muss. Eine detailliertere phänotypische Analyse und insbesondere funktionelle Untersuchungen von intestinalen Immunzellen nach oraler Probiotika-Therapie ist daher dringend notwendig.

Ähnlich wie bei den myeloiden Zellen waren NK-Zellen unter Probiotikatherapie direkt nach Geburt anteilig vermehrt und zum Zeitpunkt des Absetzens vermindert. Da NK-Zellen dem angeborenen Immunsystem zugeordnet werden, kann hier wie für die myeloiden Zellpopulationen diskutiert, vermutet werden, dass Probiotika zu einem Zeitpunkt, zu dem das adaptive Immunsystem noch nicht ausgebildet ist, zu einer Unterstützung der angeborenen Immunantwort beitragen und später, nach erster Reifung der adaptiven Immunität, eine unspezifische Reaktion durch angeborene Immunzellen vermindern.

Eine Limitation unserer *in vivo*-Versuche ist, dass durch den Verdau mit dem Enzym Liberase die Expression bestimmter Oberflächenmarker, wie in unserem Fall CD8 verändert wird und damit nicht mehr adäquat beurteilt werden konnte.

Eine weitere Limitation ist, dass der Effekt der hier durchgeführten Probiotikatherapie auf das Mikrobiom der Jungtiere bisher nicht untersucht wurde. Dahingehende Analysen sind zum Zeitpunkt des Verfassens dieser Dissertationsschrift noch ausstehend.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in unseren Versuchen Probiotika unmittelbar nach Geburt eine Induktion insbesondere angeborener Immunzellen bewirkten, was sich möglicherweise protektiv auf die Abwehr pathogener Erreger durch das noch unreife Immunsystem auswirkt. Zum Zeitpunkt des Weanings nach begonnener Ausreifung der

adaptiven Immunität kam es eher zu einer Hemmung der Akkumulation angeborener Immunzellen und es kann vermutet werden, dass dies nun eine unspezifische Abwehr neuer Kommensale reduziert und so eine optimale, diverse Entwicklung des Mikrobioms in dieser Zeit unterstützen könnte.

Die Ergebnisse unserer *in-vivo* Untersuchungen tragen dazu bei, die Wirkung von Probiotika auf das neonatale intestinale Immunsystem besser zu verstehen. Detailliertere phänotypische und vor allem funktionelle Untersuchungen sind notwendig, um genaueren Aufschluss über die Mechanismen der protektiven Wirkung von Probiotika und deren Interaktion mit dem Immunsystem zu erhalten.

## 5. Zusammenfassung

### Hintergrund und Hypothese:

Frühgeburtlichkeit gilt als Hauptursache für perinatale Morbidität und Mortalität. Zu den wichtigsten Komplikationen der Frühgeburtlichkeit gehören die neonatale Sepsis, die nekrotisierende Enterokolitis, die Bronchopulmonale Dysplasie und neurologische Störungen.

Das Mikrobiom, die Gesamtheit aller den menschlichen Körper besiedelnden Mikroorganismen, spielt eine kritische Rolle für Gesundheit und Krankheit. Veränderungen des intestinalen Mikrobioms im Sinne einer Fehlbesiedlung oder „Dysbiose“ sind mit vielen Erkrankungen im Kindes- und Erwachsenenalter, darunter allergischen Erkrankungen, kardiovaskulären Erkrankungen, neurodegenerativen Erkrankungen und Tumorerkrankungen assoziiert. In der Neonatalperiode beeinflusst das Mikrobiom unter anderem auch die Entwicklung des Immunsystems.

Die orale Verabreichung von Probiotika hat in der Neonatologie insbesondere in der Prävention der nekrotisierenden Enterokolitis schon deutliche Erfolge erzielt. Die genauen Mechanismen, über die Probiotika ihre protektive Wirkung ausüben, sind bisher nur unvollständig verstanden.

Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen, welche Wirkungen Probiotika *in vitro* auf neonatale Immunzellen haben und inwiefern sich eine frühe, orale Probiotikatherapie *in vivo* auf die intestinale Immunzellkomposition neugeborener Mäuse auswirkt.

### Methoden:

In einem *in vitro*-Modell wurden Nabelschnurblut-Immunzellen (CBMC) mit den Probiotika *L. rhamnosus*, *L. acidophilus* und *B. bifidum* stimuliert und anschließend auf die Expression von Oberflächenmarkern, Zytokinen und auf die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) mittels Durchflusszytometrie (FACS) untersucht.

In einem *in vivo*-Modell wurden Wildtyp-Mäuse beginnend in der Mitte der Schwangerschaft und weiter während der Säugezeit oral mit Probiotika (*L. acidophilus* und *B. bifidum*) behandelt. Die Jungtiere wurden ab ca. Tag 14 ebenfalls behandelt. Die

neugeborenen Mäuse wurden zu verschiedenen Zeitpunkten getötet und der Darm wurde durchflusszytometrisch auf verschiedene Immunzellpopulationen untersucht.

### Ergebnisse und Schlussfolgerung

*In vitro* bewirkte eine Stimulation von CBMC mit den Probiotika *L. rhamnosus* und *L. acidophilus* eine Hochregulation monozytärer Aktivierungsmarker und monozytärer Zytokine im Sinne eines proinflammatorischen Phänotyps. Die Kombination von *L. acidophilus* und *B. bifidum* erzeugte ähnliche, aber schwächere Effekte auf die Zytokinproduktion während *B. bifidum* nur sehr schwache Effekte hatte. Auf die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies hatte nur *L. rhamnosus* einen signifikanten induzierenden Effekt. Unsere Ergebnisse lassen Rückschlüsse auf eine verbesserte Abwehrfunktion neonataler Monozyten nach Probiotikastimulation und damit einen günstigen Effekt auf die neonatale Immunantwort schließen.

