

Aus der
Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen
Kinderheilkunde IV
Neonatologie, neonatologische Intensivmedizin

**Die Wirkung von bakteriellen extrazellulären Vesikeln
aus dem Stuhl Neu- und Frühgeborener auf den
Phänotyp von T-Zellen und Monozyten**

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

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

vorgelegt von

Uhlig, Luzia Maria

2026

Dekanin: Professorin Dr. S. Y. Brucker

1. Berichterstatterin: Privatdozentin Dr. N. Köstlin-Gille
2. Berichterstatterin: Professorin Dr. L. Maier

Tag der Disputation: 06.03.2026

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	6
Abbildungsverzeichnis	8
Tabellenverzeichnis	10
1 Einleitung	11
1.1 Das Immunsystem des Neugeborenen.....	11
1.2 Das intestinale Mikrobiom und dessen Entwicklung	13
1.2.1 Der Einfluss des sich etablierenden Mikrobioms auf das Immunsystem..	14
1.3 Bakterielle extrazelluläre Vesikel (BEVs).....	15
2 Fragestellung und Ziel der Arbeit	17
3 Material und Methoden.....	18
3.1 Material	18
3.1.1 Humane Proben	18
3.1.2 Probensammlung	19
3.1.3 Chemikalien	19
3.1.4 Puffer, Kulturmedien und Gele.....	20
3.1.5 Kits	21
3.1.6 Antikörper.....	22
3.1.7 Primer qPCR.....	23
3.1.8 Geräte	24
3.1.9 Software	24
3.2 Methoden	25
3.2.1 Isolation der BEVs aus Stuhl	25
3.2.2 Charakterisierung der bakteriellen EVs	25
3.2.3 Stimulation von PBMC mit BEVs und phänotypische Charakterisierung..	32
3.2.4 Statistische Auswertung.....	35
4 Ergebnisse	36
4.1 Charakterisierung der BEVs	36

4.1.1	Analyse der mikrobiellen Zusammensetzung von BEVs Neugeborener und Erwachsener	38
4.1.2	Auswirkungen einer Stimulation mit BEVs auf den Phänotyp von Monozyten	40
4.1.3	Auswirkungen einer Stimulation mit BEVs auf T-Zell-Subpopulationen ...	43
4.1.4	Auswirkungen einer Stimulation mit BEVs auf T-Zell-Aktivierungsmarker	46
4.2	Untersuchung der Effekte von BEVs aus dem Stuhl Frühgeborener.....	47
4.2.1	Mikrobielle Zusammensetzung von BEVs Frühgeborener im Vergleich zu der Zusammensetzung BEVs Neugeborener	47
4.2.2	Auswirkungen einer Stimulation mit BEVs Frühgeborener im Vergleich zu BEVs Neugeborener auf die Monozyten-Aktivierung	49
4.2.3	Auswirkungen einer Stimulation mit BEVs Frühgeborener im Vergleich zur Stimulation mit BEVs Neugeborener auf T-Helferzell-Populationen und T-Zell-Aktivierungsmarker	50
4.3	Untersuchung des Effekts einer frühen Antibiotikaexposition auf die Zusammensetzung und die immunologischen Effekte von BEVs aus dem Stuhl Frühgeborener	53
4.3.1	Die mikrobielle Zusammensetzung von BEVs Frühgeborener ohne Antibiotikaexposition im Vergleich zu BEVs Frühgeborener mit Antibiotikaexposition	53
4.3.2	Auswirkungen einer Stimulation mit BEVs Frühgeborener mit Antibiotikaexposition im Vergleich zur Stimulation mit BEVs Frühgeborener ohne Antibiotikaexposition auf die Monozyten-Aktivierung.....	55
4.3.3	Auswirkung von BEVs Frühgeborener ohne Antibiotikaexposition im Vergleich zu BEVs Frühgeborener ohne Antibiotikaexposition auf T-Helferzell-Populationen und T-Zell-Aktivierungsmarker.....	56
5	Diskussion.....	58
5.1	Charakterisierung der BEVs	58
5.2	Die Wirkung von BEVs Erwachsener und reifer Neugeborener auf den Phänotyp von Immunzellen	59
5.2.1	Der Einfluss von BEVs Erwachsener und reifer Neugeborener auf den Phänotyp von Monozyten	60

5.2.2	Der Einfluss von BEVs Erwachsener und reifer Neugeborener auf den Phänotyp von T-Zellen.....	62
5.3	Die Wirkung von BEVs aus dem Stuhl Neugeborener im Vergleich zu BEVs aus dem Stuhl Frühgeborener auf Immunzellen.....	64
5.3.1	Der Einfluss von BEVs Frühgeborener auf Immunzellen.....	65
5.4	Die Wirkung von BEVs Frühgeborener ohne und mit früher Antibiotikaexposition	66
5.4.1	Der Einfluss von BEVs Frühgeborener ohne und mit Antibiotikaexposition auf den Phänotyp von Immunzellen	67
5.5	Limitationen und Ausblick	67
6	Zusammenfassung	70
7	Literaturverzeichnis.....	72
8	Erklärung zum Eigenanteil.....	85
9	Danksagung	86
10	Vorträge/ Posterpräsentationen	87

Abkürzungsverzeichnis

ANOVA	Varianzanalyse (analysis of variance)
APC	Allophycocyanine
APS	Ammoniumperoxodisulfat
APZ	Antigen-präsentierende Zellen
Art#	Artikelnummer
BEV	bakterielle extrazelluläre Vesikel
BCA	Bicinchoninsäure (bicinchoninic acid)
BPD	bronchopulmonale Dysplasie
CD	Differenzierungscluster (cluster of differentiation)
CFSE	Carboxyfluorescein-Ester (Carboxyfluorescein ester)
CMVs	Zytoplasmatische Membran-Vesikel (cytoplasmic membrane vesicles)
CR3	Komplementrezeptor 3 (complement receptor 3)
Cy7	Cyanine7
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (enzyme-linked immunosorbent assay)
EMA	europäische Arzneimittelbehörde
EU	Endotoxin Einheiten (endotoxin units)
EV	Extrazelluläre Vesikel
FACS	Durchflusszytometrie (fluorescence activated cell sorting)
FCS	Fetales Kälberserum (fetal calf serum)
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FSC	Vorwärtsstreulicht (forward scatter)
HCl	Salzsäure (hydrochlorid acid)
IECs	Intestinale Epithelzellen (intestinal epithelial cells)
IFN	Interferon
LPS	Lipopolysaccharid
LTA	Lipoteichonsäure (lipoteichoic acid)
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität (mean fluorescence intensity)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex)
NaCl	Natriumchlorid

