

Aus der
Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen
Abteilung Kinderheilkunde IV
(Schwerpunkt: Neonatologie, neonatologische Intensivmedizin)

**Immun-Mikrobiom-Interaktion während der Schwangerschaft
Die Rolle von bakteriellen extrazellulären Vesikeln und der
Einfluss einer antibiotikainduzierten Dysbiose**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Kewitz, Samantha**

2025

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

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

2. Berichterstatter: Professor Dr. D. Sauter

Tag der Disputation: 21.10.2025

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	7
Abbildungsverzeichnis	9
Tabellenverzeichnis	10
1 Einleitung	11
1.1 Das Immunsystem während der Schwangerschaft.....	11
1.1.1 Immunologische Anpassungen in der gesunden Schwangerschaft 11	
1.1.2 Präeklampsie	12
1.1.3 Rezidivierende Spontanaborte	13
1.2 Das intestinale Mikrobiom in der Schwangerschaft	13
1.3 Immunregulation durch das intestinale Mikrobiom.....	14
1.3.1 Dysbiose und Inflammation	14
1.3.2 Bakterielle extrazelluläre Vesikel	15
1.4 Ziel dieser Arbeit	16
2 Material und Methoden	17
2.1 Material	17
2.1.1 Antikörper	17
2.1.2 Chemikalien und Reagenzien.....	18
2.1.3 Kits.....	20
2.1.4 Kulturmedien, Puffer und Gele	20
2.1.5 Primer-Sequenzen für qPCR.....	21
2.1.6 Geräte.....	22
2.1.7 Software.....	22
2.2 Humane Proben.....	23

2.3	Versuchstiere	24
2.4	Isolation und Charakterisierung von BEVs aus dem Stuhl	25
2.4.1	Separation von BEVs aus Stuhlproben	25
2.4.2	Lyse der BEVs	26
2.4.3	Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA-Assay	26
2.4.4	Nanoparticle Tracking Analyse der BEVs	26
2.4.5	Visualisierung der BEVs mittels Elektronenmikroskopie	27
2.4.6	Charakterisierung der BEVs mittels ELISA	27
2.4.7	Charakterisierung der BEVs mittels Western Blot	27
2.4.8	qPCR der BEVs	28
2.5	<i>In vitro</i> Kulturmodell mit BEVs und Immunzellen	29
2.5.1	Isolation von mononukleären Zellen aus peripherem Blut	29
2.5.2	Kultur von PBMCs mit BEVs	29
2.5.3	Durchflusszytometrische Analyse von humanen T-Helferzellen..	29
2.5.4	CFSE-Färbung von BEVs für die Durchflusszytometrie	30
2.5.5	Färbung von T-Zellen für die Fluoreszenzmikroskopie	31
2.6	<i>In vivo</i> Modell zu Dysbiose und Trächtigkeit	31
2.6.1	Versuchsaufbau des <i>in vivo</i> Modells	31
2.6.2	Bestimmung der Embryonen-Resorptionsrate	32
2.6.3	Aufreinigung von Einzelzellsuspensionen aus Organen der Maus 32	
2.6.4	Durchflusszytometrie muriner Immunzellen	33
2.6.5	Statistische Analyse	35
3	Ergebnisse	36
3.1	Etablierung eines Protokolls zur BEV-Separation aus Stuhl	36
3.2	Charakterisierung der BEVs	38

3.3	Untersuchung der Interaktion von BEVs mit T-Zellen.....	39
3.4	Komposition von T-Helferzellen nach Stimulation mit BEVs aus Stuhl Schwangerer und nicht-schwangerer Kontrollen	40
3.5	Mikrobielle Zusammensetzung von BEVs aus Stuhl Schwangerer	41
3.6	Komposition von T-Helferzellen nach Stimulation mit BEVs aus Stuhl von RSA-Patientinnen	42
3.7	Mikrobielle Zusammensetzung von BEVs aus dem Stuhl von RSA- Patientinnen.....	43
3.8	Komposition von T-Helferzellen nach Stimulation mit BEVs aus Stuhl von Schwangeren mit PE	44
3.9	Mikrobielle Zusammensetzung von BEVs aus dem Stuhl von Schwangeren mit PE	45
3.10	Mikrobielle Zusammensetzung muriner Kotproben nach Antibiotika- Therapie.....	46
3.11	Eine Antibiotika-Behandlung führt zu keiner erhöhten Abortrate bei Mäusen	46
3.12	Eine Antibiotika-Behandlung führt zu einer veränderten Immunzellkomposition bei trächtigen Mäusen.....	47
3.12.1	Eine Antibiotika-Behandlung führt zu einer Expansion myeloider Zellpopulationen.....	48
3.12.2	Eine Antibiotika-Behandlung führt zu Veränderungen im Vorkommen von ILC	50
3.12.3	Leichte Veränderungen im Vorkommen von B- und T-Zellen nach Antibiotika-Behandlung	51
4	Diskussion	53
4.1	Isolation und Charakterisierung von BEVs aus Stuhl	53
4.2	Etablierung eines <i>in vitro</i> Modells zur Untersuchung der Interaktion von BEVs und T-Helferzellen	55

4.3	BEVs Schwangerer modulieren die T-Helferzellkomposition minimal im Vergleich zu Kontroll-BEVs.....	57
4.4	BEVs von RSA-Patientinnen zeigen anderen bakteriellen Ursprung als Kontroll-Probandinnen ohne veränderte Effekte auf T-Helferzellen	59
4.5	BEVs von Schwangeren mit Präeklampsie führen nicht zu veränderter T-Helferzellmodulation	60
4.6	Eine Antibiotika-Behandlung führt zu keiner erhöhten Abortrate	61
4.7	Eine Antibiotika-Behandlung führt zu einer veränderten immunologischen Anpassung an die Schwangerschaft	62
5	Zusammenfassung.....	66
6	Literaturverzeichnis	68
7	Erklärung zum Eigenanteil	81

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AB	Antibiotika
APS	Ammoniumpersulfat
BCA	Bicinchoninsäure
BEV	Bakterielle Extrazelluläre Vesikel
BSA	Bovines Serumalbumin
CFDA-SE	Carboxyfluoreszein-Diazetat-Succinimidyl-Ester
CFSE	Carboxyfluoreszein-Succinimidyl-Ester
Ct	cycle threshold
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DC	Dendritische Zellen (dendritic cells)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EM	Elektronenmikroskopie
EQ	ExoQuick-TC
EU	Endotoxin-Units
EV	Extrazelluläre Vesikel
FACS	Durchflusszytometrie (fluorescence activated cell sorting)
FCS	fetales Kälberserum (fetal calf serum)
Foxp3	Forkhead-Box-Protein P3
HLA	Humanes Leukozyten-Antigen
ICM	Immun-Checkpoint-Molekül
IL	Interleukin
ILC	Innate lymphoid cells (angeborene lymphoide Zellen)
kDa	Kilo-Dalton
LTA	Lipoteichonsäure
MDSC	Myeloide Suppressorzellen (myeloid-derived suppressor cells)
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität (mean fluorescence intensity)

NGS	Next Generation Sequencing
NK	Natürliche Killerzelle
NTA	Nanoparticle Tracking Analysis
PE	Präeklampsie
P/S	Penicillin/Streptomycin
PBMC	periphere mononukleäre Blutzellen (peripheral blood mononuclear cells)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (Phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase chain reaction)
PFA	Paraformaldehyd
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion
R	Range (Spannweite)
RNA	Ribonukleinsäure
ROR γ t	retinoic acid-related orphan receptor gamma t
RPMI	Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium
RSA	Rezidivierende Spontanaborte
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
SSW	Schwangerschaftswoche
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Th1	T-Helfer-1-Zelle
Th17	T-Helfer-17-Zelle
Th2	T-Helfer-2-Zelle
Treg	Regulatorische T-Zelle
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
UZ	Ultrazentrifugation
vs.	lat. versus = gegen(übergestellt)
w/v	Gewicht pro Volumen (weight per volume)
WB	Western Blot

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Aufbau eines BEVs.....	15
Abbildung 2: Zyklusprotokoll der qPCR.....	28
Abbildung 3: Gatingstrategie zur Bestimmung von T-Helferzellen.....	30
Abbildung 4: Gatingstrategie zur Untersuchung der Immunzellkomposition.....	34
Abbildung 5: Proteinausbeute aus BEVs nach Aufreinigung nach unterschiedlichen Protokollen	37
Abbildung 6: BEVs aus Stuhl zeigen bakteriellen Ursprung.....	38
Abbildung 7: Untersuchung der Konzentrations- und Zeitabhängigkeit der Aufnahme von BEVs durch T-Zellen	39
Abbildung 8: Th-Zell-Komposition nach Stimulation mit BEVs Schwangerer und nicht-schwangerer Kontrollen.....	40
Abbildung 9: Bakterielle Zusammensetzung von BEVs Schwangerer und nicht schwangerer Kontrollen.....	42
Abbildung 10: Th-Zell-Komposition nach Stimulation mit BEVs aus dem Stuhl von RSA-Patientinnen	43
Abbildung 11: BEVs von RSA-Patientinnen zeigen eine veränderte bakterielle Komposition.....	44
Abbildung 12: Th-Zell-Komposition nach Inkubation von PBMCs mit BEVs von PE-Patienten und gesunden Schwangeren	44
Abbildung 13: Unterschiede der mikrobiellen Komposition von BEVs aus dem Stuhl Schwangerer mit PE und aus dem Stuhl gesunder Schwangerer	45
Abbildung 14: Bakterielle Zusammensetzung muriner Kotproben an E10.5.....	46
Abbildung 15: Trächtigkeitsverlauf nach Antibiotika-Behandlung	47
Abbildung 16: Immunzellpopulationen in Organen der Maus.....	48
Abbildung 17: Erhöhte Anteile myeloider Zellen bei trächtigen AB-behandelten Mäusen.....	50

Abbildung 18: Einfluss einer AB-Therapie auf das Vorkommen von ILC 51
 Abbildung 19: Einfluss einer AB-Behandlung auf das Vorkommen von T- und B-
 Zellen..... 52

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Liste der für Durchflusszytometrie verwendeten humanen Antikörper
 17
 Tabelle 2: Liste der für die Durchflusszytometrie verwendeten murinen
 Antikörper 17
 Tabelle 3: Liste der im Western Blot verwendeten Antikörper 18
 Tabelle 4: Liste der in der Fluoreszenzmikroskopie verwendeten Antikörper ... 18
 Tabelle 5: Liste der verwendeten Chemikalien und Reagenzien 18
 Tabelle 6: Liste der verwendeten Kits 20
 Tabelle 7: Liste der verwendeten Kulturmedien, Puffer und Gele 20
 Tabelle 8: Liste der für die qPCR verwendeten Primer-Sequenzen..... 21
 Tabelle 9: Liste der verwendeten Geräte 22
 Tabelle 10: Liste der für Messungen und Auswertungen verwendeten Software
 22
 Tabelle 11: Demographische und klinische Daten der Studienteilnehmerinnen 24
 Tabelle 12: Protokolle zur Separation von BEVs aus humanen Stuhlproben ... 25

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem während der Schwangerschaft

Die Schwangerschaft ist eine immunologische Ausnahmesituation, in welcher der mütterliche Organismus Toleranz gegenüber dem semi-allogenen Fetus gewährleisten muss, ohne die Fähigkeit der Infektionsabwehr einzubüßen. Daher kommt es während der Schwangerschaft zu immunologischen Anpassungen bei der Mutter. Eine Beeinträchtigung dieser Anpassungsvorgänge kann Ursache für Schwangerschaftskomplikationen wie Frühgeburtlichkeit, Präeklampsie und Fehlgeburten sein [1].

1.1.1 Immunologische Anpassungen in der gesunden Schwangerschaft

Die bisher am meisten beschriebenen immunologischen Veränderungen während der Schwangerschaft betreffen T-Zellen. Lange Zeit wurde angenommen, dass der Erfolg einer Schwangerschaft hauptsächlich auf eine veränderte Balance zwischen T-Helfer 1- (Th1) und T-Helfer 2- (Th2) Zellen im Sinne eines Biasing in Richtung Th2-getragener Immunantworten zurückzuführen ist. So scheint eine Dominanz von Th1-Zellen über das zweite Trimester hinweg mit Schwangerschaftskomplikationen wie Frühgeburt, Präeklampsie oder Fehlgeburt assoziiert [2-4], während Th2-Zytokine, vor allem Interleukin-10 (IL-10), Fehlgeburten zu verhindern scheinen [5]. Auch regulatorische T-Zellen (Tregs) spielen eine wichtige Rolle für die Immunregulation während der Schwangerschaft und ein Mangel ist mit einem erhöhten Risiko für Fehlgeburten assoziiert [6]. Umgekehrt ist eine vermehrte Expansion von T-Helfer-17-Zellen (Th17) im Rahmen von Schwangerschaftskomplikationen beschrieben [7-9]. Welche Mechanismen der veränderten T-Zell-Regulation in der Schwangerschaft zugrunde liegen, ist bisher noch nicht vollständig verstanden.

Auch für andere Immunzellen wurden Veränderungen im Rahmen der Schwangerschaft beschrieben. B-Zellen scheinen einerseits durch Antikörperproduktion gegen paternale humane Leukozyten-Antigene (HLA) protektiv auf die Schwangerschaft zu wirken [10], andererseits können sie

schädliche Auto-Antikörper bilden, was zu Schwangerschaftskomplikationen führen kann [11]. Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) bilden einen großen Teil der Immunzellen der Dezidua [12]. Dort zeigen sie einen anderen Phänotyp und geringere Zytotoxizität als periphere NK-Zellen [13-15]. Über Veränderungen peripherer NK-Zellen in der Schwangerschaft ist wenig bekannt. Monozyten zeigen Aktivierungszeichen zu Beginn der Schwangerschaft, expandieren im Verlauf und verändern ihre Funktionalität hin zu verminderter Phagozytose-Aktivität und vermehrter Zytokinproduktion während der Schwangerschaft [16-18]. Weiterhin findet in der Schwangerschaft eine Expansion sogenannter myeloider Suppressorzellen (MDSC) statt, die suppressiv auf andere Immunzellen wirken und wesentlich an der T-Zell-Regulation und der Aufrechterhaltung der feto-maternalen Toleranz beteiligt sind [19-21].

1.1.2 Präeklampsie

Die Präeklampsie (PE) ist eine schwere Schwangerschaftskomplikation, welche 2-8% aller Schwangerschaften betrifft und einer der wichtigsten Gründe für perinatale Morbidität und Mortalität ist [22]. Klinisch äußert sich eine PE durch Hypertonie und Proteinurie, unbehandelt kann es zu schweren bis letalen Verläufen durch Komplikationen wie Leber- und Nierenversagen, tonisch-klonischen Krampfanfällen, Schlaganfall oder Lungenödem kommen [23]. Die einzige kausale Therapie ist die Entbindung, die im Falle einer Frühgeburtlichkeit wiederum Gesundheitsrisiken für das Kind mit sich bringt [24]. Nach aktuellem Verständnis ist ein Hauptfaktor für die Entwicklung einer PE eine insuffiziente Trophoblast-Invasion mit konsekutiv beeinträchtigtem Spiralarterien-Remodelling und damit eine Unterversorgung der fetoplazentaren Einheit, welche zu reaktiver Hypertonie und damit verbundenen Endorganschäden führt [25]. Daneben scheinen auch immunologische Faktoren eine Rolle zu spielen. Die PE ist beispielsweise mit einem Übergewicht an Th1- und Th17-Zellen sowie einem Mangel an Tregs assoziiert [2, 25-27]. Warum es im Rahmen der PE zu einer solchen Dysregulation von T-Helferzellen kommt, ist bisher unbekannt.

1.1.3 Rezidivierende Spontanaborte

Als Spontanabortion wird ein plötzlicher Schwangerschaftsverlust vor der 24. Schwangerschaftswoche definiert. Spontanaborte betreffen ca. 25% bis 50% aller Frauen mindestens einmal im Leben. Rezidivierende Spontanaborte (RSA), definiert als drei oder mehr konsekutive Spontanaborte sind seltener und betreffen etwa 1% aller Paare [28]. Nichtsdestotrotz gehören RSA zu den wichtigsten Gründen für unerfüllten Kinderwunsch [28, 29]. Neben Ursachen wie chromosomalen Störungen, endokrinologischen Störungen oder Infektionen sind vermutlich auch Störungen der immunologischen Anpassung für Spontanaborte verantwortlich [1, 30]. Insbesondere T-Zell-Veränderungen scheinen eine Rolle zu spielen, z.B. eine eingeschränkte Funktionsfähigkeit dezidualer Tregs [31] sowie ein Übergewicht an Th1-Zellen [32, 33] und Th17-Zellen [34]. Aufgrund des bisher sehr unvollständigen Verständnisses der immunologischen Dysregulation bei Aborten existieren bisher keine effektiven immunbasierten Therapieansätze und bis heute bleibt etwa jeder zweite Spontanabortion ohne geklärte Ursache [35].

1.2 Das intestinale Mikrobiom in der Schwangerschaft

Im Laufe der Schwangerschaft durchläuft das intestinale Mikrobiom physiologische Veränderungen seiner bakteriellen Komposition [36]. Das Mikrobiom Schwangerer scheint durch eine höhere interindividuelle Diversität (β -Diversität) und eine geringere intraindividuelle Diversität (α -Diversität) verglichen mit dem Mikrobiom nicht-Schwangerer gekennzeichnet zu sein und zeigt vermehrt Vorkommen von *Actinobacteria* und *Proteobacteria* sowie verringertes Vorkommen von *Faecalibacteria* [36]. Auch das vermehrte Vorkommen von *Bifidobacterium* und *Bacteroidetes*-Spezies (75) in der späten Schwangerschaft wurde beschrieben [37]. Die sich im Laufe der Schwangerschaft entwickelnden Charakteristika des intestinalen Mikrobioms persistieren noch Wochen bis Monate nach der Geburt [36]. Verschiedene Studien zeigen, dass Schwangerschaftskomplikationen wie Fehlgeburten, Frühgeburtlichkeit, PE und Gestationsdiabetes mit dysbiotischen Veränderungen des intestinalen Mikrobioms einhergehen können [38-41]. Bei Patientinnen mit Spontanabortion wurde zum Zeitpunkt des Aborts z.B. eine verringerte Diversität des intestinalen

Mikrobioms und ein erhöhtes Verhältnis von *Firmicutes* zu *Bacteroidetes* beschrieben, was mit erhöhten Konzentrationen pro-inflammatorischer Zytokine assoziiert war [38]. Mikrobiomanalysen von Schwangeren mit PE zeigten Veränderungen der Komposition des intestinalen Mikrobioms mit z.B. einer Anreicherung von *Clostridia* und *Fusobacteria* und einer Depletion von *Akkermansia* und *Faecalibacteria* [40, 42]. *In vivo* konnte gezeigt werden, dass ein Mikrobiomtransfer von PE-Patientinnen in Wildtyp-Mäuse eine arterielle Hypertonie induzierte, die Darmbarriere beeinträchtigte und das Vorkommen von bakterieller RNA in der Plazenta erhöhte, was darauf hindeuten könnte, dass die intestinale Dysbiose an der Pathogenese der PE beteiligt ist [40]. Über mögliche Mechanismen, wie das Mikrobiom den Schwangerschaftsverlauf beeinflusst ist bisher nur sehr wenig bekannt. Auch ist bisher nicht bekannt, inwieweit eine vorbestehende Dysbiose Einfluss auf die immunologischen Vorgänge während der Schwangerschaft und den Schwangerschaftsverlauf hat.

1.3 Immunregulation durch das intestinale Mikrobiom

Das intestinale Mikrobiom setzt sich aus den zahlreichen Mikroorganismen zusammen, welche den menschlichen Darm besiedeln. Bakterien machen dabei den größten Anteil aus und sind insbesondere im Kolon angereichert, wobei schätzungsweise 10^{11} bis 10^{14} Bakterien pro Gramm Stuhl zu finden sind [43]. Seit vielen Jahren ist bekannt, dass das Mikrobiom eine wichtige Rolle bei der Pathogenese vieler Erkrankungen spielt. Neben der Bedeutung des Mikrobioms für Verdauungsprozesse ist inzwischen bekannt, dass es auch immunregulatorische Funktionen besitzt [44].

1.3.1 Dysbiose und Inflammation

Pathologische Veränderungen des intestinalen Mikrobioms wie z.B. eine verringerte Vielfalt oder ein vermehrtes Vorkommen opportunistischer Pathogene werden als Dysbiose bezeichnet. Die Ursachen für das Auftreten einer intestinalen Dysbiose sind vielfältig und umfassen beispielsweise genetische Prädisposition, Stress, Ernährung, Infektionen oder Medikamenteneinnahme [45]. Die Dysbiose ist mit lokaler und systemischer Inflammation [46, 47] und

verschiedensten Erkrankungen, wie z.B. entzündlichen Darmerkrankungen [48-50], Brustkrebs [51, 52], Adipositas [53] und Diabetes mellitus [54] assoziiert.

1.3.2 Bakterielle extrazelluläre Vesikel

Extrazelluläre Vesikel (EVs) sind 20-500 nm große Nanopartikel, welche von eukaryotischen und prokaryotischen Zellen produziert werden. Die EV-Produktion durch Bakterien wurde 1967 in elektronenmikroskopischen Untersuchungen an *Vibrio cholerae* entdeckt [55]. Bakterielle extrazelluläre Vesikel (BEVs) sind maximal 300 nm groß [56] und enthalten verschiedenste von der Ursprungszelle stammende Partikel, die von einer Phospholipidhülle umgeben sind und Oberflächenproteine der Ursprungszelle tragen, wie z.B. Lipopolysaccharide (LPS) [57]. BEVs beinhalten verschiedene Moleküle wie Ribonukleinsäure (RNA), Desoxyribonukleinsäure (DNA) und Proteine [58-60].

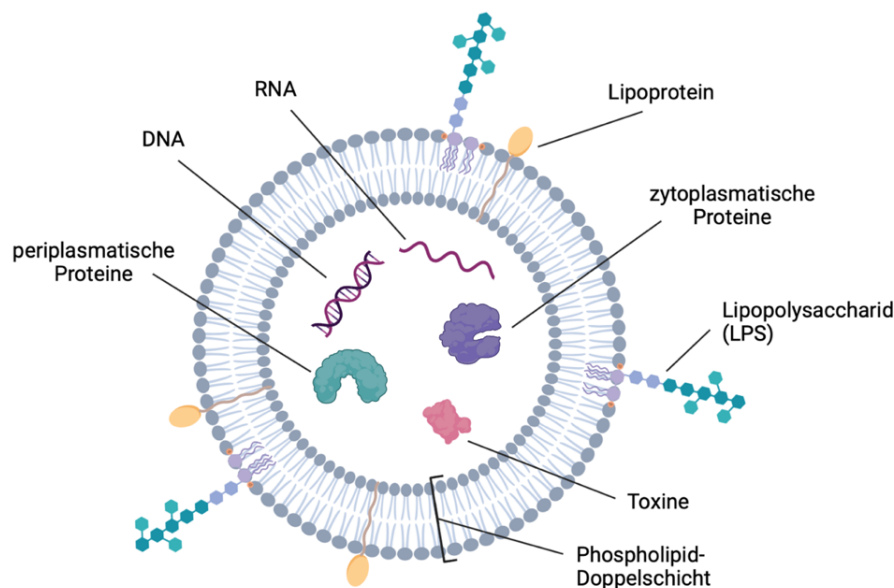


Abbildung 1: Schematischer Aufbau eines BEVs

Erstellt mit BioRender.com

BEVs des intestinalen Mikrobioms können das Darmepithel auf para- und transzellulärem Weg überschreiten und in die Blutbahn des Wirts gelangen [61]. Aufgrund ihrer geringen Größe überschreiten BEVs biologische Schranken und sind neben dem Blut in sämtlichen Körperflüssigkeiten wie Urin, Stuhl, Fruchtwasser, Muttermilch und Liquor zu finden [61-64]. Im Blutkreislauf und Geweben kommen BEVs in Kontakt mit den Immunzellen des Wirts [65, 66], wo sie dann auf mehreren Wegen mit ihnen interagieren, z.B. durch

rezeptorvermittelte Immunzell-Aktivierung, Membranfusion, Makropinozytose oder Endozytose [67-69].

Im Rahmen verschiedener Erkrankungen wie chronisch entzündlichen Darmerkrankungen oder Krebserkrankungen wurden immunregulatorische Fähigkeiten von BEVs beschrieben [70-73]. Abhängig vom produzierenden Bakterium können BEVs sowohl pro- als auch antiinflammatorische Effekte vermitteln [74-77]. Die Bedeutung von BEVs des intestinalen Mikrobioms für den Schwangerschaftserfolg wurde bisher noch nicht untersucht.

1.4 Ziel dieser Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Interaktion zwischen intestinale Mikrobiom und Immunsystem während der Schwangerschaft genauer zu untersuchen. Im ersten Teil der Arbeit sollten BEVs als mögliche Vermittler von Th-Regulation durch das intestinale Mikrobiom *in vitro* analysiert werden. Im zweiten Teil der Arbeit sollte im Tiermodell untersucht werden, welchen Einfluss eine vorbestehende Dysbiose auf die immunologischen Adaptationsvorgänge und den Schwangerschaftsverlauf hat.

Folgende Hypothesen sollten hierzu *in vitro* überprüft werden:

- 1.1. BEVs aus dem Stuhl Schwangerer modulieren die T-Helferzell-Antwort in Richtung eines für die Schwangerschaft protektiven Profils.
- 1.2. BEVs aus dem Stuhl von Patientinnen mit Schwangerschaftskomplikationen zeigen im Vergleich zu BEVs aus dem Stuhl gesunder Schwangerer veränderte Effekte auf die T-Helferzell-Antwort.