*In vivo* zeigte eine frühe perinatale Probiotikatherapie hauptsächlich zum Zeitpunkt unmittelbar nach Geburt und zum Zeitpunkt des Absetzens (Weaning) einen modulierenden Einfluss auf verschiedene Immunzellpopulationen im Darm neugeborener Mäuse. Ein vermehrtes Vorhandensein von Zellen der angeborenen Immunität wie Neutrophilen, Makrophagen und NK-Zellen unmittelbar nach der Geburt deuten ähnlich wie die *in vitro*-Versuche darauf hin, dass Probiotika angeborene Abwehrfunktionen stärken zu einem Zeitpunkt, zu dem die adaptive Immunität noch nicht ausgereift ist. Zum Zeitpunkt des Weanings beobachteten wir ein vermehrtes Vorhandensein von T-Zellen aber verminderte Mengen der obengenannten angeborenen Immunzellen, was darauf hindeuten könnte, dass Probiotika die Ausreifung der intestinalen adaptiven Immunität unterstützen und dann unspezifische angeborene Immunantworten hemmen. Weitergehende detailliertere Untersuchungen zum Effekt von Probiotika auf neonatale Immunzellen sind notwendig, um deren Wirkmechanismus besser zu verstehen und Probiotika noch gezielter anwenden zu können.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Lee, A.C., H. Blencowe, and J.E. Lawn, *Small babies, big numbers: global estimates of preterm birth*. Lancet Glob Health, 2019. **7**(1): p. e2-e3.
2. Goldenberg, R.L., J.C. Hauth, and W.W. Andrews, *Intrauterine infection and preterm delivery*. N Engl J Med, 2000. **342**(20): p. 1500-7.
3. Han, C.S., F. Schatz, and C.J. Lockwood, *Abruption-associated prematurity*. Clin Perinatol, 2011. **38**(3): p. 407-21.
4. Son, M. and E.S. Miller, *Predicting preterm birth: Cervical length and fetal fibronectin*. Semin Perinatol, 2017. **41**(8): p. 445-451.
5. Jiang, M., et al., *A case control study of risk factors and neonatal outcomes of preterm birth*. Taiwan J Obstet Gynecol, 2018. **57**(6): p. 814-818.
6. Odabasi, I.O. and A. Bulbul, *Neonatal Sepsis*. Sisli Etfal Hastan Tip Bul, 2020. **54**(2): p. 142-158.
7. Patra, A., et al., *Neurological consequences of systemic inflammation in the premature neonate*. Neural Regen Res, 2017. **12**(6): p. 890-896.
8. Xiong, T., et al., *An Overview of Systematic Reviews of Randomized-Controlled Trials for Preventing Necrotizing Enterocolitis in Preterm Infants*. Neonatology, 2020. **117**(1): p. 46-56.
9. Collins, J.J.P., et al., *The Future of Bronchopulmonary Dysplasia: Emerging Pathophysiological Concepts and Potential New Avenues of Treatment*. Front Med (Lausanne), 2017. **4**: p. 61.
10. Shahzad, T., et al., *Pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia: when inflammation meets organ development*. Mol Cell Pediatr, 2016. **3**(1): p. 23.
11. Wagner, B.D., et al., *Airway Microbial Community Turnover Differs by BPD Severity in Ventilated Preterm Infants*. PLoS One, 2017. **12**(1): p. e0170120.
12. Malleske, D.T., O. Chorna, and N.L. Maitre, *Pulmonary sequelae and functional limitations in children and adults with bronchopulmonary dysplasia*. Paediatr Respir Rev, 2018. **26**: p. 55-59.
13. Niedermaier, S. and A. Hilgendorff, *Bronchopulmonary dysplasia - an overview about pathophysiologic concepts*. Mol Cell Pediatr, 2015. **2**(1): p. 2.
14. Berg, G., et al., *Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges*. Microbiome, 2020. **8**(1): p. 103.
15. Costello, E.K., et al., *Bacterial community variation in human body habitats across space and time*. Science, 2009. **326**(5960): p. 1694-7.
16. Ursell, L.K., et al., *The interpersonal and intrapersonal diversity of human-associated microbiota in key body sites*. J Allergy Clin Immunol, 2012. **129**(5): p. 1204-8.
17. Ihekweazu, F.D. and J. Versalovic, *Development of the Pediatric Gut Microbiome: Impact on Health and Disease*. Am J Med Sci, 2018. **356**(5): p. 413-423.
18. Dominguez-Bello, M.G., et al., *Role of the microbiome in human development*. Gut, 2019. **68**(6): p. 1108-1114.
19. Yao, Y., et al., *The Role of Microbiota in Infant Health: From Early Life to Adulthood*. Front Immunol, 2021. **12**: p. 708472.