NEC	Nekrotisierende Enterokolitis
NET	Neutrophile extrazelluläre Fallen (neutrophil extracellular traps)
NTA	Nanopartikel-Tracking-Analyse
OMVs	äußere Membran-Vesikel (outer membrane vesicle)
P/S	Penicillin/ Streptomycin
PBMC	Periphere mononukleäre Blutzellen (peripheral blood mononuclear cells)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin chlorophyll protein
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PRR	Mustererkennungsrezeptor (pattern recognition receptor)
rcf	relative Zentrifugalkraft (relative centrifugal force)
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RSV	Humanen respiratorischen Synzytial- Virus
RT-qPCR	Quantitative Echtzeit-PCR (realtime quantitative polymerase chain reaction)
SDS	Natriumdodecylsulfat (Sodium dodecyl sulfate)
SSC	Seitwärtsstreulicht (side scatter)
SSW	Schwangerschaftswoche
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (Tris-buffered saline)
TEMED	Tetramethylethylenediamin
TGF- β	transformierender Wachstumsfaktor- β (Transforming Growth Factor- β)
TH1	Typ 1 T-Helferzellen
TH17	Typ 17 T-Helferzellen
TH2	Typ 2 T-Helferzellen
TLR	Toll-like Rezeptor
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
Treg	regulatorische T-Helferzelle (CD4+ CD25+)
TZR	T-Zell-Rezeptor

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Schmelzkurve der RT-qPCR	31
Abbildung 2 Gating-Strategie von Monozyten	33
Abbildung 3 Gating-Strategie der untersuchten T-Zell-Subpopulationen	34
Abbildung 4 Bestimmung der Größe und der Konzentration von BEVs aus Stuhl mittels NTA.....	36
Abbildung 5 Phänotypische Charakterisierung der BEVs aus Stuhl	38
Abbildung 6 RT-qPCR sechs häufiger Phyla des intestinalen Mikrobioms in BEVs Erwachsener und BEVs Neugeborener.....	39
Abbildung 7 Die Stimulation von PBMCs mit BEVs Neugeborener führte zu einer Veränderung der Expression von Oberflächenmarkern auf Monozyten.....	43
Abbildung 8 Durch BEVs Neugeborener stimulierte T-Zellen exprimieren mehr CD4 und weniger CD8 als nicht-stimulierte T-Zellen.....	44
Abbildung 9 Der Anteil von TH1 und Treg an T-Helferzellen wird in Anwesenheit von BEVs Erwachsener und Neugeborener verändert, TH2 und TH17 zeigen keine signifikanten Veränderungen durch BEV-Stimulation.....	46
Abbildung 10 Keine Veränderung der Expression der Aktivierungsmarker CD44, CD62L und PD-L1 auf T-Zellen nach Stimulation mit BEVs.....	47
Abbildung 11 RT- qPCR sechs häufiger im intestinalen Mikrobiom vorkommender Phyla aus BEVs Neugeborener zum Zeitpunkt 2 und BEVs Frühgeborener	48
Abbildung 12 Die Stimulation von PBMCs mit BEVs Neugeborener und Frühgeborener führte zu einer Veränderung der Expression von CD11b und CD18 auf Monozyten ...	50
Abbildung 13 Keine Unterschiede im Vorkommen von T-Zell-Subpopulationen nach Stimulation mit BEVs Neugeborener und BEVs Frühgeborener	51
Abbildung 14 Die Stimulation mit BEVs mit BEVs Neugeborener und BEVs Frühgeborener führte zu einer Veränderung der Expression der Aktivierungsmarker CD44 und PD-L1 auf T-Zellen	52
Abbildung 15 RT- qPCR sechs häufiger im intestinalen Mikrobiom vorkommender Phyla aus BEVs Frühgeborener ohne und mit Antibiotikaexposition in der ersten Lebenswoche	54
Abbildung 16 Keine Unterschiede in der Expression der untersuchten Oberflächenmarker auf Monozyten nach Stimulation mit BEVs aus dem Stuhl Frühgeborener ohne und mit früher Antibiotikaexposition.....	55

Abbildung 17 Keine Unterschiede im Vorkommen von T-Zell-Subpopulationen nach Stimulation mit BEVs aus dem Stuhl Frühgeborener ohne und mit früher Antibiotikaexposition	56
Abbildung 18 Keine Unterschiede der Expression der Aktivierungsmarker CD44, CD62L und PD-L1 auf T-Zellen nach Stimulation mit BEVs Frühgeborener mit und ohne Antibiotikaexposition	57

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Tabelle der für die Probensammlung verwendeten Materialien.....	19
Tabelle 2 Tabelle der verwendeten Chemikalien und Reagenzien.....	19
Tabelle 3 Tabelle der verwendeten Puffer, Kulturmedien und Gele	20
Tabelle 4 Tabelle der verwendeten Kits.....	21
Tabelle 5 Tabelle der zur durchflusszytometrischen Untersuchung von T-Zellen und Monozyten verwendeten humanen Antikörper	22
Tabelle 6 Tabelle der für den Western Blot verwendeten Antikörper	23
Tabelle 7 Tabelle der für die qPCR verwendeten Primer	23
Tabelle 8 Tabelle der verwendeten Geräte.....	24
Tabelle 9 Tabelle der verwendeten Software	24
Tabelle 10 Bezeichnung der Probanden-Gruppen	35

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem des Neugeborenen

Infektionen sind eine der wichtigsten Ursachen für Morbidität und Mortalität in der Neugeborenen-Periode. Etwa 8% der weltweiten Todesfälle in der Neonatal-Periode sind auf schwere Infektionserkrankungen zurückzuführen. Auch führen Infektionen in der frühen Kindheit zu Morbidität im weiteren Leben (Attia Hussein Mahmoud et al., 2023). Neugeborene und insbesondere Frühgeborene sind deutlich anfälliger für Infektionen als ältere Kinder und Erwachsene, was auf einen veränderten Funktionszustand des Immunsystems Neugeborener zurückzuführen ist.

Das Immunsystem besteht aus zwei wesentlichen Komponenten – dem angeborenen Immunsystem und dem adaptiven Immunsystem. Kennzeichnend für die angeborene Immunität ist eine direkte Reaktion auf Pathogene, ohne dass vorher ein Kontakt zu diesen nötig ist. Zu den Zellen des angeborenen Immunsystems zählen Monozyten, Makrophagen und Dendritische Zellen. Diese Zellen werden auch als Antigen-präsentierende Zellen (APZ) bezeichnet. Sie prozessieren Antigene so, dass diese durch Zellen der adaptiven Immunität erkannt werden können. Monozyten sind zirkulierende Vorläufer gewebeständiger Makrophagen und Dendritischer Zellen (Coillard & Segura, 2019). Die meisten Monozyten zirkulieren etwa einen Tag bis sie in unterschiedliche Gewebe auswandern. Im Vergleich zu im Blut zirkulierenden Monozyten, zeigen die ins Gewebe ausgewanderten Monozyten genetische Veränderungen, welche von der jeweiligen Umgebung abhängig sind (Guilliams et al., 2018). Sie sind in der Lage andere Immunzellen anzulocken und tragen damit zur Aktivierung der angeborenen und adaptiven Immunität bei (Rossol et al., 2011).