Folgende Hypothesen sollten *in vivo* untersucht werden:

- 2.1. Eine durch Antibiotika induzierte Dysbiose führt zum vermehrten Auftreten von Fehlgeburten bei Mäusen.
- 2.2. Eine durch Antibiotika induzierte Dysbiose führt zu einer veränderten Immunzellkomposition bei trächtigen Mäusen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Antikörper

Die benötigten Antikörpermengen wurden in Vorversuchen durch Titration bestimmt. Es handelte es sich bei allen verwendeten humanen Antikörpern um „Mouse Anti-Human“-Antikörper (Tabelle 1) und bei allen verwendeten murinen Antikörpern um „Rat Anti-Mouse“-Antikörper (Tabelle 2).

Tabelle 1: Liste der für Durchflusszytometrie verwendeten humanen Antikörper

Antikörper	Klon	Herstellerangaben
CCR4 FITC	205410	R&D Systems, Art.#: FAB1567F
CCR6 APC	G034E3	BioLegend, Art.#: 353418
CD8 APC	RPA-T8	BD Biosciences, Art.#:555369
CD45 APC-Cy7	2D1	BioLegend, Art.#: 368515
CXCR3 PE	1C6/CXCR3	BD Biosciences, Art.#: 746895
CD3 PE-Cy7	HIT3a	BioLegend, Art.#: 300316
CD4 PerCP	RPA-T4	BD Biosciences, Art.#: 555751
CD25 Pac. Blue	M-A251	BioLegend, Art.#: 356129
FVS510		BD Biosciences, Art.#: 564406

Tabelle 2: Liste der für die Durchflusszytometrie verwendeten murinen Antikörper

Antikörper	Klon	Herstellerangaben
CD3 FITC	145-2C11	BD Biosciences, Art.#: 553061
CD11b FITC	M1/70	BD Biosciences, Art.#: 553310
CD4 APC	RM4-5	BD Biosciences, Art.#: 561091
CD25 APC	PC61	BioLegend, Art.#: 102075
F4/80 APC	BM8	BioLegend, Art.#: 123116
Ly6-G APC	1A8	BioLegend, Art.#: 127613
CD8a APC-Cy7	53-6.7	BD Biosciences, Art.#: 553032
MHC II APC-Cy7	M5/114.15.2	BioLegend, Art.#: 107627
CD19 PE	1D3	BD Biosciences, Art.#: 557399

Foxp3 PE	FJK-16s	eBioscience, Art.#: 12-5733-80
RORyt PE	Q31-378	BD Biosciences, Art.#: 562607
GR-1 PE-Cy7	RB6-8C5	BioLegend, Art.#: 108423
Ly6-C PE-Cy7	HK1.4	BioLegend, Art.#: 128017
NKp46 PE-Cy7	29A1.4	BioLegend, Art.#: 137617
CD45 PerCP	30-F11	BD Biosciences, Art.#: 561047
CD11c BV421	N418	BioLegend, Art.#: 117301

Tabelle 3: Liste der im Western Blot verwendeten Antikörper

Antikörper	Klon	Herstellerangaben
β -Actin Rabbit mAb	D6A8	Cell Signaling Technology, Art.#: 8457
HRP-linked Anti-rabbit IgG		Cell Signaling Technology, Art.#: 7074

Tabelle 4: Liste der in der Fluoreszenzmikroskopie verwendeten Antikörper

Antikörper	Klon	Herstellerangaben
Anti-human CD3	UCHT1	BioLegend, Art.#: 300401
DAPI		Invitrogen, Art.#: D1306
Donkey anti-Mouse IgG Secondary Antibody, Alexa Fluor™ 647		Invitrogen, Art.#: A-31571

2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 5: Liste der verwendeten Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien/Reagenzien	Herstellerangaben
Amersham Hybond P 0.45 PVDF	Cytiva, Art.#: 10600023
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Sigma, 250 g, Art.#: 09718-250G
Ampuwa® Spüllösung	Fresenius, Plastipur Aqua ad injectabilia, Art.#: B23067A
Ammoniumpersulfat (APS)	Carl Roth, >98% p.a., ACS, 50g, Art.#: 9592.3
Biocoll Separating Solution	PanBiotech GmbH, 1,077 g/ml, Art.#: L6115
Brefeldin A	BioLegend, Art.#: 420601
Bromphenolblau	Sigma Aldrich, Art.#: B5525-10G

Carboxyfluoreszein-Diazetat-Succinimidyl-Ester (CFDA-SE)	Invitrogen, Vybrant® CFDA-SE Cell Tracer Kit, Art.#: 864067
Dithiothreitol (DTT)	Thermo Fisher Scientific, Art.#: R0861
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth, 250 g, Art.#: 8043.1
Essigsäure 100%	Merck KgaA, Art.#: 100062
Ethanol	AppliChem GmbH, 2500PE/UN1170, Art.#: A1613
ExoQuick-TC	System Biosciences, Art.#: EXOTC50A-1
FACS-Flow	BD Bioscience, 20 l, Ref#: 342003
Fetales Kälberserum (FCS)	PanBiotech GmbH, 500 ml, Art.#: S0115
Glycerol	Sigma Aldrich, Art.#: G9012-100ML
Glycin	Sigma Aldrich, Art.#: G8898-500G
Hepes	Carl Roth, Art.#: 9105.4
L-Glutamin	Sigma Aldrich, 200 mM, Art.#: G7513
Liberase	Roche, Art.#: 05401119001
Methanol	AppliChem GmbH, Art.#: 131091.1211
Milchpulver	Carl Roth, Art.#: T145.2
Natriumazid (NaN ₃)	Sigma Aldrich, Art.#: 609374-500MG
Natriumchlorid (NaCl)	Merck KgaA, Art.#: 1064040500
Paraformaldehyd (PFA)	AppliChem, Art.#: A0936
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) Dulbecco	PanBiotech GmbH, Art.#: L1825
Penicillin/Streptomycin	PanBiotech, Art.#: A2212
Percoll	Cytiva, Art.#: 17098101
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Thermo Fisher Scientific, Art.#: 36978
Polyvinylalkohol	Thermo Fisher Scientific, Art.#: 178971000
Protease Inhibitor Cocktail (PIC)	Roche, Art.#: 11697498001
Proteinmarker 10-180 kDa	PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Thermo Fisher, Art.#: 26616
Rotiphorese Gel 30	Carl Roth, Art.#: 3029.1
RPMI 1640 Zellkulturmedium	PanBiotech GmbH, Art.#: F1215
Salzsäure (HCl)	Sigma Aldrich, Art.#: H1758-100ML

Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)	Sigma Aldrich, Art.#: L3771-100G
SYBR-Green	Thermo Fisher Scientific, Art.#: A25742
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth >99% p.a., Art.#: 2367.3
TrisBase	Sigma Aldrich, Art.#: 93362-250G
Triton X 100	Sigma Aldrich, Art.#: X100-100ML
Tween 20	Carl Roth, Art.#: 9127.1
β-Mercaptoethanol	Merck KgaA, Art.#: M3148-25ML

2.1.3 Kits

Tabelle 6: Liste der verwendeten Kits

Kit	Herstellerangaben
Chemilumineszenzlösung: Amersham™ ECL™ Western Blotting Analysis System	GE Healthcare, Art.#: RPN2109
BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Art.#: 23225
eBioscience™ Foxp3/Transkriptions-faktor Staining Buffer Set	Thermo Fisher Scientific, Art.#: 00-5523-00
Human Lipoteichoic Acid (LTA) ELISA Kit	Abnova, Art.#: abx257487
Pierce™ Chromogenic Endotoxin Quant Kit	Thermo Fisher Scientific, Art.#: A39552
ZymoBIOMICS DNA MicroPrep Kit	Zymo Research, Art.#: D4301

2.1.4 Kulturmedien, Puffer und Gele

Tabelle 7: Liste der verwendeten Kulturmedien, Puffer und Gele

Medium/Puffer/Gel	Verwendung	Zusammensetzung
40%iges Percoll	Herstellung einer Einzelzellsuspension des Darms	2,5 ml Percoll 80%ig, 2% FCS, 2 ml RPMI
80%iges Percoll		2 ml Percoll, 250 µl 10x PBS, 250 µl PBS
EDTA-Puffer		14,25 ml PBS, 2 % FCS, 1 mM EDTA, 1 mM DTT
Ladepuffer 5X	Probenvorbereitung für Western Blot	1,25 ml Tris/Base pH 6,8, 4 ml 10% SDS, 4 ml Glycerol, 1,75 ml Ampuwa, 1 mg Bromphenolblau, pro 90 µl Ladepuffer 10 µl Mercaptoethanol
Laufpuffer	Gelelektrophorese für Western Blot	30 g Tris Base (25 mM), 144 g Glycin, 10 g SDS, ad 1000 ml H ₂ O

Liberase-Puffer	Herstellung einer Einzelzellsuspension des Darms	4 ml RPMI 1640 Medium, 2 % FCS, 32,25 µg/ml Liberase, 2 U DNase
Lysepuffer	BCA-Assay und Western Blot	4,3 ml Ampuwa, 250 µl Tris/HCl pH 7,4 1M, 100 µl NaCl 5M, 50 µl 10%-Triton x 100, 200 µl PIC, 50 µl PMSF 100 mM
Mounting Solution	Fluoreszenz-mikroskopie	5 g Polyvinylalkohol, 20 ml 100 mM Tris pH 8, 10 ml Glycerin
RPMI-Medium	Zellkultur human	RPMI 1640 Medium, 10% FCS, 1% L-Glutamin, 1% P/S
Sammelgel (10 %ig)	Western Blot	2,93 ml Ampuwa, 495 µl Rotiphorese Gel 30, 225 µl 1M Tris/Base pH 6,8, 16,3 µl APS, 3,8 µl TEMED
TBST-Puffer 20X	Western Blot	100 ml 1M Tris/Base pH 7,4, 150 ml 5M NaCl, 20 ml 0,5M EDTA, 10 ml Tween 20 (2%ig), ad 500 ml H ₂ O
Transferpuffer	Western Blot	6 g Tris Base (25 mM), 28 g Glycin, 400 ml Methanol, ad 2000 ml H ₂ O
Trenngel (10 %ig)	Western Blot	4 ml Ampuwa, 3,3 ml Rotiphorese Gel 30, 2,5 ml 1,5M Tris/Base pH 8,8, 100 µl 10% SDS, 100 µl APS, 5 µl TEMED

2.1.5 Primer-Sequenzen für qPCR

Tabelle 8: Liste der für die qPCR verwendeten Primer-Sequenzen

Target	Sequenz
Universal 16S	Forward: AACTCAAAGGAATTGACGG
	Reverse: CTCACRRCACGAGCTGAC
Bacteroidetes	Forward: CRAACAGGATTAGATACCCT
	Reverse: GGTAAGGTTCTCGCGTAT
Firmicutes	Forward: GGAGYATGTGGTTTAATTCGAAGCA
	Reverse: AGCTGACGACAACCATGCAC
Alphaproteobacteria	Forward: CIAGTGTAGAGGTGAAATT
	Reverse: CCCCGTCAATTCCTTTGAGTT
Gammaproteobacteria	Forward: TCGTCAGCTCGTGTGTGA
	Reverse: CGTAAGGGCCATGATG
Actinobacteria	Forward: TACGGCCGCAAGGCTA

	Reverse: TCRTCCCCACCTTCCTCCG
Fusobacteria	Forward: AAGCGCGTCTAGGTGGTTATGT
	Reverse: TGTAGTCCGCTTACCTCTCCAG

2.1.6 Geräte

Tabelle 9: Liste der verwendeten Geräte

Gerät	Herstellerangaben
Beckman 50 TI Rotor	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
FACS Canto II	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
Zeiss Axio Observer.Z1	Carl Zeiss Microscopy, Oberkochen, Deutschland
Hämozytometer SYSMEX-XP300	Sysmex GmbH, Norderstedt, Deutschland
iBright CL1000	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
NanoSight NS300	Malvern Panalytical, Malvern, United Kingdom
Power Supply Consort E831	Consort bvba, Turnhout, Belgien
QuantStudio 3	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Sorvall Discovery 100 SE Floor Ultracentrifuge	Cambridge Scientific, ID#: 22415
Varioskan Lux	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Zeiss LIBRA 120 Transmissions-elektronenmikroskop	Carl Zeiss Microscopy, Oberkochen, Deutschland
µDrop™ Plate	Thermo Fisher Scientific, Art.#: N12391

2.1.7 Software

Tabelle 10: Liste der für Messungen und Auswertungen verwendeten Software

Software	Herstellerangaben
Design & Analysis Software 2.6.0	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
FACSDiva 8	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
FlowJo V10	FlowJo, LLC, Ashland, Oregon, USA
GraphPad Prism 8.1.0 (2018)	GraphPad Software, San Diego, USA
Magellan 6	STÜBER SYSTEMS GmbH, Berlin, Deutschland
NTA 3.4 Build 3.4.003	Malvern Panalytical Ltd, Malvern, UK

2.2 Humane Proben

Für die *in vitro*-Versuche wurden humane Stuhlproben verwendet. Die Versuche wurden durch die Ethikkommission der Eberhard Karls Universität und des Universitätsklinikums Tübingen berufsrechtlich beraten und genehmigt (730/2020BO2 und 537/2022BO1). Im Zeitraum von Mai 2022 bis März 2023 wurden insgesamt 61 Studienteilnehmerinnen im Alter von 23 bis 44 Jahren über die Universitätsfrauenklinik Tübingen und die Praxis des niedergelassenen Gynäkologen Dr. med. Alexander Marmé, Am Lustnauer Tor 4, 72074 Tübingen, sowie aus dem Bekanntenkreis der Mitarbeiter des Labors für Neonatale Immunologie der Abteilung Neonatologie (PD Dr. med. Köstlin-Gille) rekrutiert. Ausschlusskriterien für die Studie waren die Einnahme von Probiotika, Antibiotika oder immunmodulierenden Therapien in den letzten 4 Wochen vor Einwilligung zur Studienteilnahme. Die demographischen und geburtshilflichen anamnestischen Daten der Teilnehmerinnen sind in Tabelle 11 zusammengefasst. Die Kontrollprobandinnen (n=14) hatten mindestens eine komplikationslose Schwangerschaft hinter sich und waren zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses nicht schwanger. Zur Versuchsetablierung wurden gesunde nicht-schwangere Frauen ohne vorangegangene Schwangerschaft eingeschlossen (n=5). Die Patientinnen mit RSA (n=10) befanden sich zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses in Kinderwunschbehandlung an der Universitätsfrauenklinik Tübingen und hatten zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses zwei oder mehr konsekutive Spontanaborte erlitten. Gesunde Schwangere befanden sich im zweiten Trimester (T2) zwischen der 15. und 26. Schwangerschaftswoche (SSW) (n=16) und im dritten Trimester (T3) zwischen der 27. und 38. SSW (n=8). Schwangere mit PE (n=13) befanden sich zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses in stationärer Behandlung an der Universitätsfrauenklinik Tübingen.

Tabelle 11: Demographische und klinische Daten der Studienteilnehmerinnen

RSA: Patientinnen mit rezidivierenden Spontanaborten; T2: Schwangere im 2. Trimester; T3: Schwangere im 3. Trimester; PE: Präeklampsie-Patientinnen

^aDaten sind angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung

^bDaten sind angegeben als Median (Interquartilsrange IQR)

	Kontrolle (n = 14)	RSA (n = 10)	T2 (n = 16)	T3 (n = 8)	PE (n = 13)
Alter (Jahre) ^a	37,3 \pm 5,2	36,2 \pm 4,6	35,3 \pm 3,2	37,0 \pm 3,6	35,5 \pm 6,0
SSW ^b	-	-	24,5 (12,0)	34,0 (9,0)	36,0 (11,0)
Gravida ^b	1,0 (2,0)	3,0 (4,0)	2,0 (4,0)		1,5 (4,0)
Para ^b	1,0 (2,0)	0,0 (1,0)	1,0 (3,0)		0,0 (3,0)

2.3 Versuchstiere

Für die Tierexperimente wurden Mäuse als Versuchstiere verwendet. Es wurden Weibchen der Mauslinie C57BL/6J und Männchen der Mauslinie BALB/c verwendet. Die Versuchstiere wurden über die Firma Charles River (Sulzfeld, Deutschland) bezogen. Die Tiere wurden in offener Käfighaltung in Typ-II-Käfigen mit einer Nutzfläche von 530 cm² gehalten. Der Hell-Dunkel-Zyklus betrug jeweils 12 Stunden. Die Zucht und Haltung der Tiere erfolgte in enger Zusammenarbeit mit den zuständigen Tierpflegern und des tierärztlichen Dienstes. Die Genehmigung des Versuchsantrags K08/21G mit dem Titel „Die Auswirkung einer Dysbiose auf den Verlauf der Trächtigkeit“ erfolgte durch das Regierungspräsidium Tübingen.

2.4 Isolation und Charakterisierung von BEVs aus dem Stuhl

2.4.1 Separation von BEVs aus Stuhlproben

Zur Etablierung eines Protokolls zur Separation von BEVs aus Stuhlproben wurden Stuhlproben frisch (unter 12 Stunden nach Defäkation, bei 4°C gelagert), nativ bei -20°C eingefroren oder in DNA/RNA-Shield bei Raumtemperatur (RT) gelagert verwendet und verschiedene in der Literatur beschriebene Aufreinigungsprotokolle getestet (Tabelle 12). Alle Proben wurden mittels PBS auf eine Konzentration von 10 % *weight per volume* (w/v) eingestellt [78]. Die Proben wurden dann nach den beschriebenen Protokollen I-VI behandelt.

Tabelle 12: Protokolle zur Separation von BEVs aus humanen Stuhlproben

Übersicht der adaptierten Protokolle verschiedener Publikationen zur Aufreinigung von BEVs aus Stuhl. UZ: Ultrazentrifugation

Protokoll	Arbeitsschritte
Protokoll I Lajqi et al., 2022 [79]	<ol style="list-style-type: none"> 1. Zentrifugation: 1.500 g, 10 min 2. Zentrifugation des Überstands: 10.000 g, 10 min 3. Filtration des Überstands durch 0,2 µm Filter
Protokoll II Park et al., 2021 [62]	<ol style="list-style-type: none"> 1. Filterung durch 100 µm Sieb 2. Zentrifugation: 10.000 g, 10 min 3. Filtration des Überstands durch 0,2 µm Filter 4. Zentrifugation: 13.000 rpm, 30 min
Protokoll III (eigenes)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Zentrifugation des Überstands (3x): 800 g, 10 min 2. Zentrifugation des Überstands (3x): 10.000 g, 10 min
Protokoll IV Gao et al., 2018 [80]	<ol style="list-style-type: none"> 1. Zentrifugation: 200 g, 10 min 2. Zentrifugation des Überstands: 4.500 g, 30 min 3. Filtration des Überstands durch 0,45 µm Filter 4. Filtration des Filtrats durch 0,2 µm Filter
Protokoll V Park et al., 2018 [81]	<ol style="list-style-type: none"> 1. Zentrifugation des Überstands (3x): 800 g, 5 min 2. UZ des Überstands: 100.000 g, 2h 3. Filtration des Überstands durch 0,45 µm Filter
Protokoll VI Kang et al., 2013 [82]	<ol style="list-style-type: none"> 1. Zentrifugation: 10.000 g, 20 min 2. Filtration des Überstands durch 0,45 µm Filter 3. UZ des Überstands: 100.000 g, 2 h, 4°C

Im Anschluss an jedes Protokoll wurden BEVs für die Protokolletablierung jeweils sowohl mittels Ultrazentrifugation (UZ) bei 36.400 rpm für 20 Stunden bei 4°C als auch mittels Präzipitation durch ExoQuick-TC (EQ) nach Herstellerprotokoll isoliert. Hierfür wurde der BEV-haltige Überstand mit EQ im Verhältnis von 5:1

gemischt und über Nacht bei 4°C gelagert. Nach 30-minütiger Zentrifugation bei 1500 g wurde der Überstand verworfen und bei gleicher Geschwindigkeit für 5 Minuten erneut zentrifugiert. Das gewonnene BEV-Pellet wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.4.2 Lyse der BEVs

Die Lyse von BEVs für die Proteinbestimmung mittels Bicinchoninsäure (BCA)-Assay und für den Western Blot erfolgte durch Zugabe von 100 µl Lysepuffer (Tabelle 7) und Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff. Nach vorsichtigem Auftauen auf Eis wurden die Proben für 10 Minuten bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der proteinhaltige Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.4.3 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA-Assay

Die Bestimmung der Proteinkonzentration der aus Stuhl isolierten BEVs erfolgte mittels BCA-Assay nach Herstellerprotokoll. Die zu untersuchenden Proben wurden in vier unterschiedlichen Verdünnungen (1:0, 2:1, 1:1, 1:4) aufgetragen. und die Proteinkonzentrationen wurden bei einer Wellenlänge von 550 nm photometrisch bestimmt.

2.4.4 Nanoparticle Tracking Analyse der BEVs

Mittels Nanoparticle Tracking Analyse (NTA) können Nanopartikel zwischen 30 und 1000 nm Größe detektiert und quantifiziert werden. Durch die Brownsche Molekularbewegung der in der Probe gelösten Partikel wird das Licht eines fokussierten Lasers gestreut und mit einem Mikroskop detektiert. Die Bewegungsrate als Funktion der Verteilungsrate liefert nach der Stokes-Einstein-Gleichung Rückschlüsse über ihre Größe. Durch die Verfolgung jedes Partikels über einen bestimmten Zeitraum in bekanntem Volumen wird die Konzentration der Partikel bestimmt [83]. Zur Untersuchung der Größe und Konzentration von aus Stuhl isolierten BEVs mittels NTA wurden die gefrorenen BEV-Pellets in je 1000 µl PBS gelöst. Die Analysen erfolgten am NanoSight NS300 mit freundlicher Genehmigung im Hertie-Institut für klinische Hirnforschung Tübingen. Für jede Probe wurden drei Messungen von je 45 Sekunden bei einem

Kamera Level von Stufe 11, einer Pumpengeschwindigkeit von 100 und der Detektionsschwelle bei Stufe 5 durchgeführt.

2.4.5 Visualisierung der BEVs mittels Elektronenmikroskopie

Aus Stuhl aufgereinigte BEVs wurden in 2% Paraformaldehyd (PFA) gelöst. Die weitere Probenvorbereitung und Analyse am Zeiss LIBRA 120 Transmissions-Elektronenmikroskop erfolgte durch die Core Facility am Institut der Universitäts-Hautklinik Tübingen (Prof. Dr. Martin Schaller).

2.4.6 Charakterisierung der BEVs mittels ELISA

Zur Charakterisierung der aus Stuhl isolierten EVs wurde das Vorhandensein von LTA als Bestandteil gram-positiver Bakterien [84] und Lipid A als Bestandteil gram-negativer Bakterien [85] jeweils mithilfe eines Sandwich ELISA untersucht. Das LTA-ELISA Kit (Fa. Abbexa) und das Pierce™ Endotoxin Quant Kit (Fa. Thermo Fisher Scientific) wurden den jeweiligen Herstellerangaben entsprechend verwendet. Die photometrischen Messungen erfolgten am Varioskan Lux.

2.4.7 Charakterisierung der BEVs mittels Western Blot

Zum Ausschluss der Herkunft der BEVs aus humanen Zellen wurde das Vorhandensein von β -Actin als Strukturprotein eukaryotischer Zellen [86, 87] mittels Western Blot (WB) untersucht. Als Positivkontrolle dienten lysierte mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut (PBMCs). Je Probe wurde 20 μ g Protein im WB eingesetzt. Die Proben wurden in Ladepuffer in die Taschen eines 10 %igen Polyacrylamid-Gels geladen, in einer Elektrophoresekammer aufgetrennt und dann auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran transferiert. Die Membran wurde in TBST-Puffer gewaschen und für eine Stunde mit 5 %iger Milch geblockt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem in 1 %iger Milch gelösten Primärantikörper (β -Actin Rabbit mAb) über Nacht bei 4°C und dem in 1 %iger Milch gelösten Sekundärantikörper (HRP-linked Anti-rabbit IgG) für eine Stunde bei RT. Nach erneutem Waschen in TBST-Puffer wurde die Membran mit Chemilumineszenz-Lösung beträufelt und für 5 min bei RT inkubiert. Die Analyse der Membran erfolgte am iBright CL1000 (Fa. Thermo Fisher Scientific).

2.4.8 qPCR der BEVs

Zum Nachweis bakterieller DNA in den aus Stuhl isolierten BEVs wurde eine qPCR für die sechs wichtigsten bakteriellen Phyla der menschlichen Darmflora durchgeführt. Die DNA der BEVs wurde zunächst mithilfe des ZymoBIOMICS DNA MicroPrep Kits den Herstellerangaben entsprechend isoliert. Während der Probenvorbereitung wurde auf Eis gearbeitet. Es wurden je 0,5 µl des forward und reverse Primers, 5 µl des Reporters SYBR-Green, 2 µl steriles Wasser und 2 µl Proben-DNA in der Konzentration von 50 ng/µl pro Well eingesetzt. Die qPCR wurde am QuantStudio 3 (Fa. Thermo Fisher Scientific) durchgeführt (Abbildung 2) und in der Software Design and Analysis ausgewertet.