20. Ronan, V., R. Yeasin, and E.C. Claud, *Childhood Development and the Microbiome-The Intestinal Microbiota in Maintenance of Health and Development of Disease During Childhood Development*. *Gastroenterology*, 2021. **160**(2): p. 495-506.
21. Wang, L., et al., *Gut Microbial Dysbiosis in the Irritable Bowel Syndrome: A Systematic Review and Meta-Analysis of Case-Control Studies*. *J Acad Nutr Diet*, 2020. **120**(4): p. 565-586.
22. Illiano, P., R. Brambilla, and C. Parolini, *The mutual interplay of gut microbiota, diet and human disease*. *Febs j*, 2020. **287**(5): p. 833-855.
23. Sarkar, A., et al., *The Association between Early-Life Gut Microbiota and Long-Term Health and Diseases*. *J Clin Med*, 2021. **10**(3).
24. Tsafaras, G.P., P. Ntontsi, and G. Xanthou, *Advantages and Limitations of the Neonatal Immune System*. *Front Pediatr*, 2020. **8**: p. 5.
25. Yu, J.C., et al., *Innate Immunity of Neonates and Infants*. *Front Immunol*, 2018. **9**: p. 1759.
26. Gensollen, T., et al., *How colonization by microbiota in early life shapes the immune system*. *Science*, 2016. **352**(6285): p. 539-44.
27. Beura, L.K., et al., *Normalizing the environment recapitulates adult human immune traits in laboratory mice*. *Nature*, 2016. **532**(7600): p. 512-6.
28. Smith, P.M., et al., *The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis*. *Science*, 2013. **341**(6145): p. 569-73.
29. Frei, R., M. Akdis, and L. O'Mahony, *Prebiotics, probiotics, synbiotics, and the immune system: experimental data and clinical evidence*. *Curr Opin Gastroenterol*, 2015. **31**(2): p. 153-8.
30. Boirivant, M. and W. Strober, *The mechanism of action of probiotics*. *Curr Opin Gastroenterol*, 2007. **23**(6): p. 679-92.
31. Bermudez-Brito, M., et al., *Probiotic mechanisms of action*. *Ann Nutr Metab*, 2012. **61**(2): p. 160-74.
32. Plaza-Diaz, J., et al., *Modulation of immunity and inflammatory gene expression in the gut, in inflammatory diseases of the gut and in the liver by probiotics*. *World J Gastroenterol*, 2014. **20**(42): p. 15632-49.
33. Zhang, C.X., H.Y. Wang, and T.X. Chen, *Interactions between Intestinal Microflora/Probiotics and the Immune System*. *Biomed Res Int*, 2019. **2019**: p. 6764919.
34. van den Akker, C. H. P., et al., *Probiotics for Preterm Infants: A Strain-Specific Systematic Review and Network Meta-analysis*. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2018.**67**(1): p. 103-122.
35. van den Akker, C. H. P., et al., *Probiotics and Preterm Infants: A Position Paper by the European Society for Paediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition Committee on Nutrition and the European Society for Paediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition Working Group for Probiotics and Prebiotics*. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2020.**70**(5): p. 664-680.
36. Rückle, X., et al., *Different probiotic strains alter human cord blood monocyte responses*. *Pediatr Res*, 2022.
37. Yuan, X., et al., *Novel Therapeutic Targeting of CCL3-CCR4 Axis Mediated Apoptotic Intestinal Injury in Necrotizing Enterocolitis*. *Front Immunol*, 2022. **13**: p. 859398.