Zur erworbenen Immunität zählen B- und T-Lymphozyten. T-Zellen besitzen einen spezifischen Rezeptor, den sogenannten T-Zell-Rezeptor (TZR), welcher Antigene erkennt, die über MHC gebunden sind. Als kennzeichnenden Oberflächen-Rezeptor exprimieren alle T-Zellen CD3. Darüber hinaus tragen T-Zellen entweder CD4 oder CD8, die jeweils für die Bindung an unterschiedliche

MHC-Moleküle verantwortlich sind. Zytotoxische T-Zellen kennzeichnet CD8, dieses bindet MHC I, welches proteosomal degradierte Proteine an der Zelloberfläche nahezu jeder Zelle des menschlichen Organismus präsentiert. Sie dienen vor allem der Abwehr von intrazellulären Erregern und der Elimination genetisch veränderter Zellen (Murphy, 2018). T-Helferzellen tragen auf ihrer Oberfläche CD4, welches an MHC II auf APZ wie Dendritischen Zellen, Monozyten, Makrophagen oder B-Zellen bindet. T-Helferzellen können weiter in unterschiedliche Subgruppen unterteilt werden. Typ 1 T-Helferzellen (TH1) dienen v.a. der Bekämpfung intrazellulärer Erreger (Murphy, 2018; Sun et al., 2023), Typ 2 T-Helferzellen (TH2) dienen der Abwehr von Helminthen, tragen zur Regeneration von Geweben bei und sind an der Entstehung von Allergien und Asthma beteiligt (Sun et al., 2023; Zhu, 2015). Typ 17 T-Helferzellen (TH17) spielen vor allem im Bereich der Schleimhäute bei der Abwehr extrazellulärer Erreger eine entscheidende Rolle. Außerdem sind sie an chronischen Entzündungen und Autoimmunerkrankungen beteiligt (Murphy, 2018; Sun et al., 2023). Regulatorische T-Helferzellen (Treg) modulieren die Immunantworten, indem sie die Aktivierung anderer Immunzellen hemmen (Murphy, 2018; Sun et al., 2023).

B-Zellen sind durch das Oberflächenantigen CD19 und den B-Zell-Rezeptor gekennzeichnet. Sie können nach Kontakt mit APZ und T-Zellen hochaffine Antikörper herstellen, welche Antigene erkennen und durch verschiedene Mechanismen wie bspw. Bindung und Neutralisation oder Opsonierung zur Elimination von Pathogenen beitragen (Huang, 2020; Murphy, 2018).

Bei Neugeborenen spielt vor allem die angeborene Immunität eine wichtige Rolle, da das adaptive Immunsystem zunächst durch den Kontakt mit Antigenen reifen muss. Verschiedene Unterschiede in der angeborenen Immunantwort zwischen Neugeborenen und Erwachsenen konnten beschrieben werden. So tragen beispielsweise neutrophile Granulozyten des Neugeborenen weniger Toll-like-Rezeptor 4 (TLR4), welcher zur Erkennung bakterieller Oberflächenproteine dient, auf ihrer Oberfläche. Außerdem sind Neutrophile des Neugeborenen schlechter in der Lage sogenannte neutrophil extracellular traps (NETs), zu bilden, die für die Bindung von Pathogenen wichtig sind. Zudem zeigen sie eine

verringerte Fähigkeit sich zum Ort einer Infektion zu bewegen. Neonatale Monozyten weisen im Vergleich zu Monozyten Erwachsener eine reduzierte Kapazität zur Zytokin-Sekretion, zur T-Zell-Stimulation, sowie zur Diapedese in entzündetes Gewebe auf (Kollmann et al., 2009; Sanchez-Schmitz et al., 2020; L. Wisgrill et al., 2016). Diese Unterschiede in der angeborenen Immunität tragen wahrscheinlich zur erhöhten Infektions-Anfälligkeit Neugeborener bei (Moraes-Pinto et al., 2021).

Auf Seiten der erworbenen Immunität zeigen Neugeborene ein verringertes TZR-Repertoire, was zu einer verringerten Aktivierung CD8 - positiver T-Zellen und dadurch zu einer eingeschränkten Immunantwort gegenüber Viren wie dem Humanen respiratorischen Synzytial- Virus (RSV) oder Influenza führt (Fike et al., 2019). Außerdem ist bei Neugeborenen das Verhältnis von TH1 und TH2 zu Gunsten von TH2 verschoben (Moraes-Pinto et al., 2021). Dies trägt zu einer erhöhten Empfänglichkeit Neugeborener für Infektionen mit intrazellulären Erregern bei (Cuenca et al., 2013). TH17-Zellen scheinen beim Neugeborenen im Vergleich zum Erwachsenen ebenfalls verringert zu sein, während Treg vermehrt vorkommen (Basha et al., 2014; Mold et al., 2010; Rudd, 2020). Beides trägt vermutlich zur Toleranzinduktion und damit zur Begünstigung der Etablierung des Mikrobioms bei (Henrick et al., 2021).

1.2 Das intestinale Mikrobiom und dessen Entwicklung

Etwa 10^{13} bis 10^{14} Mikroorganismen besiedeln den menschlichen Darm (Gill et al., 2006). Die Gesamtheit dieser Mikroorganismen wird als intestinales Mikrobiom bezeichnet. Das intestinale Mikrobiom trägt ganz entscheidend zur Gesunderhaltung bei, indem es beispielsweise die Kolonisation des Darms mit Pathogenen verhindert, bioaktive Metabolite freisetzt und auf unterschiedliche Weise Immunzellen beeinflusst (Anthony et al., 2021; Brown et al., 2023; Takiishi et al., 2017). Im Falle einer gestörten Zusammensetzung, der sogenannten Dysbiose, kann das intestinale Mikrobiom aber auch an der Entstehung verschiedener Erkrankungen wie Allergien, chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, Adipositas und vielen weiteren beteiligt sein (Dzidic et al., 2020; Tun et al., 2018; Yan et al., 2020). Die Entwicklung des intestinalen

Mikrobioms beginnt unmittelbar nach der Geburt. In der sogenannten TEDDY-Studie wurden mehr als 12000 Stuhl-Proben von 903 Kindern in der Lebensspanne von 3 bis 46 Monaten gewonnen und mittels 16s-rRNA Gen-Sequenzierung analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Entwicklung des Darmmikrobioms in der frühen Kindheit in drei Phasen abläuft. Während der ersten Phase des sich entwickelnden Mikrobioms im Alter von drei bis 14 Monaten sind Bifidobakterien die vorherrschende Spezies. Es folgt dann eine transitionale Phase im Alter von 15 bis 30 Monaten, in der v.a. Proteobakterien und Bacteroidetes überwiegen. Die stabile Phase beginnt im Alter von 31 bis 46 Monaten und es kommt zu einem Vorherrschen von Firmicutes. Während das Mikrobiom im Laufe der Entwicklung an Alphadiversität (hohe Artenvielfalt im individuellen Mikrobiom) zunimmt, nimmt die Betadiversität (Unterschiede des Mikrobioms zwischen verschiedenen Individuen) mit zunehmendem Alter ab (Stewart et al., 2018).