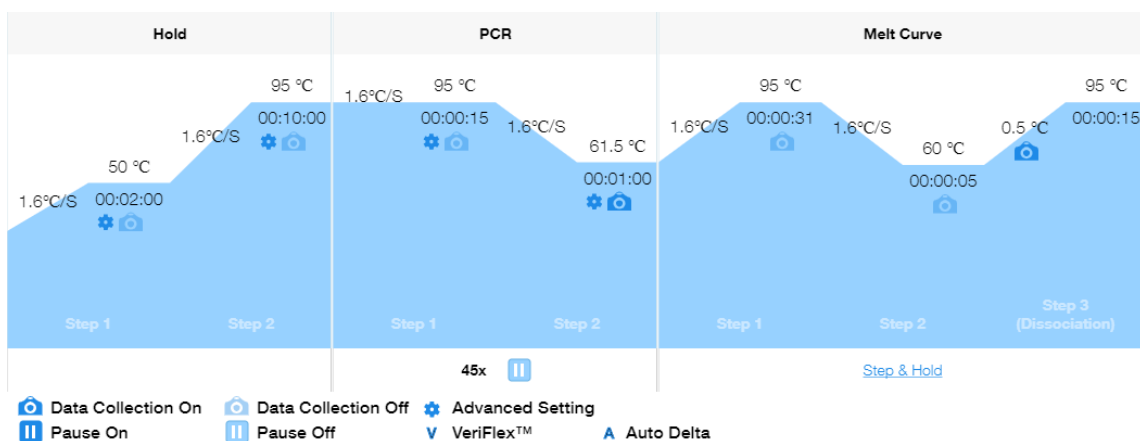


Abbildung 2: Zyklusprotokoll der qPCR

Das abgebildete Zyklusprotokoll zeigt die Einstellungen zu Temperatur und Detektionszeiten über die 45 Zyklen der qPCR.

Anhand der Ct-Werte (cycle threshold) der einzelnen Phyla wurde zunächst der Bacterial Load ($Ct_{\text{Universal}}/Ct_{\text{Phylum}}$) berechnet und die Ergebnisse der einzelnen Phyla summiert. Anhand dessen wurde der relative Anteil jedes Phylums an der gesamten bakteriellen DNA ($Ct_{\text{Phylum}}/Ct_{\text{Bacterial Load}_{\text{gesamt}}}$) berechnet.

2.5 *In vitro* Kulturmodell mit BEVs und Immunzellen

2.5.1 Isolation von mononukleären Zellen aus peripherem Blut

Die Isolation von mononukleären Zellen aus peripherem Blut (peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) erfolgte durch Dichtegradientenzentrifugation [88]. Hierzu wurde Vollblut mit PBS im Verhältnis von 1:2 aufgefüllt und auf Biocoll im Verhältnis von 2:1 geschichtet. Nach Zentrifugation bei 400 rcf für 25 Minuten bei 20°C ohne Bremse reicherten sich die mononukleären Zellen aufgrund ihrer Dichte in der Interphase zwischen Biocoll und Plasma an. Dieser Zellring wurde entnommen, gewaschen und nach Zellzahlbestimmung am Hämozytometer auf die gewünschte Zellzahl von 1×10^7 Zellen/ml in RPMI-Medium eingestellt.

2.5.2 Kultur von PBMCs mit BEVs

Für die Etablierung der *in vitro* Versuche wurden je 1×10^6 frisch isolierte PBMCs mit BEVs aus Stuhl im Verhältnis von ca. 1:100, 1:500, 1:1000 und 1:5000 in Zellkultur gesetzt und zur Untersuchung des zeitlichen Verlaufs der BEV-PBMC-Interaktion für 15, 30 und 60 Minuten und 4, 8, 12 und 24 Stunden inkubiert. Die benötigten Mengen an BEVs für die oben genannten Verhältnisse orientierten sich an der mittleren in der NTA gemessenen BEV-Konzentration pro μl . Zur phänotypischen Untersuchung von T-Zellen nach Stimulation mit BEVs wurde basierend auf den Etablierungsversuchen dann eine Konzentration von 1:500 gewählt und die Zellen für 24 Stunden mit BEVs bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

2.5.3 Durchflusszytometrische Analyse von humanen T-Helferzellen

Zur Untersuchung der Wirkung von BEVs aus Stuhl auf den Phänotyp humaner T-Zellen wurde die Expression verschiedener Oberflächenmarker nach 24-stündiger Inkubation von PBMCs mit BEVs bestimmt. Für die Oberflächenfärbung wurden 1×10^6 Zellen bei Dunkelheit für 10 Minuten bei 4°C mit Antikörpern inkubiert (s. Tabellen 1 und 2) und dann gewaschen. Die Messungen erfolgten am FACSCanto II™. Die Auswertung der Messergebnisse erfolgte in FlowJo. Zum Ausgleich von PBMC-spenderabhängigen Effekten wurden die BEV-Proben auf ein bis drei verschiedene PBMCs gegeben und alle Einzelmessungen ausgewertet.

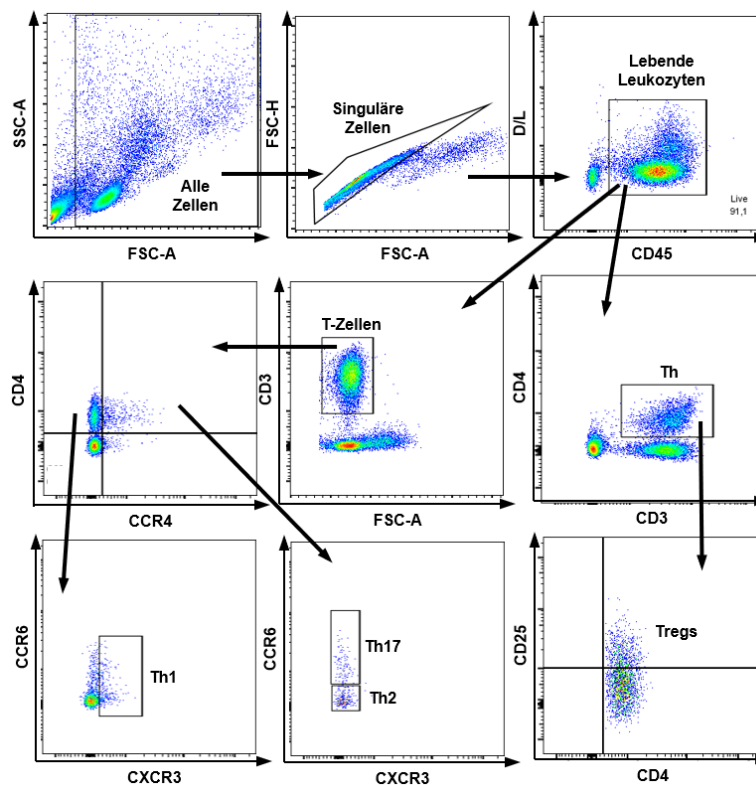


Abbildung 3: Gatingstrategie zur Bestimmung von T-Helferzellen

Zur durchflusszytometrischen Bestimmung von T-Helferzellen wurde zunächst auf die singulären Zellen und dann auf die lebenden $CD45^+$ Leukozyten gated. Weiter wurden die $CD3^+$ T-Zellen bzw. die $CD3^+CD4^+$ T-Helferzellen (Th) bestimmt. T-Helfer-1-Zellen (Th1) wurden als $CCR4^-CXCR3^+$, T-Helfer-2-Zellen (Th2) als $CCR4^+CXCR3^-CCR6^-$ und T-Helfer-17-Zellen (Th17) als $CCR4^+CXCR3^-CCR6^+$ definiert. Regulatorische T-Zellen (Tregs) wurden als $CD25^+$ definiert. Dargestellt sind repräsentative Plots der durchflusszytometrischen Messungen.

2.5.4 CFSE-Färbung von BEVs für die Durchflusszytometrie

CFDA-SE (Carboxyfluoreszein-Diazetat-Succinimidyl-Ester) ist ein fluoreszierender Farbstoff, der durch intrazelluläre Esterasen zu CFSE (Carboxyfluoreszein-Succinimidyl-Ester) umgebaut wird, mit seiner Succinimidyl-Gruppe kovalent an intrazelluläre Makromoleküle bindet und sich somit für die Färbung von Mikropartikeln eignet [89, 90]. Für die CFSE-Färbung wurde ein BEV-Pellet (entspricht ca. 2×10^9 BEVs) in 300 μ l PBS gelöst. Die BEV-Lösung wurde mit 0,75 μ l CFDA-SE (5 mM) gemischt und für eine Stunde bei 37°C inkubiert und dann für 10 min mit 100 μ l EV-freiem fetalen Kälberserum (FCS) geblockt. Das verbleibende CFDA-SE wurde mittels Ultrazentrifugation für eine Stunde bei 36.400 rpm und 4°C ausgewaschen. Für die Versuche zur Untersuchung der Aufnahme von BEVs durch Immunzellen wurden je 1×10^6

PBMCs mit CFSE-gefärbten BEVs im Verhältnis von 1:100, 1:500, 1:1000 und 1:5000 stimuliert und der Ansatz für 15 Minuten, 30 Minuten, 60 Minuten, 4 h, 8 h, 12 h und 24 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

2.5.5 Färbung von T-Zellen für die Fluoreszenzmikroskopie

Zur Visualisierung der BEV-Interaktion mit Immunzellen wurden 1×10^6 PBMCs mit CFSE-gefärbten BEVs im Verhältnis von 1:1000 für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nicht aufgenommene BEVs wurden durch Zentrifugation bei 400 rcf für 5 Minuten abgewaschen. Die Zellen wurden anschließend bei 1600 rpm in 2 Minuten auf ein auf einem Objektträger liegendes Deckgläschen zentrifugiert und in 4% Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Die auf dem Deckgläschen befindlichen Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen und in 5% FCS/PBS für 45 Minuten bei RT inkubiert. Für die CD3-Antikörperfärbung wurde der Antikörper über Nacht bei 4°C in Dunkelheit inkubiert. Nach dreimaligem Waschen erfolgte die Färbung mit dem Sekundär-Antikörper (Anti-mouse AlexaFluor647 in 5% FCS-PBS) für 60 Minuten bei RT in Dunkelheit und dann eine Dapi-Kernfärbung. Die Zellen wurden anschließend am Zeiss Axio Observer.Z1 Mikroskop der Inneren Medizin IV am Universitätsklinikum Tübingen analysiert (PD Dr. Felicia Gerst).

2.6 *In vivo* Modell zu Dysbiose und Trächtigkeit

2.6.1 Versuchsaufbau des *in vivo* Modells

Zur Überprüfung der Hypothese, dass das Vorliegen einer Dysbiose vor Beginn einer Schwangerschaft das Auftreten von Fehlgeburten begünstigt, wurde ein *in vivo* Modell durchgeführt. Hierzu wurden C57BL/6J-Mäuse peripartal beginnend ab dem Tag 18.5 (E18.5) der Trächtigkeit mit einer Antibiotika-Kombination aus 0,3 mg/ml Ampicillin und 0,025 mg/ml Gentamicin durch Supplementation des Trinkwassers (zunächst dem des Muttertieres, dann dem der eigentlichen Versuchstiere) behandelt. Ab einem Alter von acht bis zehn Wochen wurden die mit Antibiotika behandelten Weibchen mit unbehandelten BALB/c-Männchen terminiert verpaart. Als Kontrolle dienten unbehandelte C57BL/6J-Weibchen, welche ebenfalls mit BALB/c-Männchen verpaart wurden. Bei positiver Plug-Kontrolle wurde die Antibiotikatherapie beendet und das Auftreten von Aborten an Trächtigkeitstag E10.5 untersucht. Weiter wurde die Immunzellkomposition in

Milz, Darm, Uterus und Plazenten untersucht. Die Versuchsdurchführung an den lebenden Tieren sowie deren Tötung wurden von Frau Dr. rer. nat. Stefanie Dietz durchgeführt.

2.6.2 Bestimmung der Embryonen-Resorptionsrate

Zur Bestimmung der Embryonen-Resorptionsrate (Abortrate) bei trächtigen Mäusen wurden die Tiere an Trächtigkeitstag E10.5 durch CO₂-Einleitung in den Heimatkäfig und anschließende zervikale Dislokation getötet, der Bauchraum eröffnet und der Uterus entnommen. Die Anzahl intakter und absorbierter Feten wurde visuell bestimmt. Ein Abort wurde definiert als eingebluteter oder blasser und deutlich retardierter Fetus. Die Abortrate wurde als Quotient absorbierter Feten und absorbierter + intakter Feten berechnet.

2.6.3 Aufreinigung von Einzelzellsuspensionen aus Organen der Maus

Milz, Plazenta und Uterus

Zur Herstellung von Einzelzellsuspensionen der Milz und der Plazenta wurden diese mit Hilfe eines Spritzenstempels durch ein 100 µm-Zellsieb gedrückt und mit PBS nachgespült. Die Uteri wurden zunächst mithilfe einer Schere zerkleinert und dann ebenfalls durch ein 100 µm-Zellsieb gedrückt. Die Zellsuspensionen wurden gewaschen und es erfolgte eine Erythrozytenlyse mittels Ammoniumchlorid. Anschließend wurden die Zellsuspensionen erneut durch ein 40 µm-Zellsieb gedrückt und gewaschen.

Darm

Zur Herstellung von Einzelzellsuspensionen aus dem Dickdarm wurde dieser zunächst über die gesamte Länge längs eröffnet und der Darminhalt herausgestrichen. Anschließend erfolgten drei Waschschriffe und dann ein Verdau in EDTA-Puffer bei 37°C und 250 rpm, um intestinale Epithelzellen abzulösen. Nach mehrmaligem Spülen mit kaltem PBS wurde der Darm in Liberase-Puffer für 40 Minuten bei 37°C und 250 rpm verdaut und dann für 10 Minuten bei 500 g und 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 40 %igem Percoll aufgenommen, es wurde 80 %iges Percoll unter die Zellsuspension geschichtet und für 20 Minuten bei 860 g und 20°C ohne Beschleunigung und Bremse

zentrifugiert. Anschließend wurde der Zellring zwischen den Percoll-Gradienten abgenommen, gewaschen und die Zellen durchflusszytometrisch analysiert.

2.6.4 Durchflusszytometrie muriner Immunzellen

Die durchflusszytometrische Oberflächenfärbung und Analyse muriner Immunzellen erfolgte wie unter 2.5.3 beschrieben. Die Gatingstrategie für die unterschiedlichen Immunzellpopulationen ist in Abbildung 4 dargestellt. Zusätzlich zur Färbung von Oberflächenmarkern wurde die intrazelluläre Expression von Transkriptionsfaktoren analysiert. Dafür wurden die Zellen anschließend an die Oberflächenfärbung mit dem Foxp3/Transkriptionsfaktor Staining Buffer Set nach Herstellerangaben permeabilisiert, fixiert und mit den intrazellulären Antikörpern gefärbt.

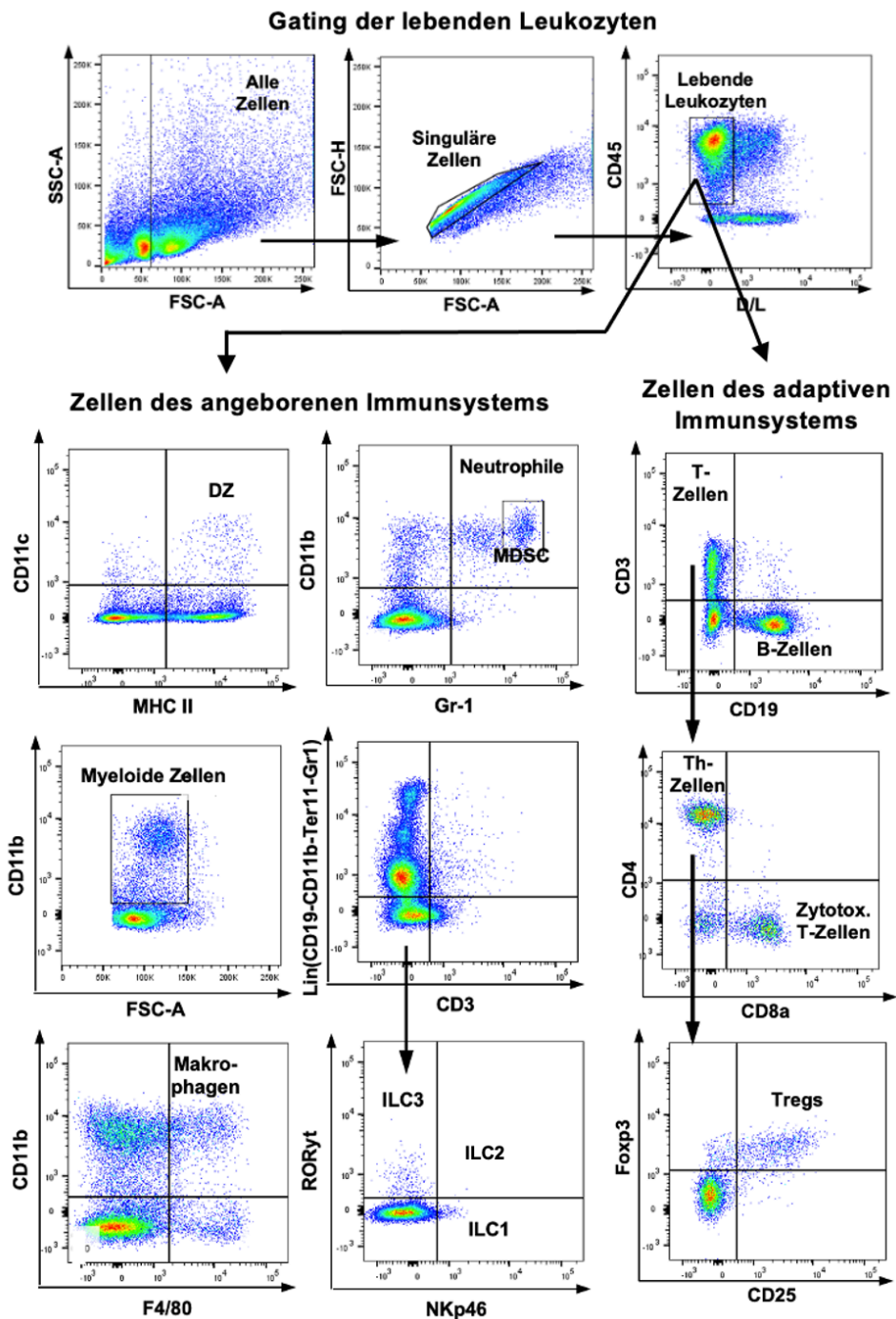


Abbildung 4: Gatingstrategie zur Untersuchung der Immunzellkomposition

Zur Analyse der Immunzellkomposition in verschiedenen Organen wurde zunächst auf singuläre Zellen, dann auf lebende CD45+ Leukozyten gated. Ausgehend davon wurden verschiedene Immunzellen gated. DZ: Dendritische Zellen; MDSC: Myeloide Suppressorzellen; Th-Zellen: T-Helfer-Zellen; Tregs: regulatorische T-Zellen; Zytotox. T-Zellen: Zytotoxische T-Zellen; ILC: Innate lymphoid cells

2.6.5 Statistische Analyse

Die statistische Analyse der *in vitro* und *in vivo* Versuche erfolgte mit GraphPad Prism 8.1. Mithilfe des Shapiro-Wilk-Tests wurde überprüft, ob die zugrundeliegenden Daten einer Normalverteilung unterlagen. Sowohl in den *in vitro* Versuchen als auch in den *in vivo* Versuchen handelte es sich um unverbundene Stichproben. Bei Vergleichen zweier Gruppen wurde bei normalverteilten Daten der unverbundene T-Test, bei nicht-normalverteilten Daten der Mann-Whitney-Test angewendet. Bei einem p-Wert von <0.05 wurde der Unterschied als statistisch signifikant betrachtet. Falls nicht anders beschrieben sind im Text die Mittelwerte \pm Standardabweichung genannt.

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung eines Protokolls zur BEV-Separation aus Stuhl

Zur Separation von BEVs aus Stuhl existierten bisher keine einheitlichen Empfehlungen. In dieser Arbeit wurden daher zunächst verschiedene Protokolle aus der Literatur sowie verschiedene Methoden der Stuhl-Asservierung (frisch nativ, eingefroren nativ und im Stabilisationsmedium DNA/RNA Shield asserviert), verschiedene Vorverarbeitungsschritte und die Aufreinigung mittels Ultrazentrifugation (UZ) oder mittels der Präzipitationslösung ExoQuick (EQ) verglichen.

Nach Isolation von BEVs aus eingefrorenem nativem Stuhl nach sechs verschiedenen Protokollen (s. 2.4.1) wurde zunächst die Proteinausbeute mittels BCA-Assay bestimmt. Der Proteingehalt in den Proben lag nach Aufreinigung mittels UZ zwischen 16,1 mg/g Stuhl und 36,7 mg/g Stuhl (Range=20,6) und damit etwas höher als nach Aufreinigung mittels EQ (zwischen 11,1 mg/g Stuhl und 26,8 mg/g Stuhl, Range=15,7). Zwischen den sechs verschiedenen Protokollen waren keine wesentlichen Unterschiede zu beobachten (s. Tabelle 14) (Abb. 5A). Aufgrund der nur sehr geringen Unterschiede zwischen den verschiedenen Protokollen wurden die weiteren Versuche nach Protokoll II [62] durchgeführt. Auch bezüglich der Stuhlproben-Asservierung zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede in der Proteinausbeute (Abb. 5B). Bei frischem und eingefrorenem nativem Stuhl war die Proteinausbeute aus den BEVs nach Aufreinigung mittels UZ wieder tendenziell höher als nach Aufreinigung mittels EQ, bei Stuhl in Stabilisationsmedium zeigten sich keine Unterschiede.

Insgesamt zeigte keine der Konditionen (Aufreinigungs-Protokoll, Stuhlproben-Asservierung, Isolationsmethode) eine deutliche Überlegenheit bezüglich der Proteinausbeute aus BEVs, weshalb aus Gründen der Praktikabilität auf die Weiteruntersuchung von frischen Stuhlproben verzichtet wurde und nur eingefrorener Stuhl und Stuhl in Stabilisationsmedium weiter untersucht wurden.

Im nächsten Schritt wurden die Vesikelkonzentration und die Vesikelgröße der BEVs mittels Nanoparticle Tracking Analyse (NTA) untersucht. Die Größe der isolierten Vesikel lag zwischen 76,3 nm und 170,0 nm (Range=93,7) (Abb. 5C). Es zeigten sich keine Unterschiede in der Vesikelgröße zwischen nativem Stuhl und Stuhl in Stabilisationsmedium. Ebenso zeigten sich keine Unterschiede in Abhängigkeit von der Art der Stuhl-Asservierung. Die Anzahl an gewonnenen BEVs aus 1 g Stuhl lag zwischen $7,4 \times 10^{10}$ und $8,0 \times 10^{11}$ (Range= $7,28 \times 10^{11}$). Nach Isolation mittels EQ konnten etwas mehr BEVs gewonnen werden als nach Isolation mittels UZ ($2,9 \pm 0,9 \times 10^{11}$ Vesikel pro g Stuhl nach EQ und $1,8 \pm 1,2 \times 10^{11}$ Vesikel pro g Stuhl nach UZ, n=6) (Abb. 5D).

Aufgrund der höheren BEV-Ausbeute nach Isolation mittels EQ wurde im Weiteren diese Isolationsmethode verwendet. Da keine Unterschiede bei der Asservierungs-Methode zu beobachten waren wurden aufgrund der Praktikabilität für die weiteren Versuche BEVs aus Proben in Stabilisationsmedium verwendet.

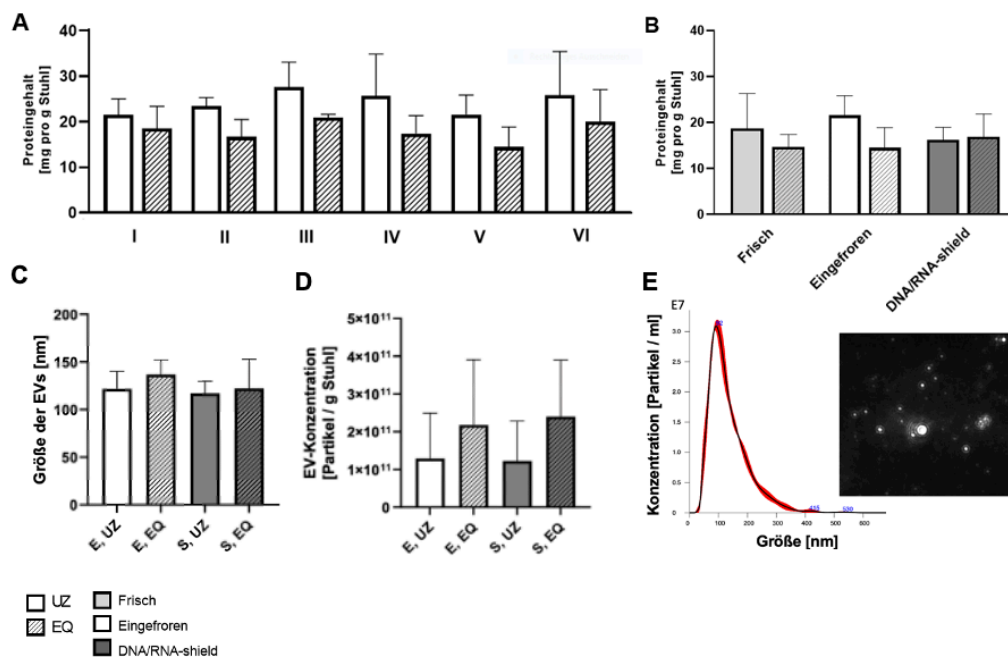


Abbildung 5: Proteinausbeute aus BEVs nach Aufreinigung nach unterschiedlichen Protokollen

BEVs wurden nach unterschiedlicher Asservierung der Stuhlproben und nach Verwendung unterschiedlicher Aufreinigungs-Protokolle (I-VI) aus dem Stuhl isoliert. Die Proteinausbeute wurde mittels BCA-Assay bestimmt. (A) Protein-Ausbeute von BEVs aus eingefrorenem Stuhl in Abhängigkeit von Aufreinigungs-Protokoll und der Isolationsmethode. (B) Protein-Ausbeute in Abhängigkeit von der Asservierungs-Methode und der Isolationsmethode. (C) Größenverteilung

und (D) Menge an BEVs, welche aus 1g Stuhl gewonnen wurden in Abhängigkeit von Isolationsmethode und Asservierungs-Methode. (E) Beispielhaftes Histogramm der Größe von mittels EQ aufgereinigten BEVs aus der NTA mit beispielhaftem Standbild aus der NTA. (n=3-6) Abkürzungen: E: BEVs aus eingefrorenem Stuhl; S: BEVs aus Stuhl in Stabilisationsmedium

3.2 Charakterisierung der BEVs

Zum Nachweis eines bakteriellen Ursprungs der BEVs wurde das Vorhandensein der bakteriellen Proteine Endotoxin und LTA in den BEV-Proben mittels ELISA untersucht. Beide Proteine konnten in allen untersuchten Proben nachgewiesen werden (Abb. 6A, n=6-8). Zum Ausschluss eines humanen Ursprungs der BEVs wurde das Vorhandensein des eukaryotischen Strukturproteins β -Actin mittels Western Blot (WB) analysiert. Hierbei konnte kein Nachweis von β -Actin in den Proben erbracht werden (Abb. 6B, n=3).