38. Markasz, L., et al., *CD44 and RHAMM expression patterns in the human developing lung*. *Pediatr Res*, 2021. **89**(1): p. 134-142.
39. Garantziotis, S. and R.C. Savani, *Hyaluronan biology: A complex balancing act of structure, function, location and context*. *Matrix Biol*, 2019. **78-79**: p. 1-10.
40. Zasada, M., et al., *Analysis of PD-1 expression in the monocyte subsets from non-septic and septic preterm neonates*. *PLoS One*, 2017. **12**(10): p. e0186819.
41. Lukácsi, S., et al., *The role of CR3 (CD11b/CD18) and CR4 (CD11c/CD18) in complement-mediated phagocytosis and podosome formation by human phagocytes*. *Immunol Lett*, 2017. **189**: p. 64-72.
42. Rocha-Ramírez, L.M., et al., *Impact of Heat-Killed Lactobacillus casei Strain IMAU60214 on the Immune Function of Macrophages in Malnourished Children*. *Nutrients*, 2020. **12**(8).
43. Jeong, M., et al., *Heat-Killed Lactobacillus plantarum KCTC 13314BP Enhances Phagocytic Activity and Immunomodulatory Effects Via Activation of MAPK and STAT3 Pathways*. *J Microbiol Biotechnol*, 2019. **29**(8): p. 1248-1254.
44. Marranzino, G., et al., *Stimulation of macrophages by immunobiotic Lactobacillus strains: influence beyond the intestinal tract*. *Microbiol Immunol*, 2012. **56**(11): p. 771-81.
45. Han, S.K., et al., *Lactobacillus rhamnosus HDB1258 modulates gut microbiota-mediated immune response in mice with or without lipopolysaccharide-induced systemic inflammation*. *BMC Microbiol*, 2021. **21**(1): p. 146.
46. Vale, G.C., et al., *Effect of Probiotics Lactobacillus acidophilus and Lactocaseibacillus rhamnosus on Antibacterial Response Gene Transcription of Human Peripheral Monocytes*. *Probiotics Antimicrob Proteins*, 2021.
47. Vieira, A.T., et al., *Control of Klebsiella pneumoniae pulmonary infection and immunomodulation by oral treatment with the commensal probiotic Bifidobacterium longum 5(1A)*. *Microbes Infect*, 2016. **18**(3): p. 180-9.
48. Drakes, M., T. Blanchard, and S. Czinn, *Bacterial probiotic modulation of dendritic cells*. *Infect Immun*, 2004. **72**(6): p. 3299-309.
49. Christensen, H.R., H. Frøkiaer, and J.J. Pestka, *Lactobacilli differentially modulate expression of cytokines and maturation surface markers in murine dendritic cells*. *J Immunol*, 2002. **168**(1): p. 171-8.
50. Dong, H., I. Rowland, and P. Yaqoob, *Comparative effects of six probiotic strains on immune function in vitro*. *Br J Nutr*, 2012. **108**(3): p. 459-70.
51. Flinterman, A.E., et al., *Probiotics have a different immunomodulatory potential in vitro versus ex vivo upon oral administration in children with food allergy*. *Int Arch Allergy Immunol*, 2007. **143**(3): p. 237-44.
52. Helwig, U., et al., *Lactobacilli, bifidobacteria and E. coli nissle induce pro- and anti-inflammatory cytokines in peripheral blood mononuclear cells*. *World J Gastroenterol*, 2006. **12**(37): p. 5978-86.
53. Fang, S.B., et al., *Live and heat-killed Lactobacillus rhamnosus GG upregulate gene expression of pro-inflammatory cytokines in 5-fluorouracil-pretreated Caco-2 cells*. *Support Care Cancer*, 2014. **22**(6): p. 1647-54.
54. Tatad, A.M., et al., *Cytokine expression in response to bacterial antigens in preterm and term infant cord blood monocytes*. *Neonatology*, 2008. **94**(1): p. 8-15.