Zu den größten äußeren Einflussfaktoren auf die Entwicklung des Mikrobioms zählen das maternale Mikrobiom, welches bereits pränatal auf das intestinale Mikrobiom des Kindes wirkt, der Geburtsmodus, die Säuglingsnahrung, das Gestationsalter zum Zeitpunkt der Geburt, eine frühe Antibiotikatherapie und die Umgebung des Neugeborenen (Ferretti et al., 2018; Gopalakrishna & Hand, 2020; Korpela et al., 2018; Korpela et al., 2020; Mishra et al., 2021; Rackaityte et al., 2020; Reyman et al., 2019; Xiao et al., 2021; Xu et al., 2022).

1.2.1 Der Einfluss des sich etablierenden Mikrobioms auf das Immunsystem

Die Etablierung des intestinalen Mikrobioms trägt entscheidend zur Entwicklung des Immunsystems bei (Xiao & Zhao, 2023). Bereits das maternale Mikrobiom während der Schwangerschaft scheint Einfluss auf das Immunsystem des Fetus zu haben. So wurden in Feten von Mäusen des 2. Trimesters verschiedene Bakterien im Gewebe nachgewiesen, welche *in vitro* fetale Gedächtnis-T-Zellen aktivierten (Mishra et al., 2021). Ebenfalls zeigte eine vorübergehende mikrobielle Kolonisierung des Darms während der Trächtigkeit ansonsten

keimfrei gehaltener Mäuse eine Veränderung der angeborenen Immunantwort der neugeborenen Tiere (Gomez de Agüero et al., 2016).

In zahlreichen Studien wurde eine Assoziation zwischen der mikrobiellen Zusammensetzung während der frühen Phasen der Mikrobiometablierung und späteren immunologischen Erkrankungen beschrieben. So konnten Low et al. (2017) zeigen, dass ein vermehrtes Vorkommen von Klebsiellen im Mikrobiom im Alter von drei Lebensmonaten mit einem vermehrten Auftreten von Allergien im späteren Leben assoziiert war (Low et al., 2017). In einer Studie an keimfrei gehaltenen Mäusen konnte gezeigt werden, dass ein Transfer von Stuhl von Kindern mit Allergieprädisposition im Vergleich zum Transfer von Stuhl von Kindern ohne Allergieprädisposition eine systemische Polarisierung der T-Zell-Antwort hin zu TH17 bei den Nachkommen bewirkte (Petursdottir et al., 2017). Reyman et al. (2019) konnten einen negativen Zusammenhang zwischen einer erhöhten Anzahl an Bifidobakterien und einer erniedrigten Anzahl von *Klebsiella spp.* und *Enterokokkus spp.* mit respiratorischen Infekten im ersten Lebensjahr zeigen (Reyman et al., 2019). Dabei scheint es gerade die frühe Phase der Mikrobiometablierung unmittelbar nach der Geburt zu sein, welche die Immunentwicklung langfristig beeinflusst (El Aidy et al., 2013). So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass eine frühe Modulation des Mikrobioms durch Antibiotika die Impfantwort von Mäusen signifikant beeinträchtigt, während eine Exposition gegenüber Antibiotika im späteren Leben diesen Effekt nicht zeigte (Lynn et al., 2018). Bisher sind die Mechanismen der Mikrobiom-Immun-Interaktion am Lebensanfang noch unvollständig verstanden.

1.3 Bakterielle extrazelluläre Vesikel (BEVs)

Extrazelluläre Vesikel (EVs) sind mit einer Phospholipid-Doppelmembran umgebene 20 bis 500 nm große Nanopartikel, welche von eukaryotischen und prokaryotischen Zellen produziert werden (Díaz-Garrido et al., 2021). Bakterielle extrazelluläre Vesikel (BEVs) enthalten u.a. Lipopolysaccharid (LPS), Proteine, Peptidoglykane, Nukleinsäuren, DNA, kurzkettige Fettsäuren (SCFA), RNA, niedermolekulare Verbindungen wie z. B. antimikrobielle Peptide und Fette. BEVs von gram-negativen Bakterien entstammen hauptsächlich der äußeren

Membran der Bakterien, daher werden sie als äußere Membran-Vesikel (OMVs) bezeichnet (Schwechheimer et al., 2013). Gram-positive Bakterien bilden zytoplasmatische Membran-Vesikel (CMVs), diese enthalten kein oberflächliches LPS oder andere periplasmatische Komponenten. BEVs dienen neben der Interaktion zwischen einzelnen Bakterienphyla auch der Interaktion mit dem Wirt und dessen Immunsystem. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass BEVs von *Escherichia coli* Treg induzierens und dadurch antiinflammatorisch wirken können (Fábrega et al., 2017). BEVs werden hauptsächlich durch Endozytose in die Immunzellen des Wirts aufgenommen. Endothelzellen und andere nicht zu Phagozytose fähige Zellen nehmen BEVs, je nach Inhalt und Größe, durch Makropinozytose und Clathrin-vermittelte Endozytose auf (Liang et al., 2022; O'Donoghue & Krachler, 2016).

BEVs finden sich nicht ausschließlich im Darm, sondern können auch Membranen passieren und ins Blut gelangen (Champagne-Jorgensen et al., 2021). Auch beim Menschen wurden schon zirkulierende BEVs gefunden, welche im Blut v.a. mit Monozyten interagierten (Schaack et al., 2022). Lajqi et al. (2022) konnten zeigen, dass BEVs zur Induktion von Gedächtnis-Funktionen in neutrophilen Granulozyten beitragen können (Lajqi et al., 2022). Über die Interaktion von BEVs mit dem Immunsystem in der Neugeborenenzeit ist bisher kaum etwas bekannt. Turunen et al. (2022) zeigten, dass bereits im Mekonium BEVs zu finden sind, welche bakterielle RNA enthalten (Turunen et al., 2022). Auch in der Muttermilch konnten BEVs nachgewiesen werden (Kim & Yi, 2020). Bisher ist wenig darüber bekannt, ob BEVs beim Neugeborenen die systemische Immunantwort modulieren.

2 Fragestellung und Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, die über BEVs vermittelte Interaktion des intestinalen Mikrobioms mit dem Immunsystem während der Neugeborenenzeit zu untersuchen. Hierfür wurden die Effekte von BEVs aus Stuhl Neugeborener auf Immunzellen in einem *in-vitro* Modell untersucht.