Zuletzt wurden die nach Protokoll II aus Stuhl in Stabilisationsmedium aufgereinigten BEVs an einem Zeiss LIBRA 120 Transmissions-Elektronenmikroskop untersucht (Abb. 6C). Dies erfolgte durch die Core Facility Elektronenmikroskopie am Universitätsklinikum Tübingen (Birgit Fehrenbacher). Dabei konnten singuläre Vesikel von 26 bis 121 nm Größe identifiziert werden.

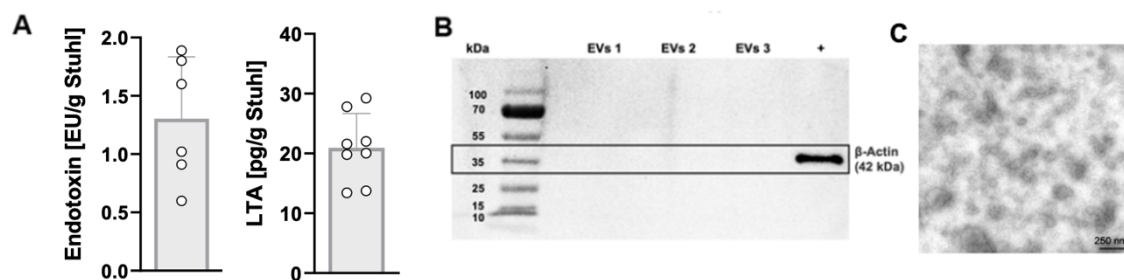


Abbildung 6: BEVs aus Stuhl zeigen bakteriellen Ursprung

In BEVs isoliert aus Stuhl gesunder Erwachsener wurde (A) das Vorkommen von Endotoxin und LTA als bakterielle Zellbestandteile und (B) das Vorhandensein des eukaryotischen Strukturproteins β -Actin untersucht. (n=6-8) (C) Elektronenmikroskopische Aufnahme von aus Stuhl isolierten BEVs einer gesunden erwachsenen Person (n=1).

+ Positivkontrolle

3.3 Untersuchung der Interaktion von BEVs mit T-Zellen

Zur Untersuchung der BEV-Aufnahme durch T-Zellen wurden PBMCs in verschiedenen Verhältnissen und für unterschiedliche Dauer mit CFSE-gefärbten BEVs für eine Stunde inkubiert und die Aufnahme durchflusszytometrisch untersucht (Abb. 7A). Hierbei zeigte sich eine konzentrationsabhängige Zunahme des Anteils CFSE-positiver T-Zellen. Nach 15-minütiger Inkubationszeit waren bei einem Verhältnis von PBMCs zu BEVs von 1:1000 bereits $51,3 \pm 23,2$ % der T-Zellen CFSE-positiv. Ein Maximum an CFSE-positiven T-Zellen war nach 60 Minuten mit $84,9 \pm 7,2$ % erreicht. Danach fiel der Anteil CFSE-positiver Zellen bis auf $10,2 \pm 7,6$ % nach 24 Stunden (Abb. 7B+C). Zur weiteren Visualisierung der Interaktion von T-Zellen erfolgte eine Darstellung am Fluoreszenzmikroskop. Entsprechend den Ergebnissen aus der Durchflusszytometrie konnte hier gezeigt werden, dass CFSE-gefärbte BEVs im Zytoplasma von T-Zellen (Abb. 7D) nachgewiesen werden können.

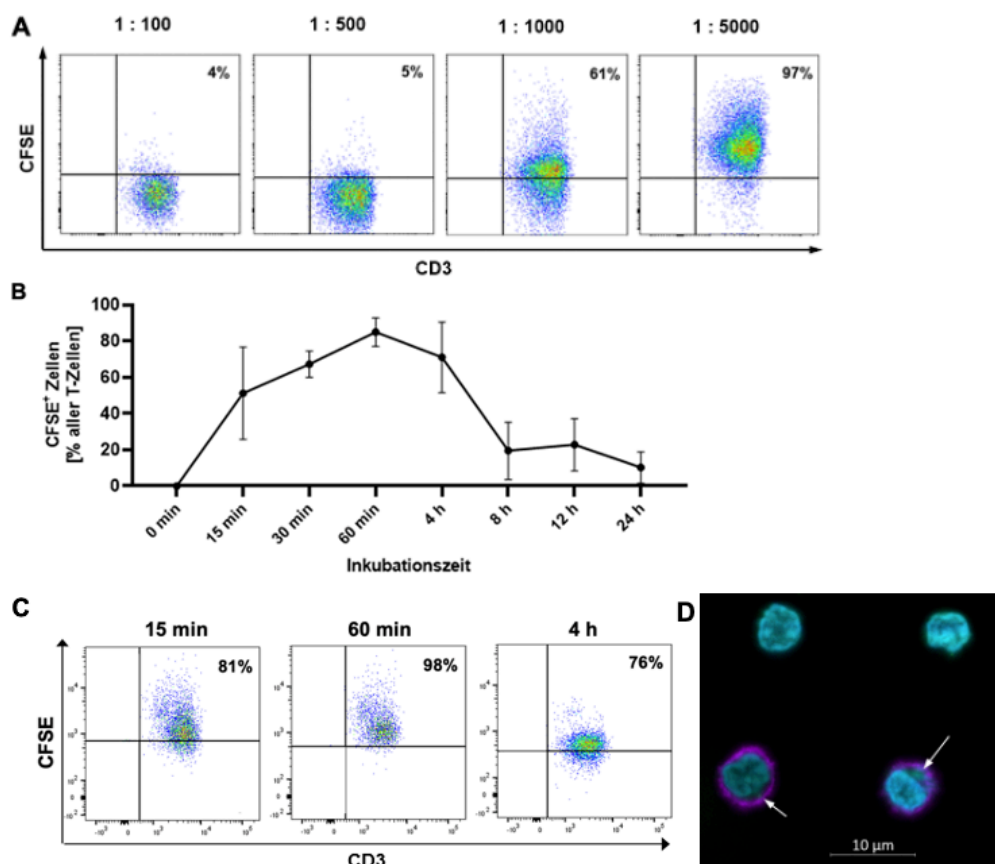


Abbildung 7: Untersuchung der Konzentrations- und Zeitabhängigkeit der Aufnahme von BEVs durch T-Zellen

(A) 1×10^6 PBMCs wurden mit CFSE-gefärbten BEVs in mehreren Konzentrationen für eine Stunde inkubiert und der Anteil CFSE⁺ T-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Gezeigt sind exemplarische FACS-Plots (n=6). (B) Anteile CFSE⁺ T-Zellen nach Inkubation von PBMC mit BEVs im Verlauf von 24 Stunden mit (C) exemplarischen FACS-Plots nach 15-minütiger, 60-minütiger und 4-stündiger Inkubation. (D) Von T-Zellen internalisierte BEVs (grün). Pfeile zeigen internalisierte BEVs (n=3-6).

3.4 Komposition von T-Helferzellen nach Stimulation mit BEVs aus Stuhl Schwangerer und nicht-schwangerer Kontrollen

Zur Untersuchung der Beeinflussung der T-Helferzell-Komposition durch BEVs wurden PBMCs gesunder Erwachsener über Nacht mit BEVs aus dem Stuhl von Schwangeren und nicht-schwangeren Kontrollen im Verhältnis von ca. 1:500 inkubiert und anschließend die Anteile von Th1, Th2, Th17 und Tregs an allen Th-Zellen anhand von Oberflächenmarkern bestimmt (Abb. 8).

Die Anteile von Th1 ($5,0 \pm 3,2$ % (K, Kontrollgruppe) vs. $4,7 \pm 2,5$ % (S, Schwangere)) und Th2 ($9,6 \pm 3,7$ % (K) vs. $10,4 \pm 3,6$ % (S)) unterschieden sich nicht zwischen mit Kontroll-BEVs und mit Schwangeren-BEVs stimulierten PBMCs. Für Th17 zeigte sich eine Tendenz zu geringeren Anteilen nach Stimulation mit Schwangeren-BEVs ($7,7 \pm 4,8$ % (K) vs. $6,4 \pm 4,3$ % (S)) und bei Tregs eine Tendenz zu höheren Anteilen nach Stimulation mit Schwangeren-BEVs ($8,8 \pm 4,2$ % (K) vs. $10,4 \pm 4,3$ % (S)), die Unterschiede waren jedoch nicht statistisch signifikant.

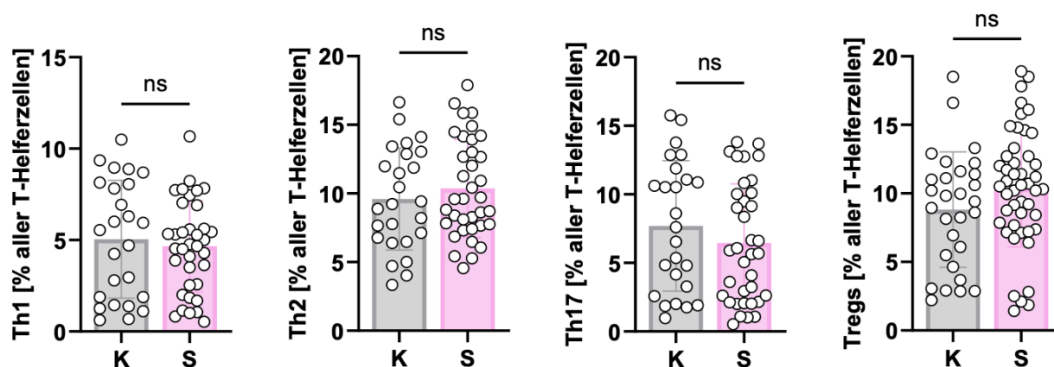


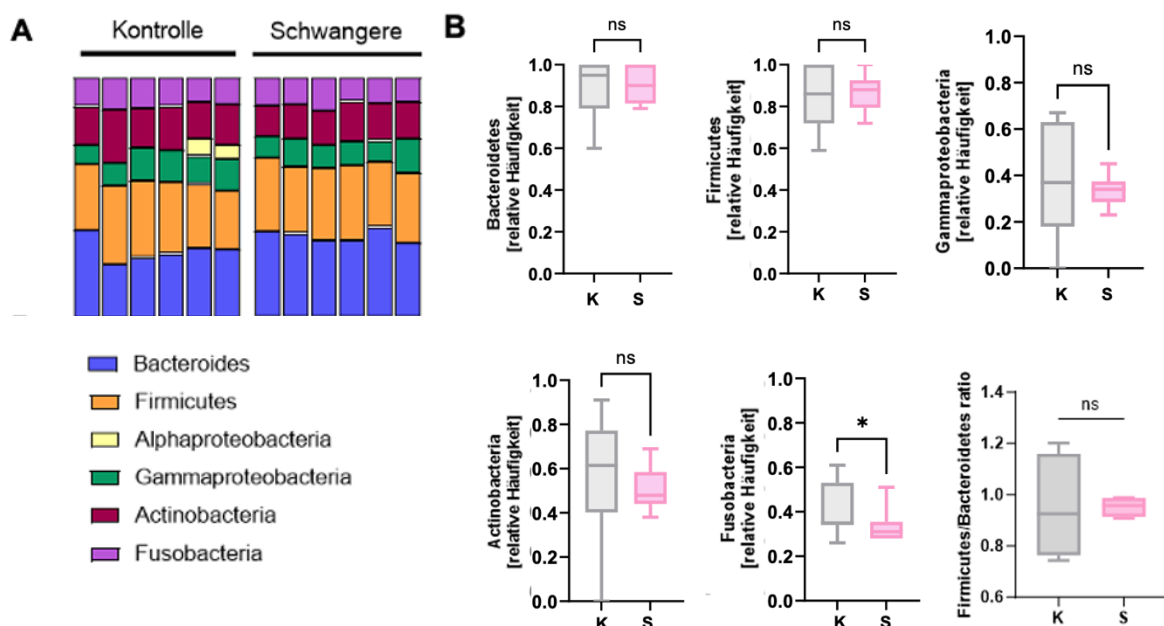
Abbildung 8: Th-Zell-Komposition nach Stimulation mit BEVs Schwangerer und nicht-schwangerer Kontrollen

PBMCs wurden für 24 Stunden mit BEVs aus dem Stuhl Schwangerer bzw. nicht-schwangerer Kontrollen inkubiert und die Anteile von Th1, Th2, Th17 und Tregs an allen Th-Zellen durchflusszytometrisch ermittelt. Punkte-Balken-Diagramme zeigen den Anteil der verschiedenen Th-Zell-Subpopulationen in PBMCs nach Stimulation mit Kontroll-BEVs (K) und Schwangeren-BEVs (S). Mann-Whitney-Test, ns: nicht signifikant (n=25-47).

3.5 Mikrobielle Zusammensetzung von BEVs aus Stuhl Schwangerer

Zur Untersuchung der Herkunft der BEVs Schwangerer und Nicht-Schwangerer erfolgte eine qPCR-Analyse der Expression der 16s rRNA-Gene der sechs wichtigsten Phyla der im menschlichen Mikrobiom vorkommenden Bakterien (Abb. 9A). In BEVs Schwangerer wurde signifikant weniger von *Fusobacteria* stammende 16sRNA detektiert als in BEVs nicht-schwangerer Kontrollpersonen ($33,0 \pm 7,0\%$ vs. $42,0 \pm 13,0\%$, $n=6-11$, $p<0,05$). Bei den anderen Phyla zeigten sich keine Unterschiede (Abb. 9B).

Es wurde ein ähnlicher Gesamtproteingehalt in den BEVs aus dem Stuhl nicht schwangerer Kontrollpersonen und schwangerer Frauen festgestellt. Weder der Endotoxin- noch der LTA-Gehalt unterschied sich signifikant zwischen BEVs nicht schwangerer Kontrollpersonen und schwangerer Frauen ($1,3 \pm 0,5$ vs. $0,8 \pm 0,05$ EU/g Stuhl für Endotoxin und $20,9 \pm 5,7$ vs. $21,0 \pm 5,9$ pg/g Stuhl für LTA, Abb. 9E+F).



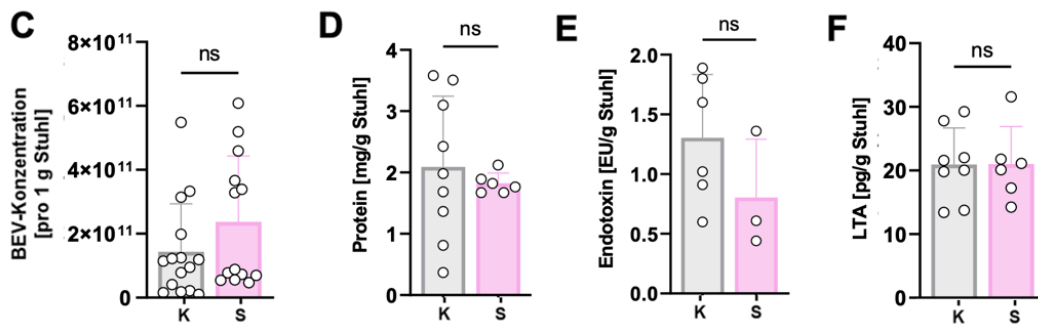


Abbildung 9: Bakterielle Zusammensetzung von BEVs Schwangerer und nicht schwangerer Kontrollen

DNA aus BEVs isoliert aus dem Stuhl nicht-schwangerer Kontrollen (K) und Schwangerer (S) wurde mittels qPCR auf die wichtigsten Phyla des intestinalen Mikrobioms untersucht. (A) Gestapelte Säulendiagramme zeigen die Verteilung der untersuchten Phyla. (B) Boxplots zeigen die relative Häufigkeit einzelner Phyla normiert auf die gesamte vorhandene 16s rRNA im Vergleich der beiden Gruppen (n=6). (C-F) zeigen die BEV-Konzentration, den Proteingehalt, den Endotoxin-Gehalt und die LTA-Menge pro Gramm Stuhl (n=3-16). Mann-Whitney-Test, ns: nicht signifikant, *p < 0,05

3.6 Komposition von T-Helferzellen nach Stimulation mit BEVs aus Stuhl von RSA-Patientinnen

Zur Untersuchung des Einflusses von BEVs aus dem Stuhl von Patientinnen mit RSA auf die T-Helferzell-Komposition wurden PBMCs mit BEVs aus dem Stuhl von nicht-schwangeren Frauen mit mindestens einer stattgehabten komplikationslosen Schwangerschaft und RSA-Patientinnen inkubiert und die Anteile von Th1, Th2, Th17 und Tregs an allen Th-Zellen anhand von Oberflächenmarkern durchflusszytometrisch bestimmt. Es zeigte sich kein Unterschied im prozentualen Anteil an Th1 ($4,9 \pm 3,4$ % (K) vs. $5,7 \pm 3,5$ % (RSA)), Th2 ($9,7 \pm 3,9$ % (K) vs. $10,5 \pm 5,2$ % (RSA)), Th17 ($8,1 \pm 4,9$ % (K) vs. $6,5 \pm 4,7$ % (RSA)) oder Tregs ($8,4 \pm 3,9$ % (K) vs. $8,9 \pm 5,3$ % (RSA)) an allen Th-Zellen nach Inkubation mit BEVs aus dem Stuhl von RSA-Patientinnen und Kontrollprobandinnen (Abb. 10).

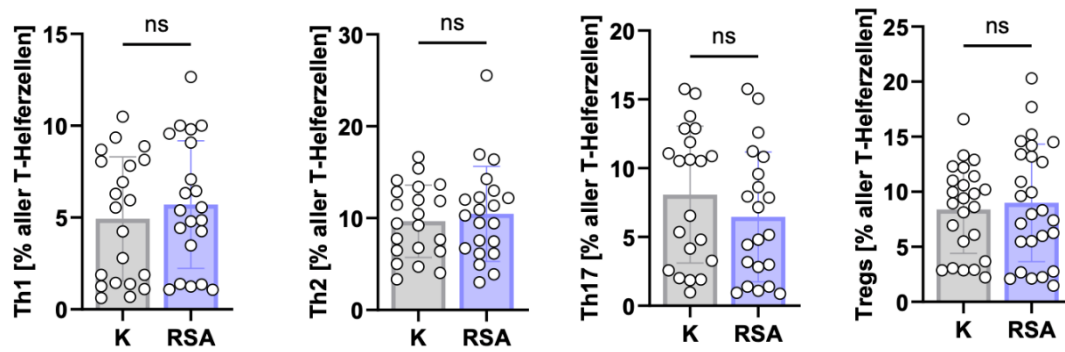


Abbildung 10: Th-Zell-Komposition nach Stimulation mit BEVs aus dem Stuhl von RSA-Patientinnen

PBMCs wurden für 24 Stunden mit BEVs aus dem Stuhl gesunder nicht-schwangerer Frauen mit mindestens einer stattgehabten komplikationslosen Schwangerschaft (K) und RSA-Patientinnen (RSA) inkubiert. Punkte-Balken-Diagramme zeigen die Anteile von Th1, Th2, Th17 und Tregs an allen Th-Zellen. Mann-Whitney-Test (Th17, Tregs) Unverbundener T-Test (Th1, Th2), ns: nicht signifikant (n=21-26)

3.7 Mikrobielle Zusammensetzung von BEVs aus dem Stuhl von RSA-Patientinnen

BEVs von RSA-Patientinnen enthielten signifikant weniger DNA von *Bacteroidetes* ($66,3 \pm 7,8\%$ vs. $83,0 \pm 14,9\%$, n=5-6, p=0,0403), *Actinobacteria* ($35,0 \pm 9,6\%$ vs. $64,7 \pm 19,8\%$, n=6, p=0,0083) und *Fusobacteria* ($28,5 \pm 5,7\%$ vs. $41,2 \pm 12,7\%$, n=6-7, p=0,0386) als BEVs von Kontrollprobandinnen. Die übrigen Phyla unterschieden sich nicht signifikant (Abb. 11).

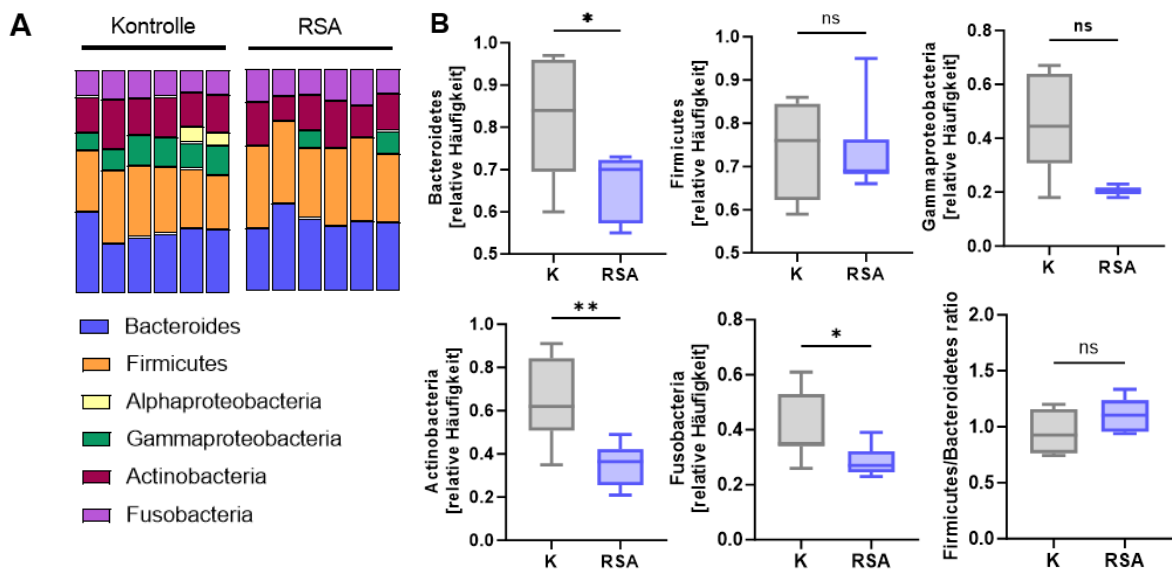


Abbildung 11: BEVs von RSA-Patientinnen zeigen eine veränderte bakterielle Komposition
DNA aus BEVs aus dem Stuhl gesunder nicht-schwangerer Kontrollen (K) bzw. aus dem Stuhl von RSA-Patientinnen (RSA) wurde mittels qPCR auf das Vorkommen der wichtigsten Phyla des intestinalen Mikrobioms untersucht. (A) Gestapelte Säulendiagramme zeigen die Anteile der untersuchten Phyla. (B) Boxplots zeigen die relative Häufigkeit einzelner Phyla im Vergleich der beiden Gruppen. Mann-Whitney-Test, ns: nicht signifikant, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ ($n=5-7$)

3.8 Komposition von T-Helferzellen nach Stimulation mit BEVs aus Stuhl von Schwangeren mit PE

Zur Untersuchung des Einflusses von BEVs aus dem Stuhl Schwangerer mit PE im Vergleich zu gesunden Schwangeren auf die T-Helferzellen wurden PBMCs mit BEVs aus Stuhl Schwangerer mit bzw. ohne PE inkubiert und die prozentualen Anteile von Th1, Th2, Th17 und Tregs an allen Th-Zellen anhand von Oberflächenmarkern durchflusszytometrisch bestimmt.

Auch hier zeigte sich kein Unterschiede im Anteil an Th1 ($4,6 \pm 2,9$ % (S) vs. $4,9 \pm 2,4$ % (PE)), Th2 ($10,5 \pm 3,7$ % (S) vs. $9,5 \pm 4,0$ % (PE)), Th17 ($6,9 \pm 4,5$ % (S) vs. $8,1 \pm 3,5$ % (PE)) und Tregs ($9,1 \pm 4,6$ % (S) vs. $10,8 \pm 2,5$ % (PE)) nach Inkubation mit BEVs aus dem Stuhl von gesunden Schwangeren und Schwangeren mit PE (Abb. 12).