55. Hart, A.L., et al., *Modulation of human dendritic cell phenotype and function by probiotic bacteria*. Gut, 2004. **53**(11): p. 1602-9.
56. Lan, H., et al., *Oral administration of Lactobacillus plantarum CQPC11 attenuated the airway inflammation in an ovalbumin (OVA)-induced Balb/c mouse model of asthma*. J Food Biochem, 2022. **46**(2): p. e14036.
57. Tsui, K.C., et al., *Lactobacillus rhamnosus GG as dietary supplement improved survival from lipopolysaccharides-induced sepsis in mice*. Food Sci Nutr, 2021. **9**(12): p. 6786-6793.
58. Noureen, S., et al., *In vitro selection and in vivo confirmation of the antioxidant ability of Lactobacillus brevis MG000874*. J Appl Microbiol, 2019. **126**(4): p. 1221-1232.
59. Tomusiak-Plebanek, A., et al., *Lactobacilli with superoxide dismutase-like or catalase activity are more effective in alleviating inflammation in an inflammatory bowel disease mouse model*. Drug Des Devel Ther, 2018. **12**: p. 3221-3233.
60. Averina, O.V., et al., *Biomarkers and Utility of the Antioxidant Potential of Probiotic Lactobacilli and Bifidobacteria as Representatives of the Human Gut Microbiota*. Biomedicines, 2021. **9**(10).
61. Lee, N., et al., *Lysed and disrupted Bifidobacterium bifidum BGN4 cells promote anti-inflammatory activities in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells*. Saudi J Biol Sci, 2021. **28**(9): p. 5115-5118.
62. Shang, J., et al., *Potential Immunomodulatory Activity of a Selected Strain Bifidobacterium bifidum H3-R2 as Evidenced in vitro and in Immunosuppressed Mice*. Front Microbiol, 2020. **11**: p. 2089.
63. An, H., et al., *Coexpression of the superoxide dismutase and the catalase provides remarkable oxidative stress resistance in Lactobacillus rhamnosus*. J Agric Food Chem, 2011. **59**(8): p. 3851-6.
64. Kang, S., et al., *A recombinant Bifidobacterium bifidum BGN4 strain expressing the streptococcal superoxide dismutase gene ameliorates inflammatory bowel disease*. Microb Cell Fact, 2022. **21**(1): p. 113.
65. López, P., et al., *Distinct Bifidobacterium strains drive different immune responses in vitro*. Int J Food Microbiol, 2010. **138**(1-2): p. 157-65.
66. Medina, M., et al., *Differential immunomodulatory properties of Bifidobacterium logum strains: relevance to probiotic selection and clinical applications*. Clin Exp Immunol, 2007. **150**(3): p. 531-8.
67. Al Nabhani, Z., et al., *A Weaning Reaction to Microbiota Is Required for Resistance to Immunopathologies in the Adult*. Immunity, 2019. **50**(5): p. 1276-1288.e5.
68. Al Nabhani, Z. and G. Eberl, *Imprinting of the immune system by the microbiota early in life*. Mucosal Immunol, 2020. **13**(2): p. 183-189.
69. Adkins, B., C. Leclerc, and S. Marshall-Clarke, *Neonatal adaptive immunity comes of age*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(7): p. 553-64.
70. Fries, P.N., et al., *Age-related changes in the distribution and frequency of myeloid and T cell populations in the small intestine of calves*. Cell Immunol, 2011. **271**(2): p. 428-37.
71. Eberl, G., *The microbiota, a necessary element of immunity*. C R Biol, 2018. **341**(5): p. 281-283.

72. Banchereau, J., et al., *Immunobiology of dendritic cells*. *Annu Rev Immunol*, 2000. **18**: p. 767-811.
73. Steinman, R.M., D. Hawiger, and M.C. Nussenzweig, *Tolerogenic dendritic cells*. *Annu Rev Immunol*, 2003. **21**: p. 685-711.
74. de Moreno de LeBlanc, A., et al., *Effect of the administration of a fermented milk containing Lactobacillus casei DN-114001 on intestinal microbiota and gut associated immune cells of nursing mice and after weaning until immune maturity*. *BMC Immunol*, 2008. **9**: p. 27.
75. Köstlin-Gille, N. and C. Gille., *Myeloid-Derived Suppressor Cells in Pregnancy and the Neonatal Period*. *Front Immunol*, 2020. **11**: p. 584712.
76. Rieber, N., et al., *Neutrophilic myeloid-derived suppressor cells in cord blood modulate innate and adaptive immune responses*. *Clin Exp Immunol*, 2013. **174**(1): p. 45-52.
77. Leiber, A., et al., *Neonatal myeloid derived suppressor cells show reduced apoptosis and immunosuppressive activity upon infection with Escherichia coli*. *Eur J Immunol*, 2017. **47**(6): p. 1009-1021.
78. Köstlin, N., et al., *Granulocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells (GR-MDSC) in Breast Milk (BM); GR-MDSC Accumulate in Human BM and Modulate T-Cell and Monocyte Function*. *Front Immunol*, 2018. **9**: p. 1098.
79. Galdeano, C.M. and G. Perdigón, *The probiotic bacterium Lactobacillus casei induces activation of the gut mucosal immune system through innate immunity*. *Clin Vaccine Immunol*, 2006. **13**(2): p. 219-26.
80. Vareille-Delarbre, M., et al., *Immunomodulatory Effects of Lactobacillus plantarum on Inflammatory Response Induced by Klebsiella pneumoniae*. *Infect Immun*, 2019. **87**(11).
81. Cristofori, F., et al., *Anti-Inflammatory and Immunomodulatory Effects of Probiotics in Gut Inflammation: A Door to the Body*. *Front Immunol*, 2021. **12**: p. 578386.
82. Lyons, A., et al., *Bacterial strain-specific induction of Foxp3+ T regulatory cells is protective in murine allergy models*. *Clin Exp Allergy*, 2010. **40**(5): p. 811-9.
83. Ekmekciu, I., et al., *The Probiotic Compound VSL#3 Modulates Mucosal, Peripheral, and Systemic Immunity Following Murine Broad-Spectrum Antibiotic Treatment*. *Front Cell Infect Microbiol*, 2017. **7**: p. 167.