Dabei sollten folgende Hypothesen überprüft werden:

1. BEVs aus dem Stuhl Neugeborener aktivieren Immunzellen
2. Der Effekt von BEVs aus dem Stuhl Neugeborener auf Immunzellen verändert sich mit zunehmendem Alter
3. Einflüsse auf das Mikrobiom wie Frühgeburtlichkeit oder perinatale Antibiotikaexposition verändern die Effekte von BEVs aus dem Stuhl auf Immunzellen

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 *Humane Proben*

Für die *in-vitro*-Versuche wurden Stuhlproben Früh- und Neugeborener, sowie gesunder Erwachsener verwendet. Die Versuche wurden durch die Ethikkommission der Eberhard-Karls-Universität und des Universitätsklinikums Tübingen genehmigt (422/2022BO2, 024/2022BO1). Im Zeitraum von 15.10.2022 bis 31.07.2023 wurden insgesamt 38 Probanden über die Universitätskinderklinik, Abteilung Neonatologie in Tübingen und im Bekanntenkreis der Mitarbeiter:innen des Labors für Neonatale Immunologie und Immuntoleranz eingeschlossen.

Stuhlproben Reifgeborener ($n = 10$) wurden von Kindern ab einem Gestationsalter von $>37+0$ SSW gesammelt. Das mittlere Gestationsalter der reifgeborenen Kinder lag bei $38 + 3$ SSW. Alle Kinder dieser Kohorte wurden mittels primärer Sectio cesarea entbunden und mit Muttermilch ernährt. Ausschlusskriterien für die Studienteilnahme bei reifgeborenen Kindern waren bekannte genetische Erkrankungen, ein bekannter Immundefekt und Fehlbildungen. Mütterliche Ausschlusskriterien für den Einschluss reifgeborener Kinder waren ein Alter jünger als 18 Jahre, immunologische oder rheumatische Erkrankung, immunsuppressive Therapie, akute Mastitis, Stillverzicht, akute Infektionserkrankung, Amnioninfektionssyndrom, Gestationsdiabetes oder eine Präeklampsie/ Eklampsie.

Stuhlproben Frühgeborener mit und ohne Antibiotikaexposition in der ersten Lebenswoche ($n = 8$ bis 11) wurden von Kindern mit einem Gestationsalter zwischen $26+4$ und $31+6$ SSW gesammelt. Das mittlere Gestationsalter der Frühgeborenen Kinder lag bei $29 + 4$ SSW. Ausschlusskriterien für die Studienteilnahme bei Frühgeborenen waren genetische und hämatologische Erkrankungen, Immunglobulin-Gaben innerhalb der ersten 60 Lebenstage, Immundefekte und chronische Infektionen. Mütterliche Ausschlusskriterien für den Einschluss Frühgeborener waren ein Alter jünger als 18 Jahre,

immunologische oder rheumatische Erkrankung, immunsuppressive Therapie, akute Mastitis, Stillverzicht, eine akute Infektions- oder Hepatitis B Erkrankung.

Der Stuhl der Erwachsenen Kontrollpopulation (n= 18) wurde von Personen mit einem Alter von >18 und <50 Jahre ohne chronisch entzündliche Darmerkrankungen und ohne Einnahme von Probiotika in den letzten zwei Monaten gewonnen.

3.1.2 Probensammlung

Tabelle 1 Tabelle der für die Probensammlung verwendeten Materialien

Produkt	Herstellerangaben
DNA/ RNA- Shield – Fecal Collection Tube	Zymo Research, Art.#: R1101

3.1.3 Chemikalien

Tabelle 2 Tabelle der verwendeten Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien/ Reagenzien	Angaben des Herstellers
Ampuwa® Spüllösung (destilliertes Wasser)	Fresenius, Plastipur Aqua ad injectabilia, Art.#: B23067A
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	Carl Roth, >98% p.a., ACS, 50g, Art.#: 9592.3
Pancoll Separating Solution	PanBiotech GmbH, 1,077 g/ml, Art.#: L6115
Bromphenolblau	Sigma Aldrich, Art.#: B5525-10G
Ethanol	AppliChem GmbH, 2500PE/UN1170, Art.#: A1613
TM -TC®	System Biosciences, Art.#: EXOTC50A-1
FACS-Flow	BD Bioscience, 20 l, Ref#: 342003
FCS	PanBiotech GmbH, 500 ml, Art.#: S0115
Glycerol	Sigma Aldrich, Art.#: G9012-100ML
Glycin	Sigma Aldrich, Art.#: G8898-500G
HCl (Salzsäure)	Sigma Aldrich, Art.#: H1758-100ML
Heparin-Natrium-5000-ratiopharm 5000 I.E./2mL	Ratiopharm, Art#: 4150030298208
β Mercaptoethanol	Merck KgaA, Art.#: M3148-25ML
Methanol	AppliChem GmbH, Art.#: 131091.1211
Milchpulver	Roth, Art.#: T145.2
NaCl (Natriumchlorid)	Merck KgaA, Art.#: 1064040500

P/S	PanBiotech, Art.#: A2212
Proteinmarker 10-180 kDa (Page Ruler Prestained Protein Ladder)	PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Thermo Fisher, Art.#: 26616
PBS Dulbecco	PanBiotech GmbH, Art.#: L1825
PIC (Protease inhibitor cocktail)	Roche, Art.#: 11697498001
PMSF Phenylmethylsulfonylfluorid	Thermo Fisher Scientific, Art.#: 36978
Rotiophore Gel 30	Carl Roth, Art.#: 3029.1
RPMI 1640 Zellkulturmedium	PanBiotech GmbH, Art.#: F1215
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Sigma Aldrich, Art.#: L3771-100G
SYBR green	Thermo Fisher Scientific, Art.#: A25742
TBS-Tween 20	Carl Roth, Art.#: 9127.1
TEMED	Carl Roth >99% p.a., Art.#: 2367.3
TrisBase	Sigma Aldrich, Art.#: 93362-250G
Triton X 100 (Octoxinol 9)	Sigma Aldrich, Art.#: X100-100ML

3.1.4 Puffer, Kulturmedien und Gele

Tabelle 3 Tabelle der verwendeten Puffer, Kulturmedien und Gele

Material	Verwendung	Zusammensetzung
FACS-Puffer	Waschen von Antikörperfärbungen	FACS-Flow 0,1% NaN ₃
RPMI-Medium	Zellkultur	PRMI 1640 Medium 10% FCS 1% L-Glutamin 1% P/S
Lysepuffer (BCA)	Proteinbestimmung BCA; Western Blot und SDS	4,3 mL Ampuwa 250 µL Tris/ HCl pH 7,4 (24,2g Tris/ Base in 140 mL VE-Wasser gelöst, pH eingestellt mit 25% HCl) 100 µL 5 M NaCl 50 µL 10% Triton X100 200 µL PIC 50 µL PMSF
Ladepuffer	Gel-Elektrophorese	1,25 mL TrisBase pH 6,8 4 mL 10% SDS 2 mL Glycerol