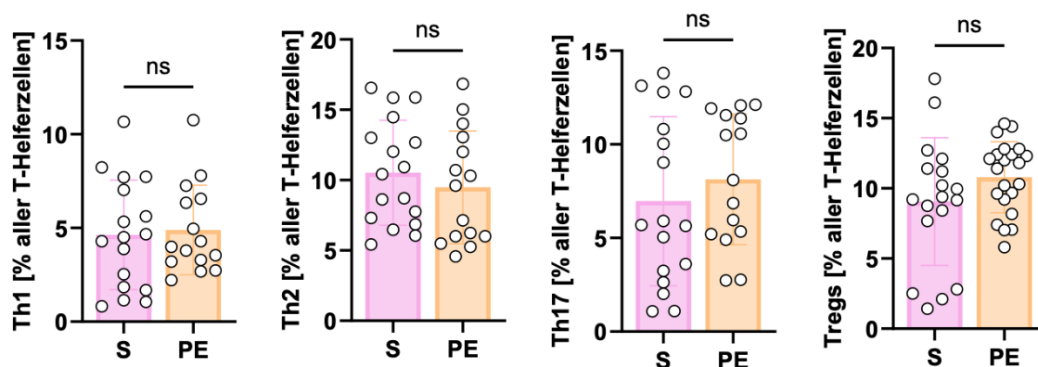


Abbildung 12: Th-Zell-Komposition nach Inkubation von PBMCs mit BEVs von PE-Patienten und gesunden Schwangeren

PBMCs wurden für 24 Stunden mit BEVs aus dem Stuhl gesunder Schwangerer (S) oder BEVs aus dem Stuhl Schwangerer mit PE (PE) inkubiert. Punkte-Balken-Diagramme zeigen die Anteile von Th1, Th2, Th17 und Tregs an allen Th-Zellen. Mann-Whitney-Test, ns: nicht signifikant, ($n=15-22$)

3.9 Mikrobielle Zusammensetzung von BEVs aus dem Stuhl von Schwangeren mit PE

Bei Untersuchung der mikrobiellen Komposition von BEVs aus dem Stuhl von PE-Patientinnen im Vergleich zu BEVs aus dem Stuhl gesunder Schwangerer zeigten sich weniger *Firmicutes* in BEVs aus dem Stuhl Schwangerer mit PE im Vergleich zu BEVs aus dem Stuhl gesunder Schwangerer ($79,0 \pm 5,5\%$ vs. $86,7 \pm 7,1\%$, $n=6-9$, $p=0,0176$). Die übrigen Phyla unterschieden sich nicht signifikant (Abb. 13).

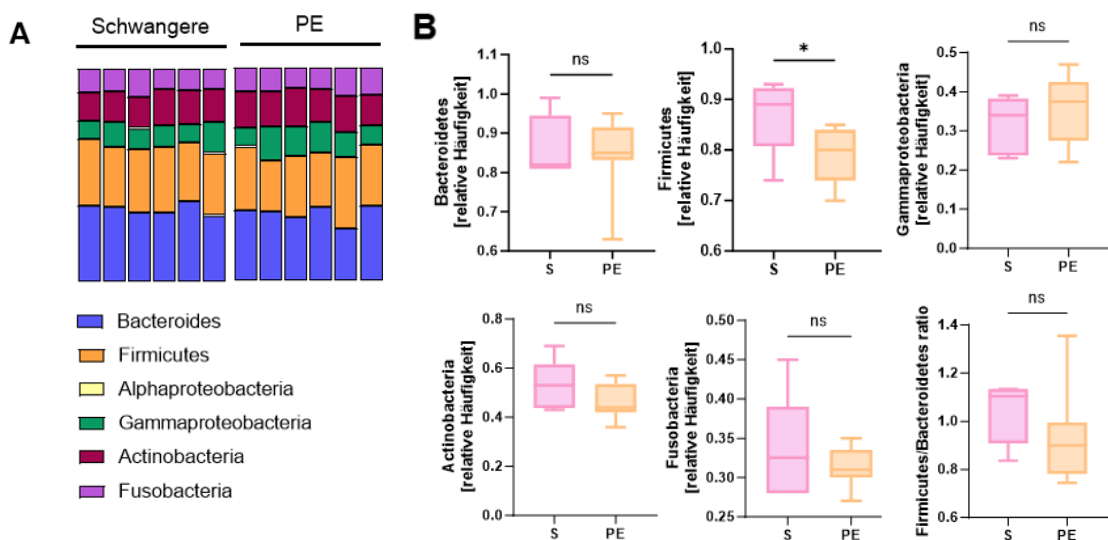


Abbildung 13: Unterschiede der mikrobiellen Komposition von BEVs aus dem Stuhl Schwangerer mit PE und aus dem Stuhl gesunder Schwangerer

DNA aus BEVs aus dem Stuhl gesunder Schwangerer (S) und Schwangerer mit Präeklampsie (PE) wurde mittels qPCR auf das Vorkommen der wichtigsten Phyla des intestinalen Mikrobioms untersucht. (A) Gestapelte Säulendiagramme zeigen die Anteile der Phyla an der gesamten bakteriellen DNA. (B) Boxplots zeigen die relative Häufigkeit einzelner Phyla im Vergleich der beiden Gruppen normiert auf die gesamte 16s rRNA. Mann-Whitney-Test, ns: nicht signifikant ($n=6-9$), * $p < 0,05$

3.10 Mikrobielle Zusammensetzung muriner Kotproben nach Antibiotika-Therapie

Im zweiten Teil der Arbeit sollte die Auswirkung einer Antibiotika-induzierten Dysbiose auf die maternale Immunzellkomposition und den Schwangerschaftserfolg im Mausmodell untersucht werden. Hierzu erhielten Mäuse ab ihrer Geburt eine Kombination aus Ampicillin und Gentamicin durch Supplementation des Trinkwassers (im Folgenden Abgekürzt mit AB). Die Mäuse wurden dann ab einem Alter von 8 Wochen verpaart. Ab dem Zeitpunkt der Plug-Positivität wurde die Antibiotikatherapie beendet. Zur Untersuchung der Auswirkung der AB-Behandlung auf die Zusammensetzung des intestinalen Mikrobioms wurden Kotproben an E10.5 gewonnen und mittels qPCR-Analyse die Expression der 16s rRNA-Gene der sechs wichtigsten bakteriellen Phyla untersucht (Abb. 14)

Dabei zeigten sich keine Unterschiede für die Häufigkeiten einzelner Phyla zwischen unbehandelten Kontrolltieren und der AB-Gruppe.

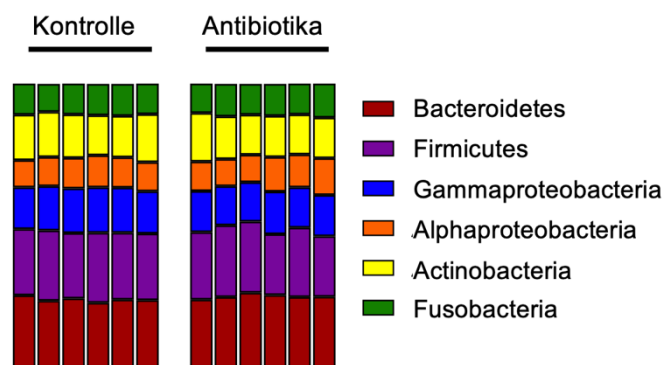


Abbildung 14: Bakterielle Zusammensetzung muriner Kotproben an E10.5

Mit Antibiotika behandelte Mäuse bzw. unbehandelte Kontrolltiere wurden an Tag E10.5 der Trächtigkeit getötet. Kotproben wurden mittels qPCR auf die wichtigsten Phyla des intestinalen Mikrobioms untersucht. Gestapelte Säulendiagramme zeigen die Verteilung der untersuchten Phyla (n=18).

3.11 Eine Antibiotika-Behandlung führt zu keiner erhöhten Abortrate bei Mäusen

Zur Bestimmung der Abortrate wurden unbehandelte bzw. mit Antibiotika behandelte Mäuse an Trächtigkeitstag E10.5 getötet, die Abortrate visuell bestimmt und die Immunzellen durchflusszytometrisch analysiert.

Es zeigte sich kein Unterschied im Anteil der Tiere mit mindestens einem Abort (40% Kontrollgruppe vs. 35,7% AB-Gruppe, Abb. 15A) und in der Abortrate (9,2 ± 14,6% Kontrollgruppe vs. 7,4 ± 12,8% AB-Gruppe, n=14-15, p=0,3588, Abb. 15B) zwischen den AB-behandelten Tieren und den Kontrolltieren. Auch die Anzahl der intakten Feten unterschied sich nicht (7,6 ± 2,6 Feten Kontrollgruppe vs. 8 ± 1,6 Feten AB-behandelte Gruppe (n=14-15, p=0,3337, Abb. 15C).

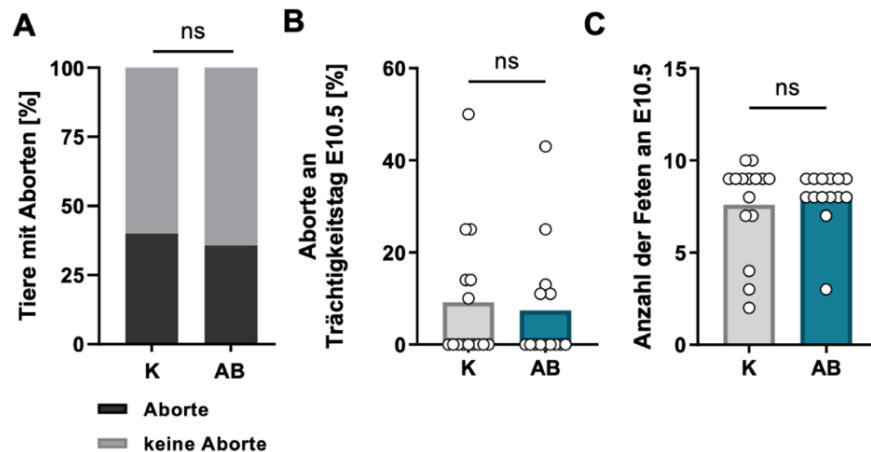


Abbildung 15: Trächtigkeitsverlauf nach Antibiotika-Behandlung

C57Bl/6J-Mäuse wurden ab ihrer Geburt mit einer Kombination aus Ampicillin und Gentamicin durch Supplementation des Trinkwassers behandelt. Ab einem Alter von 8 Wochen erfolgte die Plug-Verpaarung. An Trächtigkeitstag E10.5 wurden die Tiere getötet und die Anzahl intakter Feten und abortierter Feten wurde visuell ermittelt. (A) Anteil der Tiere mit mindestens einem Abort. (B) Abortrate als Anteil abortierter Feten an allen angelegten Feten und (C) Anzahl der vitalen Feten an E10.5. Dargestellt sind die Einzelwerte (weiße Punkte) sowie der Mittelwert für die unbehandelten Kontrolltiere (K) und die AB-behandelten Tiere (AB). Mann-Whitney Test, ns: nicht signifikant (n=14-15).

3.12 Eine Antibiotika-Behandlung führt zu einer veränderten Immunzellkomposition bei trächtigen Mäusen

Es zeigte sich ein deutlicher Einfluss der Antibiotika-Behandlung auf die Immunzellkompositionen in Milz, Dickdarm, Uterus und Plazenta (Abb. 16). Diese waren insbesondere durch die Expansion myeloider Populationen in der AB-Gruppe, aber auch durch Beeinflussung der Zellen des adaptiven Immunsystems, dendritischer Zellen und angeborener lymphoider Immunzellen gekennzeichnet. In den folgenden Abschnitten werden die beobachteten Veränderungen detailliert beschrieben.

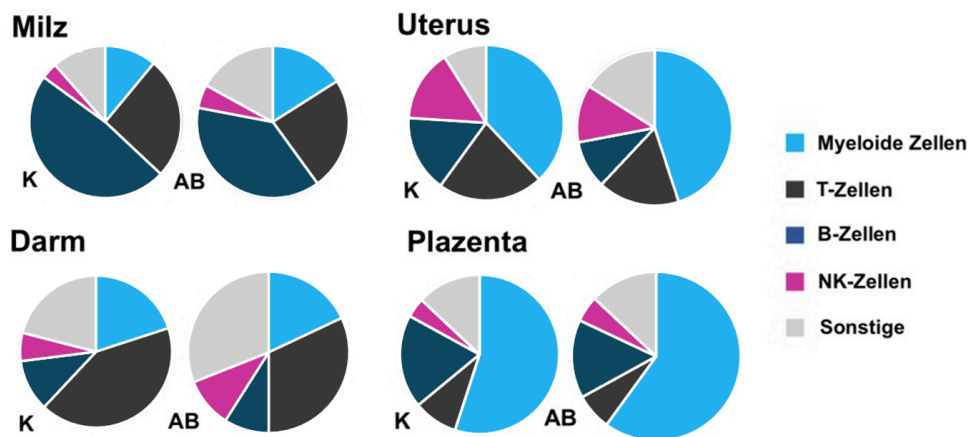


Abbildung 16: Immunzellpopulationen in Organen der Maus

Mäuse wurden an E10.5 der Trächtigkeit getötet, Milz, Darm, Uterus und Plazenten entnommen und jeweils zu Einzelzellsuspensionen verarbeitet. Daraus wurden die Anteile myeloider Zellen, T-Zellen, B-Zellen und NK-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Die Kreisdiagramme zeigen die relativen Anteile der verschiedenen Immunzellen in unbehandelten Kontrolltieren (K) und AB-behandelten Tieren (AB).

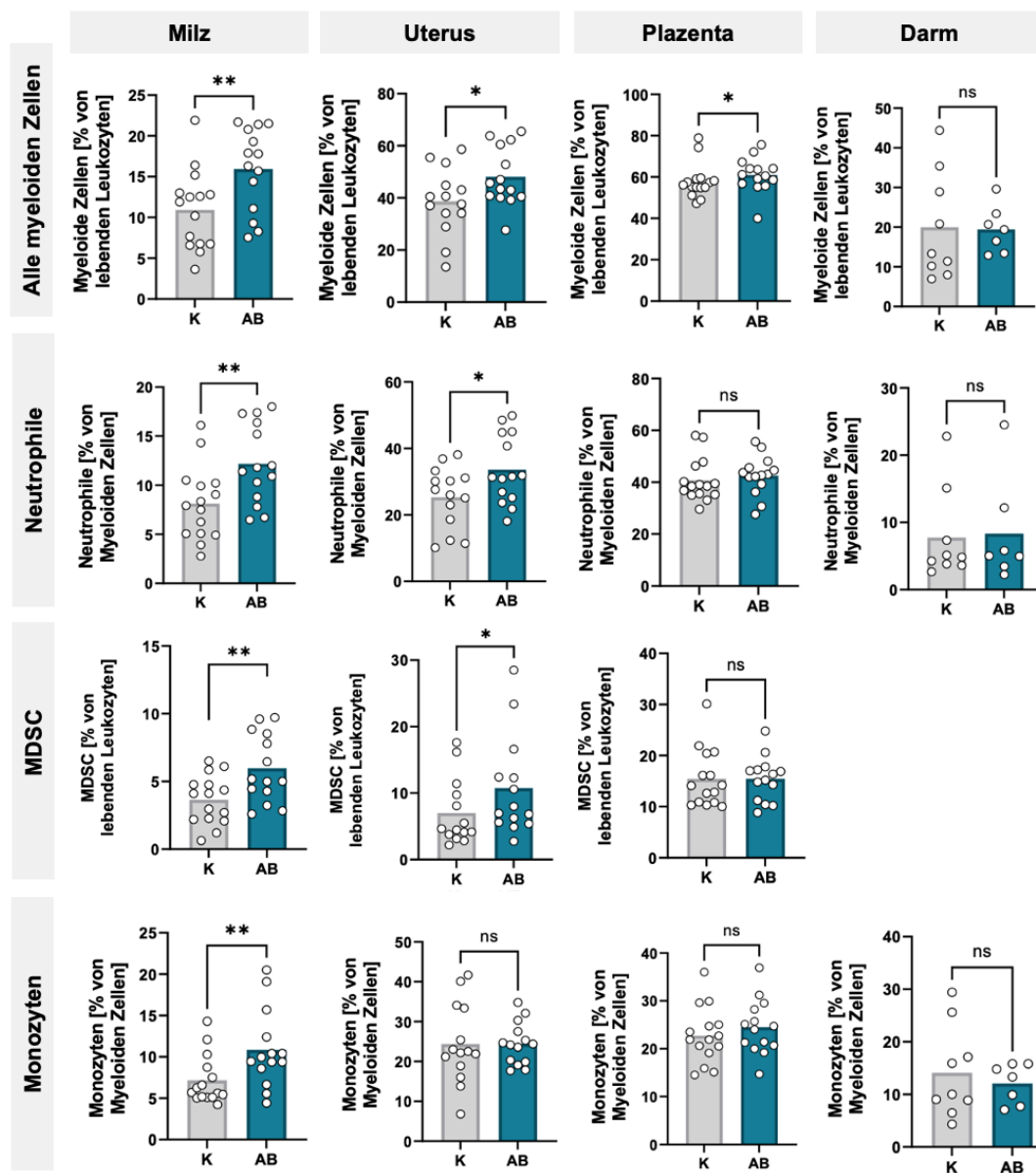
3.12.1 Eine Antibiotika-Behandlung führt zu einer Expansion myeloider Zellpopulationen

Bei den AB-behandelten Mäusen zeigte sich ein signifikant erhöhter Anteil myeloider Zellen an den Gesamt-Leukozyten in Milz, Uterus und Plazenta im Vergleich zu den Kontrolltieren (Milz: $15,9 \pm 5,1\%$ vs. $10,9 \pm 4,8\%$, $n=14-15$, $p=0,0078$, Uterus: $48,0 \pm 11,3\%$ vs. $38,6 \pm 12,8\%$, $n=14$, $p=0,0256$, Plazenta: $61,0 \pm 8,5\%$ vs. $57,9 \pm 8,4\%$, $n=14-15$, $p=0,0277$). Im Darm fanden sich keine Unterschiede im Anteil der myeloiden Zellen an allen Leukozyten (Abb. 17).

Insbesondere war der Anteil neutrophiler Zellen bei den AB-behandelten Tieren erhöht (Milz $12,2 \pm 4,1\%$ vs. $8,1 \pm 3,7\%$, $n=14-15$, $p=0,0034$, Uterus $33,6 \pm 10,4\%$, vs. $25,3 \pm 9,2\%$, $n=14-15$, $p=0,0345$, Plazenta: $42,5 \pm 7,6\%$ vs. $40,7 \pm 8,3\%$). Im Darm zeigten sich auch hier keine Unterschiede. Als Subpopulation der neutrophilen Zellen waren myeloide Suppressorzellen (MDSC) in Milz und Uterus bei den AB-behandelten Tieren ebenfalls erhöht (Milz $6,0 \pm 2,5\%$ AB-Gruppe vs. $3,6 \pm 1,8\%$ Kontrollgruppe, $n=14-15$, $p=0,006$; Uterus $10,8 \pm 7,5\%$ AB-Gruppe vs. $7,0 \pm 5,0\%$ Kontrollgruppe, $n=14$, $p=0,0345$). In der Plazenta wurde kein Unterschied beobachtet. Im Darm war der Anteil von MDSC so gering, dass keine Auswertung möglich war.

Monozyten waren in der Milz AB-behandelter Tiere ebenfalls erhöht ($10,9 \pm 4,7\%$ AB-Gruppe vs. $7,1 \pm 3,0\%$ Kontrollgruppe, $n=14-15$, $p=0,0067$), in Uterus, Plazenta und Darm zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

Bei Tieren mit AB-Behandlung war ein signifikant erhöhter Anteil uteriner ($13,7 \pm 3,4\%$ vs. $11,3 \pm 4,2\%$, $n=14$, $p=0,0241$) und plazentarer ($13,5 \pm 2,2\%$ vs. $11,9 \pm 2,2\%$, $n=14-15$, $p=0,0339$) dendritischer Zellen (DC) zu beobachten. In der Milz und im Darm blieb der Anteil von DC durch die AB-Behandlung unbeeinflusst (Abb. 17).



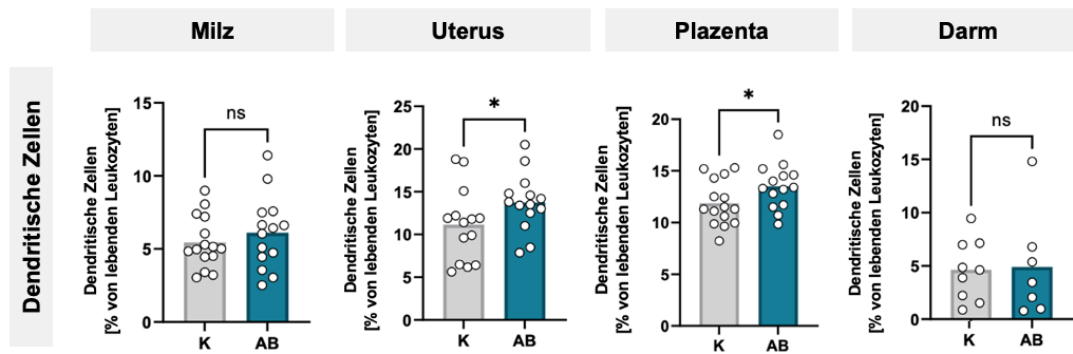


Abbildung 17: Erhöhte Anteile myeloider Zellen bei trächtigen AB-behandelten Mäusen.

Die Balkendiagramme zeigen den Anteil aller myeloider Zellen und den Anteil von Neutrophilen, MDSC, Monozyten und dendritischen an allen lebenden Leukozyten bzw. myeloider Zellen in Einzelzellsuspensionen von Milz, Uterus, Plazenta und Darm nach Antibiotika-Substitution bzw. in der unbehandelten Kontrollgruppe. Dargestellt sind die Einzelwerte (weiße Punkte) sowie der Mittelwert für die Gruppen der unbehandelten Kontrolltiere (K) und der Antibiotika-behandelten Tiere (AB). Mann-Whitney Test, ns = nicht signifikant (n=14-15).

3.12.2 Eine Antibiotika-Behandlung führt zu Veränderungen im Vorkommen von ILC

In Milz und Plazenta der AB-behandelten Tiere zeigte sich ein signifikant erhöhter Anteil von angeborenen lymphoiden Zellen Typ 1 (innate lymphoid cells, ILC1) im Vergleich zu den Kontrolltieren (Milz $5,6 \pm 4,1\%$ vs. $3,2 \pm 1,9\%$, n=7-15, p=0,0035 und Plazenta $4,0 \pm 1,2\%$ vs. $2,8 \pm 0,9\%$, n=7-15, p=0,0013). Im Darm und im Uterus zeigten sich keine Unterschiede (Abb. 18).

Bei ILC2, von denen in allen Organen nur wenige Zellen detektiert wurden, zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (Abb. 18).

Es wurde ein signifikant erhöhter Anteil von ILC3 in der Milz trächtiger Mäuse der AB-Gruppe beobachtet ($2,9 \pm 1,3\%$ vs. $2,0 \pm 0,9\%$, n=7-15, p=0,0307), während diese im Darm vermindert vorkamen ($13,4 \pm 9,5\%$ in der AB-Gruppe vs. $18,2 \pm 5,3\%$ in der Kontrollgruppe, n=7-15, p=0,0356). In Uterus und Plazenta waren keine Unterschiede im Anteil der ILC3 zu beobachten.

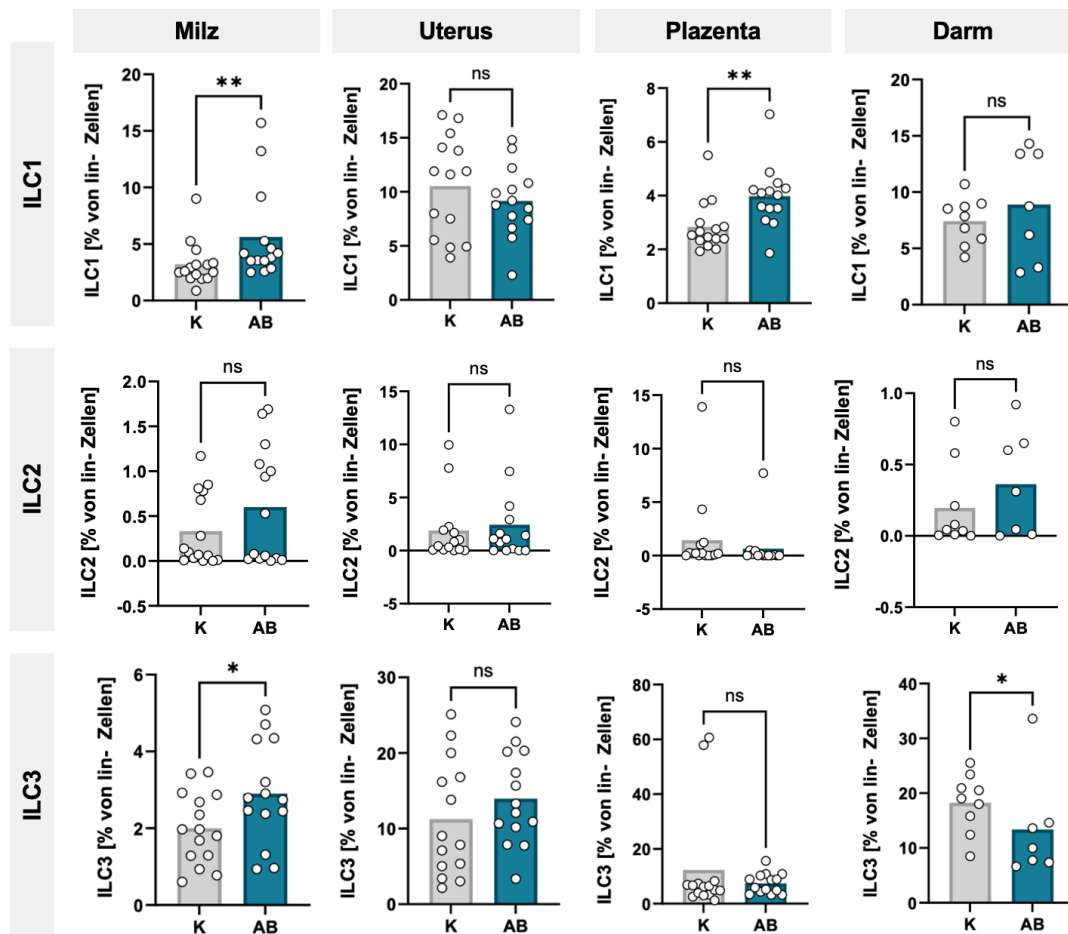


Abbildung 18: Einfluss einer AB-Therapie auf das Vorkommen von ILC

Anteil von ILC1, ILC2 und ILC3 an allen lin-Zellen in Milz, Uterus, Plazenta und Darm. Dargestellt sind die Einzelwerte (Punkte) sowie der Mittelwert für die Gruppen der unbehandelten Kontrolltiere (K) sowie der Antibiotika-behandelten Tiere (AB). Mann-Whitney Test, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, ns = nicht signifikant (n=7-15).