## 7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Dichtegradzentrifugation nach Boyum .....	14
Abbildung 2: Titrationskurven der Verdünnungsreihe von <i>L. rhamnosus</i> (A), <i>L. acidophilus</i> (B) und <i>B. bifidum</i> (C).....	15
Abbildung 3: Darstellung der Gatingstrategie von Monozyten aus CBMC im FACS...18	
Abbildung 4: Gewichtszunahme der Versuchstiere nach Verpaarung.....20	
Abbildung 5: Die Antigenexpression von CD11b, CD18, CD86, TLR2 und TLR4 auf Monozyten steigt nach Stimulation mit <i>L. rhamnosus</i> .....24	
Abbildung 6: Erhöhte Antigenexpression von Oberflächenmarkern auf neonatalen Monozyten nach Stimulation mit <i>L. rhamnosus</i> .....25	
Abbildung 7: Phänotyp von neonatalen T-Zellen nach Stimulation mit <i>L. rhamnosus</i> ..27	
Abbildung 8: Erhöhte Zytokinexpression von neonatalen Monozyten nach Stimulation mit <i>L. rhamnosus</i> .....29	
Abbildung 9: Erhöhte Zytokinexpression von neonatalen Monozyten nach gleichzeitiger Stimulation mit <i>L. rhamnosus</i> und LPS.....31	
Abbildung 10: Vermehrte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies durch neonatale Monozyten nach Stimulation mit <i>L. rhamnosus</i> .....32	
Abbildung 11: Erhöhte Zytokinexpression von neonatalen Monozyten nach Stimulation mit <i>L. acidophilus</i> .....34	
Abbildung 12: Nur leicht erhöhte Zytokinexpression von neonatalen Monozyten nach Stimulation mit <i>B. bifidum</i> .....36	
Abbildung 13: Erhöhte Zytokinexpression von neonatalen Monozyten nach Stimulation mit <i>L. acidophilus</i> und <i>B. bifidum</i> .....38	
Abbildung 14: Keine erhöhte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies durch neonatale Monozyten nach Stimulation mit <i>L. acidophilus</i> , <i>B. bifidum</i> und der Kombination aus <i>L. acidophilus</i> und <i>B. bifidum</i> .....39	
Abbildung 15: Veränderungen in der Komposition myeloider Zellpopulationen im Darm von neugeborenen Mäusen nach perinataler Probiotikagabe.....41	
Abbildung 16: Erhöhter Anteil von GR-MDSC im Darm neugeborener Mäuse nach perinataler Probiotikagabe.....42	