		1,75 mL Ampuwa 1 mg Bromphenolblau Pro Ladepuffer 90 µL Ladepuffer 10 µL Mercaptoethanol
Laufpuffer	Westernblot und SDS-Page	30 g TrisBase 144 g Glycin 10 g 10% SDS Mit destilliertem Wasser auf 1 L auffüllen
Sammelgel (10%)	Western Blot	5,86 mL Ampuwa 990 µL Rotiophorere Gel30 450 µL 1,5M TrisBase pH 6,8 32,6 µL A 7,6 µL TEMED
Trenngel (10%)	Western Blot	8 mL Ampuwa 6,6 mL Rotiophorere Gel30 5 mL 1,5 M TrisBase pH8,8 200 µL 10% SDS 100 µL APS 10 µL TEMED
Transferpuffer	Western Blot	6 g TrisBase (Trisema®) 25 mM 28,8 g Glycin 400 mL Methanol mit VE-Wasser auf 2 L auffüllen

3.1.5 Kits

Tabelle 4 Tabelle der verwendeten Kits

Versuch	Produktname	Herstellerangaben
LTA ELISA	Human Lipoteichoic Acid (LTA) ELISA Kit	abbexa® Art#:abx257487
Endotoxin ELISA	Pierce™ Chromogenic Endotoxin Quant Kit	Thermo Scientific™ Art.#: A39552
DNA Isolation	ZymoBIOMICS DNA Microprep Kit	ZymoBIOMICS Art.#: D4301
DNA Isolation	ZymoBIOMICS DNA Miniprep Kit	ZymoBIOMICS Art.#: 4300
BCA	BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, 23225

Western Blot	Chemilumineszenzlösung:	
	Amersham TM ECL TM Western Blotting Analysis System	GE Healthcare, Art.#: RPN2109

3.1.6 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 5).

Tabelle 5 Tabelle der zur durchflusszytometrischen Untersuchung von T-Zellen und Monozyten verwendeten humanen Antikörper

Antikörper	Klon	Herstellerangaben
FVS510		BD Biosciences, Art.#: 564406
CD8 APC	RPA-T8	BD Biosciences, Art.#:555369
CCR6 APC	G034E3	BioLegend, Art.#: 353418
CD279 (PD-1) APC	NAT105	Biolegend, Art.#: 367406
CD11b APC	REA713	Miltenyi, Art.#: 130-110-554
PD-L1 APC	B7-H1	Biolegend, Art.#: 329707
TLR2 APC	11G7	BD Biosciences, Art.#: 558319
CD45 APC-Cy7	2D1	BioLegend, Art.#: 368515
CD25 BV421	M-A251	BioLegend, Art.#: 356129
CD62L BV421	DREG-56	BioLegend, Art.#: 304827
CCR4 FITC	205410	R&D Art.#: FAB1567-F
CD44 FITC	C44Mab-5	BioLegend, Art.#: 397517
CD18 FITC	TS1/18	BD Biosciences, Art.#: 130-120-248
CD86 FITC	2331	BD Biosciences, Art.#: 555657
CD152 (CTLA4) PE	BNI3	Biolegend, Art.#: 369604
CD183 (CXCR3) PE	1C6/CXCR3	BD, Art.#: 560928
CD200 PE	OX-104	Biolegend, Art.#:329205
CD69 PE	L78	BD, Art.#: 347827
CD16 PE	3G8	BD Biosciences, Art.#: 556619
CD80 PE	L307.4	BD Biosciences, Art.#: 557227
PD-L2 PE	24F.10C12	Biolegend, Art.#: 329606

TLR4 PE	TF901	BD Biosciences, Art.#: 564215
CD3 PE-Cy7	HIT3a	BioLegend, Art.#: 300316
CD4 PerCP	RPA-T4	BD Biosciences, Art.#: 555751
CD14 PerCP	Tük4	Miltenyi, Art.#: 130-113-150

Bei den für den Western Blot verwendeten Antikörpern handelt es sich um „Rabbit Anti-Human“ Antikörper (Tabelle 6).

Tabelle 6 Tabelle der für den Western Blot verwendeten Antikörper

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

3.1.7 Primer qPCR

Tabelle 7 Tabelle der für die qPCR verwendeten Primer

Target	Sequenz
Actinobacteria	Forward: TACGGCCGCAAGGCTA
	Reverse: TCRTCCCCACCTTCCTCCG
Alphaproteobacteria	Forward: CIAGTGTAGAGGTGAAATT
	Reverse: CCCCGTCAATTCCTTTGAGTT
Bacteroidetes	Forward: CRAACAGGATTAGATACCCT
	Reverse: GGTAAGGTTCTCGCGTAT
Firmicutes	Forward: GGAGYATGTGGTTTAATTCGAAGCA
	Reverse: AGCTGACGACAACCATGCAC
Fusobacteria	Forward: AAGCGCGTCTAGGTGGTTATGT
	Reverse: TGTAGTTCCGCTTACCTCTCCAG
Gammaproteobacteria	Forward: TCGTCAGCTCGTGTGTGA
	Reverse: CGTAAGGGCCATGATG
Universal 16S	Forward: AACTCAAAGAATTGACGG
	Reverse: CTCACRRCACGAGCTGAC

3.1.8 Geräte

Tabelle 8 Tabelle der verwendeten Geräte

Geräte	Herstellerangaben
Hettich™ ROTANTA, 46 RS	Hettich™, Tuttlingen, Deutschland
FACS Canto II	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
Hämozytometer SYSMEX-XP300	Sysmex GmbH, Norderstedt, Deutschland
BIOER Mixing Block MB-102	Bioer Technology, Hangzhou, China
iBright CL1000	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
NanoSight NS300	Malvern Panalytical, Malvern, United Kingdom
QuantStudio 3	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, New York, USA
Power Supply Consort E831	Consort bvba, Turnhout, Belgien
Varioskan Lux	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Stuart SRT9 Roller mixer	Cole-Parmer, Illinois, USA
Heraeus Fresco Refrigerated Centrifuge	Heraeus, Hanau, Deutschland
µDrop™ Plate	Thermo Fisher Scientific, Art.#: N12391
Inkubator	Heraeus, Hanau, Deutschland

3.1.9 Software

Tabelle 9 Tabelle der verwendeten Software

Software	Herstellerangaben
Design & Analysis Software 2.6.0	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Excel 2311	Microsoft Corporation, Washington, USA
FACS Diva 8	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
FlowJo V10	FlowJo, LLC, Ashland, Oregon, USA
GraphPad Prism 8.1.0 (2018)	GraphPad Software, San Diego, USA
NTA 3.4 Build 3.4.003	Malvern Panalytical Ltd, Malvern, United Kingdom

3.2 Methoden

3.2.1 *Isolation der BEVs aus Stuhl*

Die Stuhlproben wurden in einem mit 9 mL DNA/RNA-Shield gefüllten Stuhlröhrchen gesammelt. Vor Isolation der BEVs wurde die Probe gewogen. Die gesamte Flüssigkeit wurde in ein 50 ml-Falcon überführt, pro 0,1 g Stuhl wurden der Probe 1 mL PBS hinzugefügt und gut gevortext. Anschließend erfolgte die Filtration durch einen 100 µm Sieb und Zentrifugation bei 10.200 rpm für 10 min bei 4 °C. Der Überstand wurde erneut durch einen 0,22 µm Filter filtriert und anschließend bei 13.000 rpm für 30 min bei 4 °C zentrifugiert. 600 µL Überstand wurden mit 120 µL ExoQuick-TC Lösung gründlich vermischt und für mindestens 20 h bei 4 °C inkubiert.