3.12.3 Leichte Veränderungen im Vorkommen von B- und T-Zellen nach Antibiotika-Behandlung

Bei B- und T-Zellen zeigten sich nur geringfügige Veränderungen durch die AB-Behandlung (Abb. 19) mit verminderten T-Zellen im Darm ($29,9 \pm 10,3\%$ vs. $44,1 \pm 13,0\%$, n=7-9, $p = 0,0156$) und verminderten B-Zellen in der Milz im Vergleich zu den Kontrolltieren ($39,2 \pm 11,8\%$ vs. $48,8 \pm 8,1\%$, n=14-15, $p = 0,0200$).

Interessanterweise zeigte sich aber im Darm und in der Plazenta ein vermehrter Anteil $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Tregs bei den AB-behandelten Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren (Darm: $3,7 \pm 1,5\%$ vs. $2,5 \pm 1,9\%$, n=7-9, $p = 0,0454$, Plazenta:

8,8 ± 2,9% vs. 6,2 ± 1,9%, n=14-15, p=0,0046). In Milz und Uterus war kein Unterschied zu beobachten.

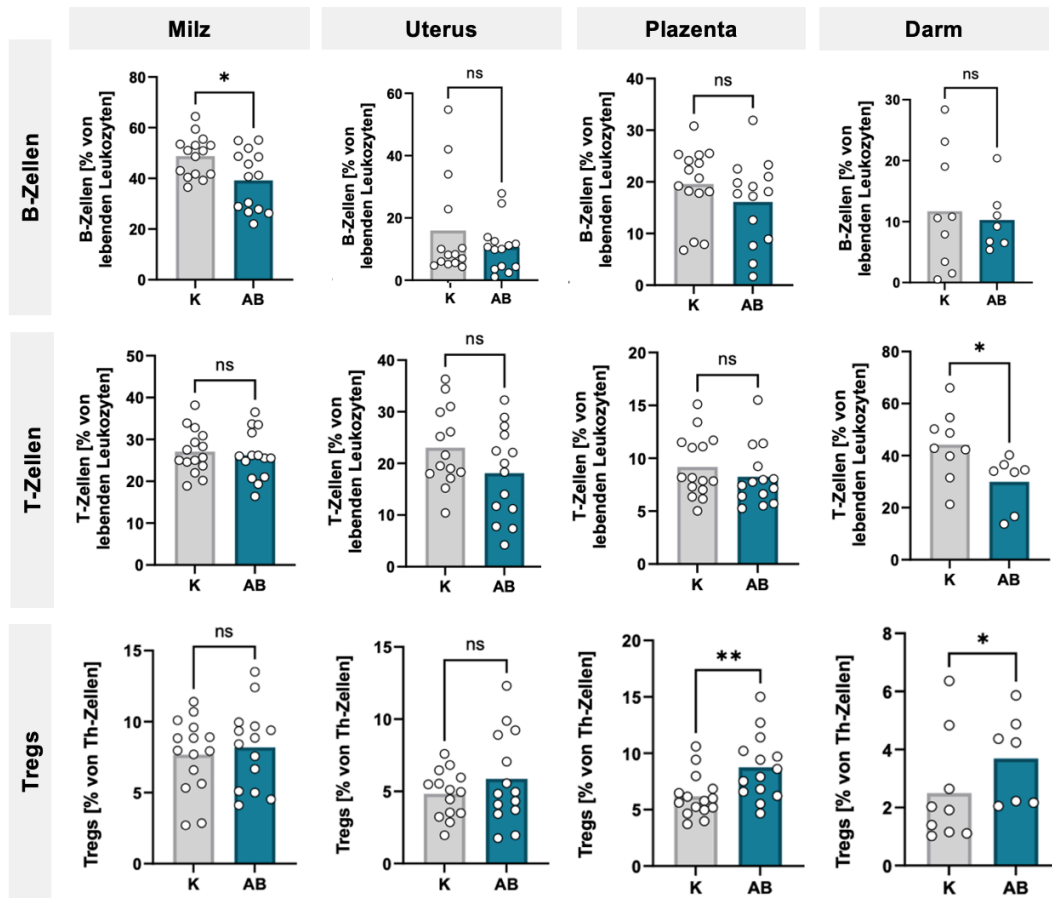


Abbildung 19: Einfluss einer AB-Behandlung auf das Vorkommen von T- und B-Zellen
Anteil der gesamten B-Zellen, T-Zellen und Tregs an allen Th-Zellen in Milz, Darm, Uterus und Plazenta. Dargestellt sind die Einzelwerte (Punkte) sowie der Mittelwert für die Gruppen der unbehandelten Kontrolltiere (K) sowie der Antibiotika-behandelten Tiere (AB). Mann-Whitney Test, *p<0.05, ns = nicht signifikant (n=14-15).

4 Diskussion

In der hier vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, welche Rolle das intestinale Mikrobiom für die Immunregulation während der Schwangerschaft spielt und wie Auswirkungen des Mikrobioms auf das Immunsystem vermittelt werden. Die Arbeit gliedert sich in zwei Teile. Im ersten Teil wurde ein Protokoll zur Isolation von BEVs aus dem Stuhl und zur *in vitro* Kultur dieser mit humanen Immunzellen etabliert, um die Wirkung von BEVs auf T-Helferzellen als eine der für die Schwangerschaft wichtigste Immunzellpopulation zu untersuchen. Im zweiten Teil der Arbeit wurde im Mausmodell der Einfluss einer Antibiotika-induzierten Dysbiose auf die Immunzellkomposition während der Trächtigkeit und die Abortrate untersucht. Im Folgenden sollen die gewonnenen Erkenntnisse diskutiert werden.

4.1 Isolation und Charakterisierung von BEVs aus Stuhl

Für die Isolation von BEVs aus Stuhl existieren bisher keine einheitlichen Empfehlungen, was die Reproduzierbarkeit von Studien erschwert [91]. Für die *in vitro* Versuche dieser Arbeit wurden zur Etablierung eines Protokolls für die BEV-Isolation aus Stuhl daher zunächst verschiedene Methoden der Asservierung von Stuhlproben sowie verschiedene Protokolle für die BEV-Aufreinigung verglichen.

Zur BEV-Ausbeute aus frischem im Vergleich zu eingefrorenem Stuhl existieren unseres Wissens nach bisher keine Daten, ebenso wenig zur Asservierung im Stabilisationsmedium (DNA/RNA-Shield). Unsere Ergebnisse zeigen eine ähnliche Ausbeute an BEVs bei allen drei Asservierungs-Arten. Die Verwendung von Stabilisationsmedium bietet große logistische Vorteile für Studien an BEVs aus Stuhl und vermeidet z.B. die Notwendigkeit des Einhaltens einer Kühlkette beim Probentransport. Damit sind die Ergebnisse dieser Arbeit für nachfolgende Arbeiten mit BEVs von hoher methodischer Relevanz.

Zur Charakterisierung von BEVs empfiehlt die *International Society for Extracellular Vesicles* in der MISEV 2018 Checkliste folgende Maßnahmen: Die

Visualisierung singulärer Vesikel, z.B. mittels Elektronenmikroskopie, zwei quantitative Analysen, z.B. NTA und Proteinbestimmung, den Nachweis eines Transmembranmoleküls und eines intrazellulären Proteins sowie die Untersuchung zu erwartender Kontaminationen [91].

Die Untersuchungen des Proteingehalts der BEVs zeigten eine gute Vergleichbarkeit der Proteinausbeute zwischen allen untersuchten Protokollen (s. 2.4.3), wobei der Proteingehalt nach Isolation mittels UZ höher war als nach Isolation mittels EQ. Eine Studie berichtet von höherem Proteingehalt von EVs bei Isolation mittels EQ im Vergleich zu UZ [92], was in unseren Ergebnissen nicht bestätigt wurde. Da sich die Aufreinigungsschritte der genannten Arbeit jedoch von unserem Protokoll unterschieden, z.B. durch das Fehlen einer zusätzlichen Filtration, ist der Unterschied in der Proteinausbeute möglicherweise darauf zurückzuführen.

Hinsichtlich der Quantifizierung mittels NTA ist für BEVs aus dem Stuhl beschrieben, dass pro Gramm Stuhl ca. $2,5 \times 10^{11}$ Partikel enthalten sind [78, 93]. Unsere Ausbeute lag bei $1,1 \times 10^{11}$ Partikel pro Gramm Stuhl und damit in der Größenordnung der vorbeschriebenen Konzentrationen. Die Konzentrationsmessungen der NTA zeigten eine höhere Vesikel-Ausbeute nach Isolation mittels EQ im Vergleich zur UZ, während die Proteinausbeute nach Aufreinigung mittels UZ höher war. Dies könnte etwa durch Protein-Verunreinigungen bei Aufreinigung mittels UZ erklärt werden, wobei methodische Studien zur EV-Gewinnung aus Blutplasma zeigen, dass Präzipitationsmethoden eher eine geringere Reinheit von EVs im Vergleich zur Isolation mittels UZ aufweisen, dafür aber eine höhere Ausbeute und Intaktheit der EVs [94, 95]. Speziell die BEV-Isolation aus Stuhl wurde bisher nur wenig methodisch untersucht [78, 92] und es bedarf weiterer Arbeiten.

Die Konstellation aus dem positiven Nachweis der untersuchten bakteriellen Membranproteine sowie dem Fehlen des eukaryotischen Proteins β -Actin legt den bakteriellen Ursprung der isolierten BEVs nahe [78, 79]. LPS bzw. Endotoxin und LTA sind typische in Studien zu BEVs verwendete Marker zum Nachweis deren bakteriellen Ursprungs [78, 79, 81]. Die quantitative Einordnung der von

uns gemessenen Konzentrationen von z.B. Endotoxin anhand aktueller Studien wird durch unterschiedliche Angaben, wie den Bezug auf Masse oder Volumen von BEVs oder mangelnde Angaben zur Ausgangsmenge an Stuhl erschwert. Soweit nachvollziehbar liegen unsere Ergebnisse allerdings in einer ähnlichen Größenordnung wie die anderer publizierter Daten [96].

Wir untersuchten mittels qPCR die bakterielle Zusammensetzung der BEVs auf Phylum-Ebene. Anschließende Arbeiten könnten weiter untersuchen, inwiefern sich die durch BEVs repräsentierte Mikrobiomkomposition von der Mikrobiomkomposition des gesamten Stuhls unterscheidet. Eine Studie zeigte, dass BEVs einen höheren Anteil an *Bacteroidetes* und *Proteobacteria* sowie verminderte Anteile an *Firmicutes* und *Actinobacteria* abbilden als im Gesamtstuhl nachzuweisen sind [93]. So stellt sich bei Interpretation unserer Daten die Frage, ob sich im Stuhl Schwangerer tatsächlich weniger *Fusobacteria* finden, oder ob eine veränderte Aktivität mit verminderter BEV-Freisetzung vorliegt.

In Zusammenschau unserer Ergebnisse bezüglich der BEV-Charakterisierung kann mit hoher Wahrscheinlichkeit von einer nach aktuellem Standard akzeptablen Reinheit sowie der bakteriellen Genese der aus Stuhl isolierten EVs ausgegangen werden. Eine weitere Methode zur BEV-Isolation ist die Dichtegradientenzentrifugation, bei der sich Bestandteile einer EV-haltigen Lösung (z.B. Stuhlextrakt) während der Zentrifugation nach Größe und Dichte entlang eines Gradienten anordnen [78, 92]. Diese wurde in unseren Versuchen bisher nicht betrachtet, könnte aber in zukünftigen Arbeiten mit dem von uns etablierten Protokoll verglichen werden, um Reinheit und Ausbeute möglicherweise noch weiter zu verbessern.

4.2 Etablierung eines *in vitro* Modells zur Untersuchung der Interaktion von BEVs und T-Helferzellen

In den uns bekannten Arbeiten war bisher kein direkter Zusammenhang zwischen den in der Schwangerschaft beobachteten Mikrobiom-Veränderungen und der T-Helferzell-Antwort beschrieben. Es ist jedoch bekannt, dass vom intestinalen Mikrobiom stammende BEVs über das Darmepithel hinweg in die

Blutbahn eintreten [61] und sowohl pro- als auch antiinflammatorische Eigenschaften besitzen, z.B. über Bindung von LPS an Toll-like-Rezeptoren (TLR) mit anschließender NFκB-Aktivierung aber auch durch Rekrutierung bzw. Induktion von Tregs [79-81, 97-99]. Wir etablierten daher ein *in vitro* Modell, in dem der Einfluss von aus Stuhl isolierten BEVs auf die T-Helferzell-Komposition untersucht werden kann.

Zunächst wurde die Interaktion von CFSE-gefärbten BEVs mit T-Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Dabei zeigte sich eine konzentrationsabhängige Aufnahme der BEVs durch T-Zellen, welche im Verlauf von 24 Stunden die höchste Sättigung der T-Zellen mit BEVs nach einer Stunde Inkubationszeit zeigte. Die direkte Visualisierung mittels Fluoreszenzmikroskopie bestätigte die Aufnahme CFSE-gefärbter BEVs in T-Zellen. Somit konnte erstmals gezeigt werden, dass T-Zellen zu einer Internalisierung von BEVs fähig sind. In Studien mit verschiedenen Zielzellen sind vielfältige Aufnahmemechanismen von BEVs beschrieben, wie z.B. rezeptorvermittelte Immunzell-Aktivierung, Membranfusion, Makropinozytose und Endozytose [67-69]. Als Mechanismus der T-Zell-Regulation durch BEVs wurde bisher vor allem die rezeptorvermittelte Aktivierung beschrieben [100, 101]. Die hier gewonnenen Ergebnisse weisen darüber hinaus auf Internalisierungsprozesse in T-Zellen hin, was einen Ansatzpunkt für Folgeuntersuchungen darstellt. Weiterführende Versuche unserer Gruppe untersuchen die Wirkung von BEVs in reiner T-Zell-Kultur, also unter Ausschluss einer T-Zell-Aktivierung durch z.B. Monozyten. In diesen Versuchen zeigen sich die gleichen Tendenzen wie in den hier gezeigten Ergebnissen, allerdings mit stärker ausgeprägten Effekten einer Induktion von Th2-Antworten und einer Suppression von Th17-Antworten (zur Publikation eingereicht). Daraus könnte geschlossen werden, dass eine Interaktion mit anderen Immunzellen die durch BEVs vermittelte Th-Zell-Polarisierung wieder bremst.

Die Verteilung von Th1, Th2, Th17 und Tregs wurde anhand der Oberflächenmarker CCR4, CCR6, CXCR3 und CD25 auf CD4⁺ T-Zellen nach Stimulation mit BEVs durchflusszytometrisch analysiert. Th1 wurden als CD4⁺CCR4⁻CXCR3⁺ T-Zellen [102, 103], Th2 als CD4⁺CCR4⁺CXCR3⁻CCR6⁻ T-

Zellen [104], Th17 als CD4⁺CCR4⁺CXCR3⁻CCR6⁺ T-Zellen [105] und Tregs als CD4⁺CD25⁺ definiert. [106, 107]. Die Verwendung von Oberflächenmarkern zur Charakterisierung von Th-Zell-Subpopulationen ist ein anerkanntes Verfahren, wobei sich publizierte Gatingstrategien unterscheiden können [108-110]. Der Goldstandard ist die Charakterisierung von Th-Subtypen anhand ihres intrazellulären Zytokinprofils [111]. Im Rahmen weiterführender Versuche unserer Gruppe konnte gezeigt werden, dass eine Inkubation von T-Zellen mit BEVs Schwangerer die Zytokinproduktion des Th2-Zytokins Interleukin-4 erhöht (zur Publikation eingereicht), was den o.g. Ergebnissen zur den extrazellulär definierten Th-Zell-Populationen entspricht. Tregs werden nach aktuellem Goldstandard als CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T-Zellen definiert [112]. Die Expression von FoxP3 war nach Stimulation mit BEVs tendenziell leicht reduziert im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (Ergebnisse nicht gezeigt). Weitere Untersuchungen zum Einfluss von BEVs auf die Funktion von Tregs sind hier notwendig.

4.3 BEVs Schwangerer modulieren die T-Helferzellkomposition minimal im Vergleich zu Kontroll-BEVs

Bei Betrachtung der Th-Zell-Subpopulationen nach Stimulation mit BEVs von Schwangeren und nicht-schwangeren Kontrollprobandinnen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede, jedoch war tendenziell ein verminderter Anteil von Th17-Zellen nach Stimulation mit BEVs aus dem Stuhl Schwangerer im Vergleich zu einer Stimulation mit Kontroll-BEVs zu beobachten, während Th2-Zellen und Tregs leicht erhöht waren. Wie bereits in der Einleitung beschrieben ist ein vermindertes Vorkommen von Th17-Zellen bei vermehrten Th2-Zellen mit einem günstigen Schwangerschaftsverlauf assoziiert, während vermehrte Th17-Zellen und verminderte Th2-Zellen im Rahmen von Schwangerschaftskomplikationen wie Aborten oder Präeklampsie beschrieben wurden [9, 113]. Die Tendenz zu vermehrten Tregs passt dazu, dass während der gesunden Schwangerschaft Tregs im peripheren Blut in erhöhten Zahlen vorkommen [114, 115].

Die beobachteten Tendenzen deuten darauf hin, dass BEVs aus dem Stuhl Schwangerer Th-Zellen auf eine für die Schwangerschaft vorteilhafte Weise modulieren könnten [116]. Bisher werden die Th-Veränderungen der

physiologischen Schwangerschaft überwiegend durch Effekte fetaler Antigene bzw. plazentarer EVs erklärt [117]. In den letzten Jahren wird zunehmend auch die Modulation durch das intestinale Mikrobiom erforscht. Die Achse der Mikrobiom-vermittelten T-Zell-Regulation besitzt bereits vor der Schwangerschaft eine hohe Bedeutung für die Immunhomöostase [118, 119]. Aktuelle Arbeiten zeigten, dass zahlreiche kommensale Spezies z.B. über spezifische Epitope eine T-Zell-Rezeptor-Aktivierung hervorrufen können und so großen Einfluss auf die Th-Subpopulationen nehmen können [120]. So ist es vorstellbar, dass in der Schwangerschaft auftretende Veränderungen des intestinalen Mikrobioms über BEVs Einfluss auf die Th-Zell-Regulationen nehmen könnten.

Unsere Ergebnisse der qPCR-Analysen zeigten leichte Unterschiede auf Phylum-Ebene mit vermindertem Vorkommen von aus *Fusobacteria* stammenden BEVs in den BEV-Proben Schwangerer. Unseres Wissens nach ist sehr wenig darüber bekannt, wie sich das Mikrobiom von einem nicht schwangeren Zustand zu einer Schwangerschaft verändert. Eine Studie beschrieb, dass erhöhte Häufigkeiten von *Fusobacteria* mit einem ungünstigen Schwangerschaftsverlauf verbunden waren [40]. In einer aktuellen Studie konnte aber auch gezeigt werden, dass sich die bakterielle Zusammensetzung des Stuhls und der entsprechenden BEVs unterscheiden [121], sodass es nicht möglich ist, von der bakteriellen Zusammensetzung der BEVs direkte Rückschlüsse auf die bakterielle Zusammensetzung des Mikrobioms zu ziehen. Es sind größere Studien erforderlich, die sich auf die durch die Schwangerschaft verursachten Veränderungen des Mikrobioms und seiner BEVs konzentrieren.

Die weiteren Analysen der BEVs zeigten eine ähnliche Konzentration an BEVs und einen ähnlichen Proteingehalt der BEVs pro Gramm Stuhl sowie einen ähnlichen Gehalt an LTA und Endotoxin in BEV-Proben von schwangeren Frauen und nicht schwangeren Kontrollpersonen. An dieser Stelle muss eine wichtige Limitation erwähnt werden. Es wurde nicht jede einzelne Probe, die in den Stimulations-Experimenten verwendet wurde, untersucht, sondern nur eine zufällige Auswahl weniger Proben zur Quantifizierung der Vesikelzahl, des Proteingehalts und des Endotoxin- und LTA-Gehalts. Daher wären eine detailliertere Analyse des Inhalts der BEVs an einer größeren Anzahl von Proben

für weitere Studien zu ihren immunologischen Auswirkungen während der Schwangerschaft wünschenswert.

4.4 BEVs von RSA-Patientinnen zeigen anderen bakteriellen Ursprung als Kontroll-Probandinnen ohne veränderte Effekte auf T-Helferzellen

Bezüglich der Beeinflussung der T-Helferzellkomposition durch BEVs aus dem Stuhl von Abortpatientinnen im Vergleich zu BEVs aus dem Stuhl von nicht-schwangeren Kontrollen mit mindestens einer stattgehabten komplikationslosen Schwangerschaft zeigten sich keine Unterschiede. Eine Studie berichtete von Veränderungen des intestinalen Mikrobioms bei RSA-Patientinnen in Assoziation mit einem veränderten Zytokinprofil [38], was allerdings ein Ergebnis von Mikrobiomanalysen *während* und nicht *vor* Eintritt der Schwangerschaft ist. In unseren qPCR-Analysen der BEVs aus Stuhl von RSA-Patientinnen zeigten sich dennoch Unterschiede, mit weniger *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* und *Fusobacteria* bei RSA-Patientinnen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Vergangene Studien setzten sich überwiegend mit Veränderungen des vaginalen Mikrobioms bei RSA auseinander, mit gemischten Ergebnissen [122-124]. Zu Veränderungen des intestinalen Mikrobioms bei RSA existieren bisher kaum Studien. In den wenigen vorhandenen wird von verminderter bakterieller Vielfalt sowie der Depletion von *Prevotella*- und *Selenomonas*-Spezies bei RSA berichtet. Auch diese Arbeiten untersuchten Proben während einer noch bestehenden Schwangerschaft [38, 125]. Aufgrund der unzureichenden Studienlage und der eingeschränkten Übertragbarkeit von qPCR-Analysen von BEVs aus Stuhl auf die Gesamtkomposition des intestinalen Mikrobioms können aus unseren Versuchen aktuell keine Rückschlüsse gezogen werden. Sie deuten aber auf mögliche Unterschiede im intestinalen Mikrobiom bei RSA-Patientinnen vor Eintritt einer Schwangerschaft hin. Weitere Studien sind zur Bestätigung und Einordnung solcher Unterschiede nötig.

4.5 BEVs von Schwangeren mit Präeklampsie führen nicht zu veränderter T-Helferzellmodulation

Bei Stimulation von PBMCs mit BEVs aus dem Stuhl von Schwangeren mit PE zeigten sich im Vergleich zur Stimulation mit BEVs gesunder Schwangerer keine statistisch signifikanten Unterschiede. Tendenziell ist in unseren Ergebnissen ein leicht erhöhter Anteil von Th17-Zellen nach Stimulation mit BEVs von PE-Patientinnen zu erkennen, was der im Blut von PE-Patientinnen beobachteten Th-Zell-Komposition entsprechen würde [113, 126]. In den von uns durchgeführten qPCR-Analysen von BEVs zeigten sich geringere Anteile von *Firmicutes* bei PE im Vergleich zu gesunden Schwangeren. Die Ergebnisse von Studien zu Veränderungen des intestinalen Mikrobioms bei PE sind heterogen. Eine Studie untersuchte Stuhlproben von gesunden Schwangeren und Schwangeren mit PE jeweils im zweiten und dritten Trimenon und beschrieb vermehrt *Bacteroidetes* und vermindert *Firmicutes* bei PE, was unsere qPCR-Analysen von BEVs zum Teil reproduzieren konnten [127]. Eine weitere Studie beschreibt u.a. vermehrt *Fusobacteria* im Stuhl von PE-Patientinnen, was sich in den Analysen unserer BEVs von PE-Patientinnen nicht zeigt [40]. Wie bereits erwähnt ist der Vergleich der mikrobiellen Komposition von Stuhlproben und BEV-Proben aber nicht oder nur schwer möglich.

Der direkte Zusammenhang von BEVs aus dem Stuhl und der T-Helferzell-Komposition bei PE wurde bisher in zwei Studien mit *Akkermania muciniphila* untersucht. Im PE-Mausmodell konnte durch Fütterung von *Akkermania muciniphila* eine klinische Besserung sowie die Verschiebung der Th-Zellen hin zu mehr Tregs und weniger Th17-Zellen erzielt werden [128]. Eine Folgestudie zeigte die gleichen Effekte allein durch Fütterung von BEVs von *Akkermania muciniphila* [129]. Unsere Ergebnisse zeigten keine signifikanten Veränderungen der T-Helferzellen durch BEVs aus dem Stuhl von PE-Patientinnen, allerdings unterschieden sich die BEVs auch nur geringfügig auf der Phylum-Ebene von BEVs gesunder Schwangerer. Weiterführende Untersuchungen an einer größeren Anzahl an Proben von PE-Patientinnen und in unterschiedlichen

experimentellen Settings sind notwendig, um mögliche Effekte von BEVs auf die Immunantwort in der Schwangerschaft zu definieren.