## 8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Liste Materialien biologischen Ursprungs .....	7
Tabelle 2: Liste Materialien nicht biologischen Ursprungs.....	8
Tabelle 3: Liste der verwendeten Antikörper.....	9
Tabelle 4: Liste der Puffer und Kulturmedien.....	11
Tabelle 5: Liste der Glas- und Plastikmaterialien.....	12
Tabelle 6: Geräte und Software.....	12
Tabelle 7: Antigenexpression von nicht stimulierten und mit <i>L. rhamnosus</i> stimulierten Monozyten.....	23
Tabelle 8: Antigenexpression von nicht stimulierten und mit <i>L. rhamnosus</i> stimulierten T-Zellen.....	26
Tabelle 9: Zytokinexpression von nicht stimulierten und mit <i>L. rhamnosus</i> stimulierten Monozyten.....	28
Tabelle 10: Zytokinexpression von mit LPS stimulierten und mit LPS+ <i>L. rhamnosus</i> stimulierten Monozyten.....	30
Tabelle 11: Zytokinexpression von unstimulierten und mit <i>L. acidophilus</i> stimulierten Monozyten.....	33
Tabelle 12: Zytokinexpression von unstimulierten und mit <i>B. bifidum</i> stimulierten Monozyten.....	35
Tabelle 13: Zytokinexpression von unstimulierten und mit <i>L. acidophilus</i> + <i>B. bifidum</i> stimulierten Monozyten.....	37

## 9. Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Universitätsklinik für Kinderheilkunde und Jugendmedizin Tübingen in der Abteilung Kinderheilkunde IV Neonatologie unter Betreuung von Frau PD Dr. Natascha Köstlin-Gille durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau PD Dr. Natascha Köstlin-Gille, Frau Jessica Rühle und Herr Dr. med. Julian Schwarz.

Sämtliche *in vitro*-Versuche wurden (nach Einarbeitung durch Labormitglieder Jessica Rühle und Dr. Stefanie Dietz) von mir eigenständig durchgeführt. Sämtliche *in vivo*-Versuche wurden in Zusammenarbeit mit Jessica Rühle durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Anleitung durch PD Dr. Natascha Köstlin-Gille durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig nach Anleitung durch Frau PD Dr. Natascha Köstlin-Gille verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Unterschrift

## 10. Veröffentlichungen

Publizierter Artikel im Rahmen dieser Dissertation:

Rückle, X., Rühle, J., Judd, L., Hebel, J., Dietz, S., Poets, C. F., Gille, C., & Köstlin Gille, N. (2022). Different probiotic strains alter human cord blood monocyte responses. *Pediatric Research*. doi:10.1038/s41390-022-02400-5

## 11. Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei meiner Doktormutter Frau PD Dr. Natascha Köstlin-Gille für die so wertvolle und beständig verfügbare Unterstützung und Zusammenarbeit, ohne die mir diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. In diesem Zusammenhang half mir neben fachlichen und strategischen Ratschlägen auch die Unterstützung auf persönlicher Ebene, die in mir immer wieder neue Motivation und Begeisterung für die weiteren Schritte entfachte.

Außerdem gilt ein großer Dank Jessica Rühle, die mich hervorragend in die Laborarbeit eingearbeitet hat und mir in einer Vielzahl von Versuchen eine wunderbare Anleiterin und Versuchspartnerin war. Ebenso möchte ich mich bei dem gesamten Labor der Neonatologie, insbesondere bei Stefanie Dietz, Bärbel Spring, Julian Schwarz, Marco Ginzler und Kai Liu, für die schöne, integrierende Atmosphäre, die konstruktiven fachlichen Diskussionen und die Hilfsbereitschaft bedanken.

Ich bedanke mich bei dem Interdisziplinären Zentrum für Klinische Forschung (IZKF) für die Aufnahme in das Promotionskolleg, das mir regelmäßig neue Anregungen über den Austausch mit den anderen Doktoranden gab und stets eine großartige Beratung für gutes wissenschaftliches Arbeiten und Schreiben zur Verfügung stellte.

Des Weiteren möchte ich mich bei den Mitarbeitern der Geburtshilfe für die Bereitstellung von Nabelschnurblut bedanken.

Zuletzt gilt ein großer Dank meiner Familie und meinen Freunden, die mich während meines Studiums und so auch während meiner Promotion immer unterstützt und motiviert haben.