Nach Inkubation erfolgte die erneute Zentrifugation bei 3.900 rpm für 30 min bei 4 °C. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet nochmals bei 3.900 rpm für 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Das entstandene trockene BEV-Pellet wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C eingefroren.

In dieser Arbeit wird von einer EV-Menge aus 60 mg Stuhl/ Pellet ausgegangen. Die Messungenauigkeit, welche durch die zur Probensammlung vorhandene DNA/RNA- Shield-Lösung im Bezug auf die Stuhlmenge entsteht, wurde für die weiteren Versuche vernachlässigt, da sie alle Proben betrifft.

3.2.2 *Charakterisierung der bakteriellen EVs*

3.2.2.1 *Nanopartikel- Tracking-Analyse (NTA)*

Die Nanopartikel-Tracking-Analyse mittels NanoSight dient der Größenbestimmung von kleinen Partikeln im Größenbereich von 10 nm bis 1 µm in flüssigen Medien. Die Größenbestimmung der Teilchen beruht auf dem Prinzip der Brownschen Molekularbewegung. Neben der Größenbestimmung ist eine Analyse des Streulichts der gemessenen Partikel möglich. Dadurch wird eine Bestimmung der Partikelkonzentration in heterogenen Partikelgemischen ermöglicht (Tatkiewicz et al., 2015).

Zur Charakterisierung der BEVs wurde mittels NanoSight NS300 die Größe und die Konzentration in der Probe ermittelt. Das BEV-Pellet entstanden aus 60 mg Stuhl wurde in 1 mL PBS gelöst und mit Hilfe einer Spritze durch eine Spritzenpumpe in die Kapillaren der Platte gegeben. Pro Probe wurden jeweils zwei Messungen von je 60 s Sekunden mit einem Kamera Level der Stufe 11, einer Pumpengeschwindigkeit von 100 und einer eingestellten Detektionsschwelle von Stufe 5 angefertigt.

Da ein BEV-Pellet zur Messung in 1 mL PBS gelöst wurde, kann die gemessene Partikelmenge pro mL mit der Partikelmenge / 60 mg Stuhl gleichgesetzt werden.

In den Formeln entspricht n der Anzahl der Partikel/ mL Lösung, welche im Experiment ermittelt wurde. 1000 wurde als Umrechnungsfaktor von mg zu g angewandt. Berechnet wird x als Anzahl der Partikel pro g Stuhl. Zur Berechnung wurden folgende Formeln angewandt:

$$n \frac{\text{Partikel}}{\text{mL}} \triangleq n \frac{\text{Partikel}}{60 \text{ mg Stuhl}}$$

$$\frac{n \frac{\text{Partikel}}{\text{mL}} * 1000}{60 \text{ mg}} = x \frac{\text{Partikel}}{\text{g Stuhl}}$$

3.2.2.2 Lyse der BEVs

Zur Proteingewinnung aus BEVs wurden die Proben zunächst lysiert. Dafür wurde das bei - 20 °C gelagerte BEV-Pellet aus dem Gefrierschrank auf Eis mit 100 µL Lysepuffer resuspendiert. Anschließend wurden die Proben in flüssigen Stickstoff gegeben und anschließend für 15 min auf Eis inkubiert. Daraufhin erfolgte die Zentrifugation für 10 min bei 13000 rpm bei 4 °C. Der Überstand wurde dann in ein neues 1,5 mL Eppendorf-Gefäß überführt. 15 µL der Probe wurde 1:1 in Lysepuffer verdünnt und für die Proteinbestimmung mittels BCA-Assay asserviert, der Rest der Probe diente der späteren Analyse mittels Western Blot. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei - 80 °C gelagert.

3.2.2.3 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA

Die Bestimmung des Proteingehalts erfolgte mittels BCA-Assay. Das Prinzip des BCA-Assays beruht auf der Reduktionsreaktion von Cu^{2+} zu Cu^+ durch die Bindung an in der Probe enthaltene Peptide. Zur Bestimmung des Proteingehaltes wird das einwertige Cu^+ durch eine Reaktion mit BCA mittels Photometrie detektiert (Walker, 1994).

Zunächst wurde eine Standardreihe mit Serumalbumin (BSA) auf einer 96 – Well-Platte in Triplets pipettiert und die zu untersuchenden lysierten Proben in vier unterschiedlichen Verdünnungen aufgetragen. Anschließend wurde das BCA-Reagenz hinzugegeben und 30 min bei 37 °C und 450 rpm im Mikrotitrierplatten-Schüttler inkubiert. Die Proteinkonzentration wurde bei einer Wellenlänge von 550 nm photometrisch bestimmt.

Zur Berechnung der Proteinkonzentration in mg pro 1g Stuhl wurde eine Stuhlmenge von EVs aus 60 mg Stuhl pro BEV-Pellet, welche nach Lyse in 100 μl aufgenommen wurde, angenommen. Gemessen wurde die Proteinkonzentration in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Der Umrechnungsfaktor von mg zu g beträgt 1000. Aus diesen Angaben lässt sich die Proteinmenge in mg / 1g Stuhl wie folgt bestimmen:

$$\text{Proteinmenge pro BEV – Pellet in mg} = \frac{\text{gemessene Proteinkonzentration in } \frac{\mu\text{g}}{\mu\text{l}} * 100 \mu\text{l}}{1000}$$

$$\text{Proteinkonzentration in } \frac{\text{mg}}{\text{g Stuhl}} = \frac{\frac{\text{gemessene Proteinkonzentration in } \frac{\mu\text{g}}{\mu\text{l}} * 100 \mu\text{l}}{1000}}{0,06 \text{ g}}$$

Zusammengefasst:

$$\text{Proteinkonzentration in } \frac{\text{mg}}{\text{g Stuhl}} = \frac{\text{gemessene Proteinkonzentration in } \frac{\mu\text{g}}{\mu\text{l}}}{0,6}$$

3.2.2.4 Western Blot auf β -Aktin

β -Aktin ist ein in den meisten eukaryotischen Zellen vorkommender Bestandteil des Zytoskeletts und wurde daher genutzt, um den eukaryotischen Ursprung der extrahierten Vesikel auszuschließen (Bunnell et al., 2011). Als Positivkontrolle wurden lysierte periphere mononukleäre Zellen aus dem Blut gesunder Erwachsener (PBMC) verwendet.