4.6 Eine Antibiotika-Behandlung führt zu keiner erhöhten Abortrate

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte untersucht werden, wie sich eine vorbestehende Dysbiose auf den Schwangerschaftsverlauf im Tiermodell auswirkt. Die Hypothese war hier, dass, wie es für eine Vielzahl von Erkrankungen bereits gezeigt wurde, eine Dysbiose negativen Einfluss auf den Schwangerschaftsverlauf hat und zu einer erhöhten Rate an Fehlgeburten führt. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden Mäuse ab kurz vor der Geburt mit Antibiotika behandelt, um eine Dysbiose hervorzurufen. Unsere qPCR-Analysen von Kotproben an Tag E10.5 der Trächtigkeit zeigten jedoch keinen Unterschied in der bakteriellen Komposition zwischen behandelten Tieren und der Kontrollgruppe bezüglich der untersuchten bakteriellen Phyla. Stuhluntersuchungen der Tiere vor Eintritt der Trächtigkeit zeigten dagegen Veränderungen (nicht gezeigt), so dass geschlussfolgert werden muss, dass es nach Absetzen der Antibiotika sehr rasch wieder zu einem Angleichen der Mikrobiota kommt. Das AB-Regime in unseren Versuchen war im Vergleich zu anderen Untersuchungen aus der Literatur, die eine Dysbiose induzierten, eher niedrig dosiert und weniger breit [130, 131], so dass wir möglicherweise nur geringfügige Mikrobiomveränderungen hervorriefen. Tiefergehende Mikrobiomuntersuchungen der Stuhlproben der trächtigen Tiere wären notwendig, um detaillierter Aussagen über den Grad der Mikrobiomveränderungen treffen zu können.

Interessanterweise zeigte sich entgegen unserer Hypothese durch die Antibiotikabehandlung keine Veränderung des Trächtigkeitsverlaufs im Hinblick auf das Auftreten von Fehlgeburten. Jedoch konnte in weiterführenden Versuchen unserer Arbeitsgruppe im murinen Abortmodell (Verpaarung von CBA/J-Mäusen mit DBA/2J-Mäusen, was zu einer Fehlgeburtenrate von ca. 20% führt) gezeigt werden, dass das hier angewandte AB-Regime sogar zu einer Reduktion der Abortrate führte (unveröffentlichte Daten). In der hier vorliegenden

Arbeit wurde ausschließlich der Einfluss auf den frühen Trächtigkeitserlauf untersucht. Spätere Komplikationen wie intrauterine Wachstumsretardierung der Feten, Frühgeburtlichkeit oder Komplikationen bei den Nachkommen sollen in Folgestudien untersucht werden. Ähnliche Arbeiten der letzten Jahre zeigten entsprechend unseren Ergebnissen ebenfalls keine Veränderung bezüglich der Anzahl an Feten, Abortrate, Gewichtszunahme und Frühgeburtlichkeit bei trächtigen Mäusen nach perinataler AB-Substitution [132-134], allerdings nach deutlich kürzerer Dauer der AB-Therapie.

Während der Schwangerschaft kommt es zu metabolischen Anpassungen wie Gewichtszunahme, Insulinresistenz und vermehrten Sexualhormonen, die denen eines metabolischen Syndroms sehr ähneln [135]. Interessanterweise ist für das metabolische Syndrom auch beschrieben, dass hier das intestinale Mikrobiom pathogenetisch eine Rolle spielt [136, 137]. Möglicherweise sind also Veränderungen des Mikrobioms die in anderem Zusammenhang als Dysbiose beschrieben werden für die Schwangerschaft sogar günstig.

4.7 Eine Antibiotika-Behandlung führt zu einer veränderten immunologischen Anpassung an die Schwangerschaft

Bezüglich der untersuchten Immunzellpopulationen zeigten sich an E10.5 der Trächtigkeit bei Mäusen signifikante Unterschiede zwischen Tieren mit und ohne AB-Behandlung. Die Veränderungen betrafen dabei insbesondere Zellen der angeborenen Immunität, in deutlich geringerem Maße auch Zellen der adaptiven Immunität.

In der AB-Gruppe zeigte sich ein vermehrtes Vorkommen myeloider Zellen, insbesondere neutrophiler Zellen. Diese Ergebnisse passen zu denen humaner Studien, die eine Zunahme peripherer myeloider Zellen während der Schwangerschaft als Reaktion auf eine Stimulation mit LPS beschreiben [138]. Möglicherweise kommt es durch die AB-Therapie zu einer Beeinträchtigung der Darmbarriere [139] und damit einer vermehrten LPS-Exposition, was dann zu einer Expansion myeloider Zellen führen könnte. In der Literatur wird eine verstärkte Aktivierung uteriner Neutrophiler in Zusammenhang mit

Schwangerschaftskomplikation wie PE gebracht [140, 141]. Wir beobachteten nach AB-Therapie zwar erhöhte Anteile an neutrophilen Zellen in verschiedenen Organen, führten aber bisher keine funktionellen Untersuchungen durch, so dass keine Aussage über deren Aktivierungszustand getroffen werden kann. Interessanterweise zeigte sich neben dem vermehrten Vorkommen von neutrophilen Zellen insgesamt auch ein vermehrtes Vorkommen der immunmodulatorisch/immunsuppressiv wirkenden Subpopulation von MDSC, welche als protektiv für den Schwangerschaftsverlauf beschrieben sind [21].

In Milz und Plazenten AB-behandelter Mäuse beobachteten wir außerdem ein erhöhtes Vorkommen von ILC1 und ILC3, während das Vorkommen von ILC3 im Darm bei den AB-behandelten Tieren vermindert war. ILC sind vor allem für mucosale Abwehr von Bakterien von Bedeutung [142]. Die physiologische Darmbesiedelung mit Kommensalen rekrutiert ILC3 in die Darmmukosa [143] und spielt damit eine wichtige Rolle für die Immunhomöostase des Darms. Es wurde beschrieben, dass sogar schon vor der Geburt diaplazentar ein Transport von ILC3 in den fetalen Darm stattfindet [144]. Eine Dysregulation intestinaler ILC3 im Zusammenhang mit Veränderungen des intestinalen Mikrobioms ist mit einer erhöhten Anfälligkeit für Colitis assoziiert [145]. Ob die von uns beobachtete Verminderung von ILC3 im Darm nach AB-Therapie für die Feten relevant sein könnte bleibt nach unseren Versuchen unklar und könnte Inhalt weiterer Studien sein.

Über den Zusammenhang zwischen Mikrobiom und peripheren und plazentaren ILC ist unseres Wissens bisher nichts bekannt. Generell spielen vor allem ILC3 eine Rolle bei der normalen Entwicklung der Plazenta und dem uterinen Gefäßremodeling während der Schwangerschaft [146]. Studien beschreiben erhöhte Vorkommen uteriner und plazentarer ILC1 und ILC3 bei Frühgeburt, Präeklampsie und rezidivierenden Spontanaborten [147-149], allerdings ohne einen Zusammenhang mit dem intestinalen Mikrobiom zu untersuchen, sodass eine kausale Verbindung in Folgestudien untersucht werden müsste.

Deziduale DC sind an maternaler Toleranzentwicklung, Pathogenabwehr und Plazentation beteiligt [150], so führt z.B. die Interaktion dezidualer DC mit

Trophoblastzellen zur Steigerung einer tolerogenen IL10-Freisetzung [151]. Ob deziduale DC eher tolerogene oder proinflammatorische Wirkung vermitteln scheint vor allem durch funktionelle Anpassungen und weniger deren Gesamtzahl bestimmt zu sein [152], das heißt, dass deziduale DC mittels Herunterregulation ihrer antigenpräsentierenden Funktion stärker tolerogen und weniger aktivierend auf T-Zellen wirken [153]. Dies erklärt die unterschiedlichen Ergebnisse verschiedener Studien zu DC in der Schwangerschaft, wo z.B. in einer *in vivo*-Studie an Mäusen die Abortrate durch Gabe von DCs gesenkt werden konnte [154], während beim Menschen eine Akkumulation dezidualer DC mit Schwangerschaftskomplikationen assoziiert wurde [155, 156]. Wir beobachteten in unseren Versuchen ein vermehrtes Vorkommen von DC im Uterus und der Plazenta bei den AB-behandelten Mäusen. Der Funktionszustand und die Antigenpräsentation dieser DC wurde in unseren Versuchen nicht untersucht, so dass keine Aussage zu einer möglichen funktionellen Bedeutung für die Schwangerschaft gemacht werden kann.

Im Vergleich zu den Effekten auf die angeborene Immunität zeigten sich eher geringe Effekte der AB-Therapie auf adaptive Immunzellen während der Trächtigkeit. B-Zellen waren in der Milz AB-behandelter Mäuse signifikant vermindert, was zu den Ergebnissen einer anderen Studie mit AB-induzierter Dysbiose bei nicht-trächtigen Mäusen passt [157]. Für die murine Trächtigkeit werden physiologisch geringere Vorkommen von B-Zellen, insbesondere in der Milz beschrieben, was vor allem durch verminderte Produktion unreifer B-Zellen zustande kommt [158]. Umgekehrt wurde beschrieben, dass B-Zellen während der Schwangerschaft protektive anti-paternale „blocking antibodies“ produzieren und damit wichtig für die Toleranz gegenüber dem semiallogenen Fetus sind [10, 159]. Die funktionelle Bedeutung der von uns beobachteten verminderten B-Zellen in der Milz nach AB-Therapie bleibt zum jetzigen Zeitpunkt unklar.

Das intestinale Mikrobiom beeinflusst die Aktivität von T-Zellen z.B. über die Freisetzung verschiedener Mediatoren [119] oder Effekte molekularer Mimikry [160-162] lokal und systemisch [163, 164]. In Bezug auf die Schwangerschaft weist eine *in vivo*-Studie an Mäusen auf einen direkten Zusammenhang zwischen Dysbiose und proinflammatorischer T-Zell-Regulation bei PE hin [40]. In unseren

Versuchen war die Gesamtzahl der T-Zellen im Darm der AB-behandelten Mäuse signifikant vermindert. Eine Studie mit AB-induzierter Dysbiose bei nicht-trächtigen Mäusen beschrieb hingegen vermehrte T-Zellen [157], wobei sich die Antibiotika-Regime unterschieden. Um aus unserer Beobachtung Rückschlüsse zu ziehen bedarf es funktioneller Analysen der T-Zellen sowie der Aufschlüsselung der AB-induzierten Mikrobiomkomposition.

Außerdem beobachteten wir ein vermehrtes Vorkommen von Tregs in Darm und Plazenta der AB-behandelten Tiere, was darauf hindeutet, dass die verursachten Mikrobiomveränderungen toleranzinduzierend wirken [77]. Eine andere Studie mit AB-Supplementation in der murinen Schwangerschaft beobachtete im Unterschied zu uns verminderte Zahlen an Tregs im Darm der AB-behandelten Tiere [131]. In dieser Studie wurde die AB-Therapie allerdings erst mit Eintritt der Trächtigkeit begonnen - der Zeitpunkt, an dem wir die AB-Therapie beendeten. Wie bereits beschrieben scheinen Tregs, insbesondere an Bereich der fetomaternalen Grenzschicht, einen protektiven Effekt auf den Schwangerschaftsverlauf zu haben [119, 165-167]. Auch wurde bereits beschrieben, dass mikrobielle Bestandteile eine wichtige Rolle für die Homöostase von Tregs [168] im Darm spielen und dass eine Mikrobiom-induzierte Treg-Expansion im Darm mit protektiven Effekten z.B. im Rahmen entzündlicher Darmerkrankungen einhergeht [169].

Insgesamt zeigten sich immunologische Veränderungen bei den trächtigen Mäusen nach AB-Therapie, die mit vermehrt vorkommenden MDSC und Tregs eher auf einen schwangerschafts-protektiven Immunphänotyp hinweisen. Anders als ursprünglich vermutet könnte damit eine gezielte Veränderung des Mikrobioms vor der Schwangerschaft einen günstigen Einfluss auf das spätere Auftreten von Schwangerschaftskomplikationen haben. Weitere Forschungen in diese Richtung insbesondere mit detaillierter Analyse des möglicherweise schwangerschafts-protektiven Mikrobioms und dessen Interaktion mit dem Immunsystem sind notwendig, um in der Zukunft eventuell neue Therapiestrategien zu entwickeln.

5 Zusammenfassung

Während der Schwangerschaft muss eine immunologische Toleranz des mütterlichen Immunsystems gegenüber dem semi-allogenen Fetus entstehen. Hierbei spielt insbesondere eine Anpassung der T-Zell-Immunität eine wichtige Rolle [2, 170]. Eine Beeinträchtigung dieser Anpassungen kann zu schweren Komplikationen führen [171]. Das intestinale Mikrobiom trägt wesentlich zur Gesunderhaltung, aber auch zur Entstehung von Krankheiten bei. Außerdem setzt es extrazelluläre Vesikel (EVs) frei, welche immunmodulierende Wirkung besitzen [172]. Vorangegangene Arbeiten haben gezeigt, dass es im Laufe der Schwangerschaft zu Veränderungen der intestinalen Mikrobiomkomposition kommt und dass diese bei Schwangerschaftskomplikationen verändert sein können [36, 38, 173, 174]. Bisher war nicht untersucht, ob bakterielle EVs (BEVs) des intestinalen Mikrobioms einen Einfluss auf die T-Zell-Regulation während der Schwangerschaft haben.

Mit dem im ersten Teil der Arbeit etablierten *in vitro*-Modell wurden erstmals aus dem Stuhl isolierte BEVs gesunder nicht schwangerer Frauen und Schwangerer vergleichend charakterisiert und der Einfluss auf die T-Helferzell-Komposition untersucht. Dabei zeigten sich zwar nur Tendenzen bezüglich einer Modulation von T-Helferzellen, aber unterschiedliche Phylum-Häufigkeiten in den qPCR-Analysen weisen auf Veränderungen der BEVs des intestinalen Mikrobioms zwischen Kontroll-Probandinnen, gesunden Schwangeren, Frauen mit RSA und Schwangeren mit PE hin. Diese Ergebnisse bieten einen Ausgangspunkt für nachfolgende Studien zu tiefergehenden Analysen der Immunmodulation durch BEVs während der Schwangerschaft.

Im zweiten Teil der Arbeit konnte in einem *in vivo*-Modell gezeigt werden, dass eine langandauernde Antibiotika-Behandlung bei Mäusen zu deutlichen Veränderungen in der immunologischen Anpassung an die Schwangerschaft insbesondere auf Seiten der angeborenen Immunität führt. Überraschenderweise deuteten die Veränderungen eher auf einen schwangerschafts-protektiven

Immunphänotyp hin. Ein Einfluss auf den Trächtigkeitsverlauf konnte in unserem Modell nicht gezeigt werden.

Zusammenfassend konnte mit dieser Arbeit gezeigt werden, dass ein Zusammenhang zwischen BEVs als Botenstoffen des intestinalen Mikrobioms und der gesunden Schwangerschaft sowie Schwangerschaftskomplikationen bestehen könnte, hier allerdings weitergehende Untersuchungen notwendig sind. Zum anderen zeigte das Mausmodell dieser Arbeit den Einfluss einer Antibiotika-Behandlung auf die Immunadaptation während der murinen Trächtigkeit. Die Ergebnisse bieten Grundlage für weiterführende Untersuchungen mit dem Ziel der Entwicklung Mikrobiom-basierter Präventions- bzw. Therapieansätze für immunologisch vermittelte Schwangerschaftskomplikationen.

6 Literaturverzeichnis

1. Goldenberg, R.L., et al., *Epidemiology and causes of preterm birth*. Lancet, 2008. **371**(9606): p. 75-84.
2. Arriaga-Pizano, L., et al., *The predominant Th1 cytokine profile in maternal plasma of preeclamptic women is not reflected in the chorionic and fetal compartments*. J Soc Gynecol Investig, 2005. **12**(5): p. 335-42.
3. Raghupathy, R., et al., *Maternal Th1- and Th2-type reactivity to placental antigens in normal human pregnancy and unexplained recurrent spontaneous abortions*. Cell Immunol, 1999. **196**(2): p. 122-30.
4. Frascoli, M., et al., *Alloreactive fetal T cells promote uterine contractility in preterm labor via IFN- γ and TNF- α* . Sci Transl Med, 2018. **10**(438).
5. Chaouat, G., et al., *IL-10 prevents naturally occurring fetal loss in the CBA x DBA/2 mating combination, and local defect in IL-10 production in this abortion-prone combination is corrected by in vivo injection of IFN-tau*. J Immunol, 1995. **154**(9): p. 4261-8.
6. Zenclussen, A.C., et al., *Abnormal T-cell reactivity against paternal antigens in spontaneous abortion: adoptive transfer of pregnancy-induced CD4+CD25+ T regulatory cells prevents fetal rejection in a murine abortion model*. Am J Pathol, 2005. **166**(3): p. 811-22.
7. Mor, G., P. Aldo, and A.B. Alvero, *The unique immunological and microbial aspects of pregnancy*. Nature Reviews Immunology, 2017. **17**(8): p. 469-482.
8. Nakashima, A., et al., *Accumulation of IL-17-positive cells in decidua of inevitable abortion cases*. Am J Reprod Immunol, 2010. **64**(1): p. 4-11.
9. Nakashima, A., et al., *Circulating and decidua Th17 cell levels in healthy pregnancy*. Am J Reprod Immunol, 2010. **63**(2): p. 104-9.
10. Muzzio, D., A.C. Zenclussen, and F. Jensen, *The role of B cells in pregnancy: the good and the bad*. Am J Reprod Immunol, 2013. **69**(4): p. 408-12.
11. TRIPLETT, D.A. and E.N. HARRIS, *Antiphospholipid Antibodies and Reproduction*. American Journal of Reproductive Immunology, 1989. **21**(3-4): p. 123-131.
12. Gambel, P., et al., *Characterization of immune effector cells present in early murine decidua*. Cell Immunol, 1985. **93**(2): p. 303-14.
13. King, A., et al., *HLA-E is expressed on trophoblast and interacts with CD94 / NKG2 receptors on decidua NK cells*. European Journal of Immunology, 2000. **30**(6): p. 1623-1631.
14. Long, E.O., et al., *Inhibition of natural killer cell activation signals by killer cell immunoglobulin-like receptors (CD158)*. Immunological reviews, 2001. **181**(1): p. 223-233.

15. Smith, S.D., et al., *Evidence for Immune Cell Involvement in Decidual Spiral Arteriole Remodeling in Early Human Pregnancy*. The American Journal of Pathology, 2009. **174**(5): p. 1959-1971.
16. Svensson, J., et al., *Macrophages at the fetal–maternal interface express markers of alternative activation and are induced by M-CSF and IL-10*. The Journal of Immunology, 2011. **187**(7): p. 3671-3682.
17. Lampé, R., et al., *Phagocytic index of neutrophil granulocytes and monocytes in healthy and preeclamptic pregnancy*. Journal of reproductive immunology, 2015. **107**: p. 26-30.
18. Vega-Sanchez, R., et al., *Placental blood leukocytes are functional and phenotypically different than peripheral leukocytes during human labor*. Journal of Reproductive Immunology, 2010. **84**(1): p. 100-110.
19. Köstlin, N., et al., *Granulocytic myeloid derived suppressor cells expand in human pregnancy and modulate T-cell responses*. Eur J Immunol, 2014. **44**(9): p. 2582-91.
20. Köstlin, N., et al., *Granulocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells Accumulate in Human Placenta and Polarize toward a Th2 Phenotype*. J Immunol, 2016. **196**(3): p. 1132-45.
21. Köstlin-Gille, N., et al., *HIF-1 α -Deficiency in Myeloid Cells Leads to a Disturbed Accumulation of Myeloid Derived Suppressor Cells (MDSC) During Pregnancy and to an Increased Abortion Rate in Mice*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 161.
22. Steegers, E.A., et al., *Pre-eclampsia*. Lancet, 2010. **376**(9741): p. 631-44.
23. Stepan, H., et al., *Diagnosis and Treatment of Hypertensive Pregnancy Disorders. Guideline of DGGG (S1-Level, AWMF Registry No. 015/018, December 2013)*. Geburtshilfe Frauenheilkd, 2015. **75**(9): p. 900-914.
24. Mol, B.W.J., et al., *Pre-eclampsia*. Lancet, 2016. **387**(10022): p. 999-1011.
25. Lu, H.Q. and R. Hu, *The role of immunity in the pathogenesis and development of pre-eclampsia*. Scand J Immunol, 2019. **90**(5): p. e12756.
26. Cornelius, D.C., et al., *Reduced uterine perfusion pressure T-helper 17 cells cause pathophysiology associated with preeclampsia during pregnancy*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2016. **311**(6): p. R1192-r1199.
27. Boij, R., et al., *Regulatory T-cell Subpopulations in Severe or Early-onset Preeclampsia*. Am J Reprod Immunol, 2015. **74**(4): p. 368-78.
28. Rai, R. and L. Regan, *Recurrent miscarriage*. Lancet, 2006. **368**(9535): p. 601-11.

29. Warning, J.C., S.A. McCracken, and J.M. Morris, *A balancing act: mechanisms by which the fetus avoids rejection by the maternal immune system*. *Reproduction*, 2011. **141**(6): p. 715-24.
30. Goldenberg, R.L. and J.F. Culhane, *Prepregnancy health status and the risk of preterm delivery*. *Arch Pediatr Adolesc Med*, 2005. **159**(1): p. 89-90.
31. Bao, S.H., et al., *Decidual CD4+CD25+CD127dim/- regulatory T cells in patients with unexplained recurrent spontaneous miscarriage*. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2011. **155**(1): p. 94-8.
32. Jin, L.P., et al., *The costimulatory signal upregulation is associated with Th1 bias at the maternal-fetal interface in human miscarriage*. *Am J Reprod Immunol*, 2011. **66**(4): p. 270-8.
33. Kwak-Kim, J.Y., et al., *Increased T helper 1 cytokine responses by circulating T cells are present in women with recurrent pregnancy losses and in infertile women with multiple implantation failures after IVF*. *Hum Reprod*, 2003. **18**(4): p. 767-73.
34. Lee, S.K., et al., *An imbalance in interleukin-17-producing T and Foxp3⁺ regulatory T cells in women with idiopathic recurrent pregnancy loss*. *Hum Reprod*, 2011. **26**(11): p. 2964-71.
35. Branch, D.W., M. Gibson, and R.M. Silver, *Clinical practice. Recurrent miscarriage*. *N Engl J Med*, 2010. **363**(18): p. 1740-7.
36. Koren, O., et al., *Host remodeling of the gut microbiome and metabolic changes during pregnancy*. *Cell*, 2012. **150**(3): p. 470-80.
37. Nuriel-Ohayon, M., et al., *Progesterone Increases Bifidobacterium Relative Abundance during Late Pregnancy*. *Cell Reports*, 2019. **27**(3): p. 730-736.e3.
38. Liu, Y., et al., *Interactions between gut microbiota and metabolites modulate cytokine network imbalances in women with unexplained miscarriage*. *NPJ Biofilms Microbiomes*, 2021. **7**(1): p. 24.
39. Dahl, C., et al., *Gut microbiome of mothers delivering prematurely shows reduced diversity and lower relative abundance of Bifidobacterium and Streptococcus*. *PLoS One*, 2017. **12**(10): p. e0184336.
40. Chen, X., et al., *Gut dysbiosis induces the development of pre-eclampsia through bacterial translocation*. *Gut*, 2020. **69**(3): p. 513-522.
41. Ding, Q., et al., *Systematic review and meta-analysis of the correlation between intestinal flora and gestational diabetes mellitus*. *Ann Palliat Med*, 2021. **10**(9): p. 9752-9764.
42. Lv, L.J., et al., *Early-Onset Preeclampsia Is Associated With Gut Microbial Alterations in Antepartum and Postpartum Women*. *Front Cell Infect Microbiol*, 2019. **9**: p. 224.
43. Hill, D.A. and D. Artis, *Intestinal bacteria and the regulation of immune cell homeostasis*. *Annu Rev Immunol*, 2010. **28**: p. 623-67.

44. Maynard, C.L., et al., *Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system*. Nature, 2012. **489**(7415): p. 231-41.
45. Feng, Y., et al., *Antibiotics induced intestinal tight junction barrier dysfunction is associated with microbiota dysbiosis, activated NLRP3 inflammasome and autophagy*. PLoS One, 2019. **14**(6): p. e0218384.
46. Schirmer, M., et al., *Linking the Human Gut Microbiome to Inflammatory Cytokine Production Capacity*. Cell, 2016. **167**(4): p. 1125-1136.e8.
47. Grigg, J.B. and G.F. Sonnenberg, *Host-Microbiota Interactions Shape Local and Systemic Inflammatory Diseases*. J Immunol, 2017. **198**(2): p. 564-571.
48. Ott, S.J., et al., *Reduction in diversity of the colonic mucosa associated bacterial microflora in patients with active inflammatory bowel disease*. Gut, 2004. **53**(5): p. 685-93.
49. Pascal, V., et al., *A microbial signature for Crohn's disease*. Gut, 2017. **66**(5): p. 813-822.
50. Gonçalves, P., J.R. Araújo, and J.P. Di Santo, *A Cross-Talk Between Microbiota-Derived Short-Chain Fatty Acids and the Host Mucosal Immune System Regulates Intestinal Homeostasis and Inflammatory Bowel Disease*. Inflamm Bowel Dis, 2018. **24**(3): p. 558-572.
51. Shapira, I., et al., *Evolving concepts: how diet and the intestinal microbiome act as modulators of breast malignancy*. ISRN Oncol, 2013. **2013**: p. 693920.
52. Kwa, M., et al., *The Intestinal Microbiome and Estrogen Receptor-Positive Female Breast Cancer*. J Natl Cancer Inst, 2016. **108**(8).
53. Pascale, A., et al., *The role of gut microbiota in obesity, diabetes mellitus, and effect of metformin: new insights into old diseases*. Curr Opin Pharmacol, 2019. **49**: p. 1-5.
54. Harsch, I.A. and P.C. Konturek, *The Role of Gut Microbiota in Obesity and Type 2 and Type 1 Diabetes Mellitus: New Insights into "Old" Diseases*. Med Sci (Basel), 2018. **6**(2).
55. Chatterjee, S.N. and J. Das, *Electron microscopic observations on the excretion of cell-wall material by Vibrio cholerae*. J Gen Microbiol, 1967. **49**(1): p. 1-11.
56. Brown, L., et al., *Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi*. Nat Rev Microbiol, 2015. **13**(10): p. 620-30.
57. Hong, J., et al., *Analysis of the Escherichia coli extracellular vesicle proteome identifies markers of purity and culture conditions*. J Extracell Vesicles, 2019. **8**(1): p. 1632099.
58. Domingues, S. and K.M. Nielsen, *Membrane vesicles and horizontal gene transfer in prokaryotes*. Curr Opin Microbiol, 2017. **38**: p. 16-21.

59. Gilmore, W.J., et al., *Immunomodulatory roles and novel applications of bacterial membrane vesicles*. Mol Immunol, 2021. **134**: p. 72-85.
60. Koeppen, K., et al., *A Novel Mechanism of Host-Pathogen Interaction through sRNA in Bacterial Outer Membrane Vesicles*. PLoS Pathog, 2016. **12**(6): p. e1005672.
61. Jones, E.J., et al., *The Uptake, Trafficking, and Biodistribution of Bacteroides thetaiotaomicron Generated Outer Membrane Vesicles*. Front Microbiol, 2020. **11**: p. 57.
62. Park, J., et al., *Fecal Microbiota and Gut Microbe-Derived Extracellular Vesicles in Colorectal Cancer*. Front Oncol, 2021. **11**: p. 650026.
63. Asea, A., et al., *Heat shock protein-containing exosomes in mid-trimester amniotic fluids*. J Reprod Immunol, 2008. **79**(1): p. 12-7.
64. Kim, S.Y. and D.Y. Yi, *Analysis of the human breast milk microbiome and bacterial extracellular vesicles in healthy mothers*. Exp Mol Med, 2020. **52**(8): p. 1288-1297.
65. Walters, S.B., et al., *Microparticles from mycobacteria-infected macrophages promote inflammation and cellular migration*. J Immunol, 2013. **190**(2): p. 669-77.
66. Couper, K.N., et al., *Parasite-derived plasma microparticles contribute significantly to malaria infection-induced inflammation through potent macrophage stimulation*. PLoS Pathog, 2010. **6**(1): p. e1000744.
67. Villageliu, D.N. and D.R. Samuelson, *The Role of Bacterial Membrane Vesicles in Human Health and Disease*. Front Microbiol, 2022. **13**: p. 828704.
68. French, K.C., M.A. Antonyak, and R.A. Cerione, *Extracellular vesicle docking at the cellular port: Extracellular vesicle binding and uptake*. Semin Cell Dev Biol, 2017. **67**: p. 48-55.
69. Hong, S.W., et al., *Extracellular vesicles derived from Staphylococcus aureus induce atopic dermatitis-like skin inflammation*. Allergy, 2011. **66**(3): p. 351-9.
70. Alpdundar Bulut, E., et al., *Human Gut Commensal Membrane Vesicles Modulate Inflammation by Generating M2-like Macrophages and Myeloid-Derived Suppressor Cells*. J Immunol, 2020. **205**(10): p. 2707-2718.
71. Macia, L., et al., *Host- and Microbiota-Derived Extracellular Vesicles, Immune Function, and Disease Development*. Int J Mol Sci, 2019. **21**(1).
72. Kim, D.J., et al., *Colorectal cancer diagnostic model utilizing metagenomic and metabolomic data of stool microbial extracellular vesicles*. Sci Rep, 2020. **10**(1): p. 2860.
73. Kim, O.Y., et al., *Bacterial outer membrane vesicles suppress tumor by interferon- γ -mediated antitumor response*. Nat Commun, 2017. **8**(1): p. 626.

74. Mazmanian, S.K., J.L. Round, and D.L. Kasper, *A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease*. Nature, 2008. **453**(7195): p. 620-5.
75. Shen, Y., et al., *Outer membrane vesicles of a human commensal mediate immune regulation and disease protection*. Cell Host Microbe, 2012. **12**(4): p. 509-20.
76. Chu, H., et al., *Gene-microbiota interactions contribute to the pathogenesis of inflammatory bowel disease*. Science, 2016. **352**(6289): p. 1116-20.
77. Round, J.L. and S.K. Mazmanian, *Inducible Foxp3+ regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(27): p. 12204-9.
78. Tulkens, J., O. De Wever, and A. Hendrix, *Analyzing bacterial extracellular vesicles in human body fluids by orthogonal biophysical separation and biochemical characterization*. Nat Protoc, 2020. **15**(1): p. 40-67.
79. Lajqi, T., et al., *Gut Microbiota-Derived Small Extracellular Vesicles Endorse Memory-like Inflammatory Responses in Murine Neutrophils*. Biomedicines, 2022. **10**(2): p. 442.
80. Gao, X.J., et al., *Bacterial Outer Membrane Vesicles from Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis Differentially Regulate Intestinal UDP-Glucuronosyltransferase 1A1 Partially Through Toll-Like Receptor 4/Mitogen-Activated Protein Kinase/Phosphatidylinositol 3-Kinase Pathway*. Drug Metab Dispos, 2018. **46**(3): p. 292-302.
81. Park, K.S., et al., *Sepsis-Like Systemic Inflammation Induced by Nano-Sized Extracellular Vesicles From Feces*. Front Microbiol, 2018. **9**: p. 1735.
82. Kang, C.S., et al., *Extracellular vesicles derived from gut microbiota, especially Akkermansia muciniphila, protect the progression of dextran sulfate sodium-induced colitis*. PLoS One, 2013. **8**(10): p. e76520.
83. Filipe, V., A. Hawe, and W. Jiskoot, *Critical evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates*. Pharm Res, 2010. **27**(5): p. 796-810.
84. Percy, M.G. and A. Gründling, *Lipoteichoic acid synthesis and function in gram-positive bacteria*. Annu Rev Microbiol, 2014. **68**: p. 81-100.
85. Giordano, N.P., M.B. Cian, and Z.D. Dalebroux, *Outer Membrane Lipid Secretion and the Innate Immune Response to Gram-Negative Bacteria*. Infect Immun, 2020. **88**(7).
86. Ng, S.Y., et al., *Evolution of the functional human beta-actin gene and its multi-pseudogene family: conservation of noncoding regions and chromosomal dispersion of pseudogenes*. Mol Cell Biol, 1985. **5**(10): p. 2720-32.

87. Clarke, M. and J.A. Spudich, *Nonmuscle contractile proteins: the role of actin and myosin in cell motility and shape determination*. Annu Rev Biochem, 1977. **46**: p. 797-822.
88. Böyum, A., *Separation of leukocytes from blood and bone marrow. Introduction*. Scand J Clin Lab Invest Suppl, 1968. **97**: p. 7.
89. Weston, S.A. and C.R. Parish, *New fluorescent dyes for lymphocyte migration studies. Analysis by flow cytometry and fluorescence microscopy*. J Immunol Methods, 1990. **133**(1): p. 87-97.
90. Ozawa, T., T. Ijichi, and M. Shiraishi, *Measurement of canine blood microparticles by flow cytometry: effect of anticoagulants and staining reagents*. J Vet Med Sci, 2021. **83**(11): p. 1786-1789.
91. Théry, C., et al., *Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines*. J Extracell Vesicles, 2018. **7**(1): p. 1535750.
92. Northrop-Albrecht, E.J., et al., *Assessment of extracellular vesicle isolation methods from human stool supernatant*. J Extracell Vesicles, 2022. **11**(4): p. e12208.
93. Kameli, N., et al., *Characterization of Feces-Derived Bacterial Membrane Vesicles and the Impact of Their Origin on the Inflammatory Response*. Front Cell Infect Microbiol, 2021. **11**: p. 667987.
94. Tian, Y., et al., *Quality and efficiency assessment of six extracellular vesicle isolation methods by nano-flow cytometry*. Journal of Extracellular Vesicles, 2020. **9**(1): p. 1697028.
95. Stam, J., et al., *Isolation of extracellular vesicles with combined enrichment methods*. Journal of Chromatography B, 2021. **1169**: p. 122604.
96. Kim, H.Y., et al., *Effects of extracellular vesicles derived from oral bacteria on osteoclast differentiation and activation*. Scientific Reports, 2022. **12**(1): p. 14239.
97. López, P., et al., *Interaction of Bifidobacterium bifidum LMG13195 with HT29 cells influences regulatory-T-cell-associated chemokine receptor expression*. Appl Environ Microbiol, 2012. **78**(8): p. 2850-7.
98. Li, Y., et al., *Bacterial Outer Membrane Vesicles Presenting Programmed Death 1 for Improved Cancer Immunotherapy via Immune Activation and Checkpoint Inhibition*. ACS Nano, 2020. **14**(12): p. 16698-16711.
99. Athman, J.J., et al., *Mycobacterium tuberculosis Membrane Vesicles Inhibit T Cell Activation*. J Immunol, 2017. **198**(5): p. 2028-2037.
100. Rabiei, N., et al., *Induction effects of Faecalibacterium prausnitzii and its extracellular vesicles on toll-like receptor signaling pathway gene expression and cytokine level in human intestinal epithelial cells*. Cytokine, 2019. **121**: p. 154718.

101. Goverse, G., et al., *Diet-Derived Short Chain Fatty Acids Stimulate Intestinal Epithelial Cells To Induce Mucosal Tolerogenic Dendritic Cells*. *The Journal of Immunology*, 2017. **198**(5): p. 2172-2181.
102. Yoon, S.H., et al., *Selective addition of CXCR3(+) CCR4(-) CD4(+) Th1 cells enhances generation of cytotoxic T cells by dendritic cells in vitro*. *Exp Mol Med*, 2009. **41**(3): p. 161-70.
103. Wei, Y., et al., *Flow cytometric analysis of circulating follicular helper T (Tfh) and follicular regulatory T (Tfr) populations in human blood*. *Methods Mol Biol*, 2015. **1291**: p. 199-207.
104. Mjösberg, J., et al., *FOXP3+ Regulatory T Cells and T Helper 1, T Helper 2, and T Helper 17 Cells in Human Early Pregnancy Decidua*. *Biology of Reproduction*, 2010. **82**(4): p. 698-705.
105. Clark, S., et al., *Reduced TH1/TH17 CD4 T-cell numbers are associated with impaired purified protein derivative-specific cytokine responses in patients with HIV-1 infection*. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2011. **128**(4): p. 838-846.e5.
106. Asano, M., et al., *Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation*. *The Journal of experimental medicine*, 1996. **184**(2): p. 387-396.
107. Yang, H., et al., *Proportional change of CD4+CD25+ regulatory T cells in decidua and peripheral blood in unexplained recurrent spontaneous abortion patients*. *Fertil Steril*, 2008. **89**(3): p. 656-61.
108. Flynn, J. and P. Gorry, *Flow Cytometry Analysis to Identify Human CD4(+) T Cell Subsets*. *Methods Mol Biol*, 2019. **2048**: p. 15-25.
109. Schmit, T., M. Klomp, and M.N. Khan, *The Application of Flow Cytometry for Simultaneous and Multi-parametric Analysis of Heterogenous Cell Populations in Basic and Clinical Research*. *Methods Mol Biol*, 2021. **2223**: p. 183-200.
110. Wang, S.R., et al., *OMIP 071: A 31-Parameter Flow Cytometry Panel for In-Depth Immunophenotyping of Human T-Cell Subsets Using Surface Markers*. *Cytometry A*, 2021. **99**(3): p. 273-277.
111. Mousset, C.M., et al., *Comprehensive Phenotyping of T Cells Using Flow Cytometry*. *Cytometry A*, 2019. **95**(6): p. 647-654.
112. Schubert, L.A., et al., *Scurfin (FOXP3) acts as a repressor of transcription and regulates T cell activation*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(40): p. 37672-9.
113. Vargas-Rojas, M.I., H. Solleiro-Villavicencio, and E. Soto-Vega, *Th1, Th2, Th17 and Treg levels in umbilical cord blood in preeclampsia*. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 2016. **29**(10): p. 1642-5.
114. Mold, J.E., et al., *Maternal alloantigens promote the development of tolerogenic fetal regulatory T cells in utero*. *Science*, 2008. **322**(5907): p. 1562-5.

115. Liao, J., et al., *Blood CD4(+)CD25(+) T regulatory cells constitute a potential predictive marker of subsequent miscarriage in unexplained recurrent pregnancy loss*. *Int Immunopharmacol*, 2022. **110**: p. 108960.
116. Saito, S., et al., *Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy*. *Am J Reprod Immunol*, 2010. **63**(6): p. 601-10.
117. Ma, Y., et al., *Placental endovascular extravillous trophoblasts (enEVTs) educate maternal T-cell differentiation along the maternal-placental circulation*. *Cell Prolif*, 2020. **53**(5): p. e12802.
118. Hegazy, A.N., et al., *Circulating and Tissue-Resident CD4⁺ T Cells With Reactivity to Intestinal Microbiota Are Abundant in Healthy Individuals and Function Is Altered During Inflammation*. *Gastroenterology*, 2017. **153**(5): p. 1320-1337.e16.
119. Omenetti, S. and T.T. Pizarro, *The Treg/Th17 Axis: A Dynamic Balance Regulated by the Gut Microbiome*. *Front Immunol*, 2015. **6**: p. 639.
120. Nagashima, K., et al., *Mapping the T cell repertoire to a complex gut bacterial community*. *Nature*, 2023. **621**(7977): p. 162-170.
121. Li, C.C., et al., *Characterization of markers, functional properties, and microbiome composition in human gut-derived bacterial extracellular vesicles*. *Gut Microbes*, 2023. **15**(2): p. 2288200.
122. Flaviani, F., et al., *Cervicovaginal microbiota and metabolome predict preterm birth risk in an ethnically diverse cohort*. *JCI Insight*, 2021. **6**(16).
123. Zhang, F., et al., *Alteration of vaginal microbiota in patients with unexplained recurrent miscarriage*. *Exp Ther Med*, 2019. **17**(5): p. 3307-3316.
124. Vomstein, K., et al., *The microbiome in recurrent pregnancy loss - A scoping review*. *J Reprod Immunol*, 2024. **163**: p. 104251.
125. Jin, M., et al., *Changes in Gut Microorganism in Patients with Positive Immune Antibody-Associated Recurrent Abortion*. *Biomed Res Int*, 2020. **2020**: p. 4673250.
126. Darmochwal-Kolarz, D., et al., *The predominance of Th17 lymphocytes and decreased number and function of Treg cells in preeclampsia*. *J Reprod Immunol*, 2012. **93**(2): p. 75-81.
127. Wang, J., et al., *Gut microbiota dysbiosis in preeclampsia patients in the second and third trimesters*. *Chin Med J (Engl)*, 2020. **133**(9): p. 1057-1065.
128. Liu, W., et al., *Protective Effect of Akkermansia muciniphila on the Preeclampsia-Like Mouse Model*. *Reprod Sci*, 2023. **30**(9): p. 2623-2633.
129. Chen, Y., et al., *Extracellular vesicles derived from Akkermansia muciniphila promote placentation and mitigate preeclampsia in a mouse model*. *J Extracell Vesicles*, 2023. **12**(5): p. e12328.

130. Gonzalez-Perez, G., et al., *Maternal Antibiotic Treatment Impacts Development of the Neonatal Intestinal Microbiome and Antiviral Immunity*. J Immunol, 2016. **196**(9): p. 3768-79.
131. Faas, M.M., et al., *The Effect of Antibiotics Treatment on the Maternal Immune Response and Gut Microbiome in Pregnant and Non-Pregnant Mice*. Nutrients, 2023. **15**(12).
132. Chen, H.J., et al., *Discrete role for maternal stress and gut microbes in shaping maternal and offspring immunity*. Neurobiol Stress, 2022. **21**: p. 100480.
133. Benner, M., et al., *Antibiotic Intervention Affects Maternal Immunity During Gestation in Mice*. Front Immunol, 2021. **12**: p. 685742.
134. Tormo-Badia, N., et al., *Antibiotic treatment of pregnant non-obese diabetic mice leads to altered gut microbiota and intestinal immunological changes in the offspring*. Scand J Immunol, 2014. **80**(4): p. 250-60.
135. Nuriel-Ohayon, M., H. Neuman, and O. Koren, *Microbial Changes during Pregnancy, Birth, and Infancy*. Front Microbiol, 2016. **7**: p. 1031.
136. Tomas, J., et al., *High-fat diet modifies the PPAR- γ pathway leading to disruption of microbial and physiological ecosystem in murine small intestine*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016. **113**(40): p. E5934-e5943.
137. Thingholm, L.B., et al., *Obese Individuals with and without Type 2 Diabetes Show Different Gut Microbial Functional Capacity and Composition*. Cell Host Microbe, 2019. **26**(2): p. 252-264.e10.
138. Farias-Jofre, M., et al., *Pregnancy tailors endotoxin-induced monocyte and neutrophil responses in the maternal circulation*. Inflamm Res, 2022. **71**(5-6): p. 653-668.
139. Hiippala, K., et al., *The Potential of Gut Commensals in Reinforcing Intestinal Barrier Function and Alleviating Inflammation*. Nutrients, 2018. **10**(8).
140. Sacks, G.P., et al., *Normal pregnancy and preeclampsia both produce inflammatory changes in peripheral blood leukocytes akin to those of sepsis*. Am J Obstet Gynecol, 1998. **179**(1): p. 80-6.
141. Giaglis, S., et al., *Multimodal Regulation of NET Formation in Pregnancy: Progesterone Antagonizes the Pro-NETotic Effect of Estrogen and G-CSF*. Front Immunol, 2016. **7**: p. 565.
142. Sanos, S.L. and A. Diefenbach, *Innate lymphoid cells: from border protection to the initiation of inflammatory diseases*. Immunol Cell Biol, 2013. **91**(3): p. 215-24.
143. Satoh-Takayama, N., et al., *Microbial flora drives interleukin 22 production in intestinal NKp46+ cells that provide innate mucosal immune defense*. Immunity, 2008. **29**(6): p. 958-70.

144. Gomez de Agüero, M., et al., *The maternal microbiota drives early postnatal innate immune development*. Science, 2016. **351**(6279): p. 1296-302.
145. Qiu, J., et al., *Group 3 innate lymphoid cells inhibit T-cell-mediated intestinal inflammation through aryl hydrocarbon receptor signaling and regulation of microflora*. Immunity, 2013. **39**(2): p. 386-99.
146. Boulenouar, S., et al., *The residual innate lymphoid cells in NFIL3-deficient mice support suboptimal maternal adaptations to pregnancy*. Frontiers in immunology, 2016. **7**: p. 43.
147. Xu, Y., et al., *Innate lymphoid cells at the human maternal-fetal interface in spontaneous preterm labor*. Am J Reprod Immunol, 2018. **79**(6): p. e12820.
148. Barnie, P.A., et al., *IL-17 producing innate lymphoid cells 3 (ILC3) but not Th17 cells might be the potential danger factor for preeclampsia and other pregnancy associated diseases*. International Journal of Clinical and Experimental Pathology, 2015. **8**(9): p. 11100.
149. Kamoi, M., et al., *NK22 Cells in the Uterine Mid-Secretory Endometrium and Peripheral Blood of Women with Recurrent Pregnancy Loss and Unexplained Infertility*. Am J Reprod Immunol, 2015. **73**(6): p. 557-67.
150. Tagliani, E. and A. Erlebacher, *Dendritic cell function at the maternal-fetal interface*. Expert Rev Clin Immunol, 2011. **7**(5): p. 593-602.
151. Mahajan, D., et al., *Dendritic Cells and the Establishment of Fetomaternal Tolerance for Successful Human Pregnancy*. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2024. **72**(1).
152. Qian, Z.-D., L.-L. Huang, and X.-M. Zhu, *An immunohistochemical study of CD83- and CD1a-positive dendritic cells in the decidua of women with recurrent spontaneous abortion*. European Journal of Medical Research, 2015. **20**(1): p. 2.
153. Yang, F., Q. Zheng, and L. Jin, *Dynamic Function and Composition Changes of Immune Cells During Normal and Pathological Pregnancy at the Maternal-Fetal Interface*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 2317.
154. Blois, S., et al., *Therapy with dendritic cells influences the spontaneous resorption rate in the CBA/J x DBA/2J mouse model*. Am J Reprod Immunol, 2004. **51**(1): p. 40-8.
155. Huang, S.J., et al., *Pre-eclampsia is associated with dendritic cell recruitment into the uterine decidua*. J Pathol, 2008. **214**(3): p. 328-36.
156. Li, Y., et al., *Evaluation of peripheral and uterine immune status of chronic endometritis in patients with recurrent reproductive failure*. Fertil Steril, 2020. **113**(1): p. 187-196.e1.
157. Luo, X., et al., *Effects of ceftriaxone induced intestinal dysbacteriosis on lymphocytes in different tissues in mice*. Immunobiology, 2016. **221**(9): p. 994-1000.

158. Muzzio, D.O., et al., *B cell development undergoes profound modifications and adaptations during pregnancy in mice*. Biol Reprod, 2014. **91**(5): p. 115.
159. Beard, R.W., et al., *Protective antibodies and spontaneous abortion*. Lancet, 1983. **2**(8358): p. 1090.
160. Tai, N., et al., *Microbial antigen mimics activate diabetogenic CD8 T cells in NOD mice*. Journal of Experimental Medicine, 2016. **213**(10): p. 2129-2146.
161. Bremel, R.D. and E.J. Homan, *Extensive T-Cell Epitope Repertoire Sharing among Human Proteome, Gastrointestinal Microbiome, and Pathogenic Bacteria: Implications for the Definition of Self*. Front Immunol, 2015. **6**: p. 538.
162. Bessell, C.A., et al., *Commensal bacteria stimulate antitumor responses via T cell cross-reactivity*. JCI Insight, 2020. **5**(8).
163. Honda, K. and D.R. Littman, *The microbiota in adaptive immune homeostasis and disease*. Nature, 2016. **535**(7610): p. 75-84.
164. Hegazy, A.N., et al., *Circulating and Tissue-Resident CD4(+) T Cells With Reactivity to Intestinal Microbiota Are Abundant in Healthy Individuals and Function Is Altered During Inflammation*. Gastroenterology, 2017. **153**(5): p. 1320-1337.e16.
165. Smith, P.M., et al., *The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis*. Science, 2013. **341**(6145): p. 569-73.
166. Wang, W.J., et al., *Adoptive transfer of pregnancy-induced CD4+CD25+ regulatory T cells reverses the increase in abortion rate caused by interleukin 17 in the CBA/JxBALB/c mouse model*. Hum Reprod, 2014. **29**(5): p. 946-52.
167. Deshmukh, H. and S.S. Way, *Immunological Basis for Recurrent Fetal Loss and Pregnancy Complications*. Annu Rev Pathol, 2019. **14**: p. 185-210.
168. Tanoue, T., K. Atarashi, and K. Honda, *Development and maintenance of intestinal regulatory T cells*. Nat Rev Immunol, 2016. **16**(5): p. 295-309.
169. Atarashi, K., et al., *Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota*. Nature, 2013. **500**(7461): p. 232-6.
170. Wang, W.J., et al., *Increased prevalence of T helper 17 (Th17) cells in peripheral blood and decidua in unexplained recurrent spontaneous abortion patients*. J Reprod Immunol, 2010. **84**(2): p. 164-70.
171. Bansal, A.S., *Joining the immunological dots in recurrent miscarriage*. Am J Reprod Immunol, 2010. **64**(5): p. 307-15.

172. Díaz-Garrido, N., J. Badia, and L. Baldomà, *Microbiota-derived extracellular vesicles in interkingdom communication in the gut*. J Extracell Vesicles, 2021. **10**(13): p. e12161.
173. Gershuni, V., et al., *Maternal gut microbiota reflecting poor diet quality is associated with spontaneous preterm birth in a prospective cohort study*. Am J Clin Nutr, 2021. **113**(3): p. 602-611.
174. Xu, Y., et al., *Differential intestinal and oral microbiota features associated with gestational diabetes and maternal inflammation*. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism, 2020. **319**(2): p. E247-E253.

7 Erklärung zum Eigenanteil

Diese Arbeit wurde in der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen, Neonatologie und neonatologische Intensivmedizin, im Labor für neonatale Immunologie und Immuntoleranz unter Betreuung von PD Dr. med. Natascha Köstlin-Gille durchgeführt.

Die Konzeption der Studie und die Interpretation der Ergebnisse erfolgten in Zusammenarbeit mit PD Dr. med. Natascha Köstlin-Gille. Die Versuchsdurchführung und -Auswertung erfolgte selbstständig nach Einweisung in die Methoden durch Mitglieder der Arbeitsgruppe. Die Probenvorbereitung und Erstellung der Aufnahmen am Elektronenmikroskop erfolgte durch die Core Facility im Labor der Universitätshautklinik Tübingen. Die Durchführung der Versuche am NanoSight erfolgte mit Unterstützung und freundlicher Genehmigung des Hertie Instituts für klinische Hirnforschung Tübingen. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen erfolgten mit Unterstützung und freundlicher Genehmigung der Inneren Medizin IV der Universitätsklinik Tübingen und dem Deutschen Zentrum für Diabetesforschung.

Die Rekrutierung von Studienteilnehmerinnen erfolgte mit Hilfe des niedergelassenen Gynäkologen Herrn Dr. med. Alexander Marmé.

Die im Rahmen der *in vivo* Versuche erforderlichen Antibiotika-Behandlungen sowie die Tötung der Versuchstiere erfolgten durch Dr. rer. nat. Stefanie Dietz. Die anschließende Organentnahme sowie die weitere Versuchsdurchführung und -Auswertung wurden eigenständig durchgeführt.

Ich versichere, das Manuskript selbstständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den

Samantha Kewitz