Für den Western Blot wurden drei BEV-Pellets wie in 2.2.2.2 beschrieben lysiert und deren Proteingehalt mittels BCA-Assay bestimmt. Es wurden jeweils 20 μ g Protein im Western Blot eingesetzt und die Proben im Verhältnis 3:1 mit 5 x Ladepuffer verdünnt und auf 95°C erhitzt. Anschließend wurden jeweils 15 μ L der Proben sowie ein Proteinmarker in Taschen eines 10%-igen Polyacrylamid-Gels gegeben. Daraufhin wurde die Elektrophorese-Kammer an Elektroden mit einer Spannung von 80 V im Sammelgel und 120 V im Trenngel angeschlossen.

Die Proteinbanden wurden mittels Wet-Blot in einer Blottingkammer vom Gel über 12 Stunden bei 40 V auf eine in Methanol aktivierte PVDF-Membran übertragen. Am nächsten Tag erfolgte das Waschen der PVDF-Membran für jeweils 5 min mit 0,1%, 0.25% und noch einmal mit 0,1% TBS-Tween-Puffer. Daraufhin erfolgte das Blocken der Membran mit 5% Milch in 0,1% TBS-Tween für eine Stunde bei Raumtemperatur und die Inkubation mit dem primären- β -Aktin-Antikörper über Nacht bei 4 °C auf einem Rollenmischer. Nach mehrmaligem Waschen mit 0,1% TBS-Tween wurde die Membran mit dem in 1%iger Milch gelösten Sekundärantikörper (HRP-linked Anti-rabbit IgG) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde die Membran für 5 min mit Chemilumineszenz-Lösung inkubiert. Die Analyse der Membran erfolgte mittels iBright Reader.

3.2.2.5 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Zur Charakterisierung der aus Stuhl isolierten BEVs wurde das Vorhandensein von Lipoteichonsäure (LTA) als Bestandteil gram-positiver Bakterien (Percy & Gründling, 2014) und Lipid A als Bestandteil gram-negativer Bakterien (Giordano et al., 2020) jeweils mithilfe eines Sandwich ELISA untersucht.

Der ELISA auf Lipid A wurde mit dem Pierce™ Chromogenic Endotoxin Quant Kit durchgeführt. Die 60-Well-Platte wurde während des kompletten Versuchs mit Hilfe einer Heizplatte auf 37°C ±1°C gehalten. Um eine messbare Vergleichsgröße zu haben, wurde zunächst die mitgelieferte Standardlösung mit Endotoxin in Duplets auf die 60-Well-Platte aufgetragen. Die verwendeten BEV-Pellets wurden in 200 µL PBS gelöst und ebenfalls in Duplets von jeweils 50 µL auf die Platte aufgetragen, daraus ergibt sich eine angenommene EV-Menge, welche aus 15 mg Stuhl gewonnen wurde pro Well. Anschließend erfolgte die Zugabe von 50 µL Amöben-Lysat Reagenz und die Inkubation für 9 min. Danach wurden 100 µL der chromogenen Substratlösung aus dem genutzten Elisa-Kit hinzugefügt und für 6 min inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 50 µL Stop-Lösung (25% Essigsäure). Daraufhin wurde die Messung der optischen Dichte mit einer Wellenlänge von 405 nm mittels Varioskan Lux bestimmt.

Aus der gemessenen optischen Dichte wurde mittels der durch die aufgetragene Standardreihe ermittelten Standard-Kurve die Endotoxin-Konzentration in EU/mL der jeweiligen Wells berechnet.

Es ergibt sich für die Berechnung der Endotoxin-Konzentration in EU /g Stuhl folgender Rechenweg:

$$\text{Endotoxin Konzentration a in } \frac{\text{EU}}{\text{mL}} * \frac{0,05 \text{ mL}}{15 \text{ mg Stuhl}} * 1000 = \text{Endotoxin Konzentration b in } \frac{\text{EU}}{\text{g Stuhl}}$$

Der ELISA auf Lipoteichonsäure erfolgte mit dem Human Lipoteichoic Acid Elisa Kits. Zunächst wurden 100 µL Standard in Duplets auf die 96-Well-Platte aufgetragen. Die verwendeten BEV-Pellets gewonnen aus 60 mg Stuhl wurden in 200 µL PBS gelöst und ebenfalls mit einem Volumen von 100 µL in Duplets auf die Platte gegeben. Anschließend wurde die Platte bei 37°C für 90 min inkubiert. Daraufhin erfolgte das 2-malige Waschen. Anschließend wurden 100 µL des Reagenz A auf die Platte gegeben und für 1 h Stunde bei 37 °C inkubiert. Danach erfolgte erneutes 3-maliges Waschen. Danach wurde 100 µL des Reagenz B hinzugegeben und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Platte 5-mal gewaschen. Daraufhin wurden 90 µL des TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin) - Substrates hinzugegeben. Die Platte wurde nun bei 37 °C

für 20 min im Dunklen inkubiert. Danach wurden 50 µL Stop-Lösung in die Wells gegeben. Im Anschluss erfolgte die Messung der Absorption bei 450 nm Wellenlänge mittels Varioskan Lux.

Die optische Dichte der Wells wurde ermittelt und mittels der durch die aufgetragene Standardreihe ermittelten Standard-Kurve in die LTA-Konzentration in pg/ mL umgerechnet.

Aus diesen Angaben ergibt sich für die Berechnung der LTA-Konzentration in pg/ g Stuhl folgender Rechenweg:

$$\text{LTA Konzentration a in } \frac{\text{pg}}{\text{mL}} * \frac{0,1 \text{ mL}}{30 \text{ mg Stuhl}} * 1000 = \text{LTA Konzentration b in } \frac{\text{pg}}{\text{g Stuhl}}$$

3.2.2.6 RT-qPCR der BEVs

Zum Nachweis bakterieller DNA in den isolierten BEVs aus Stuhl Neugeborener wurde eine RT-qPCR für die wichtigsten sechs bakteriellen Phyla der menschlichen Darmflora durchgeführt. Das Prinzip der quantitativen Echtzeit-PCR beruht auf der Vervielfältigung von Nukleinsäuren, wie bei der klassischen PCR. Zusätzlich wird durch Fluoreszenzmessung während der Zyklen die Menge der PCR-Produkte bestimmt (Smith & Osborn, 2009).

Die DNA- Isolation erfolgte mit Hilfe des ZymoBIOMICS DNA MicroPrep oder ZymoBIOMICS DNA MiniPrep Kits nach Herstellerangaben. Der Prozess unterscheidet sich zwischen den beiden Sets kaum, daher wird im Folgenden die Aufreinigung mittels ZymoBIOMICS DNA MicroPrep Kit erklärt und anschließend auf bestehende Unterschiede eingegangen. Um ausreichende DNA-Menge zu generieren, wurden bei Anwendung des MicroPrep Kits 6 BEV-Pellets einer Probe vereinigt. Diese wurden in 750 µL ZymoBIOMICS™ Lysis Solution gelöst und in ZR BashingBead™ Lysis Tubes (0.1 & 0.5 mm) gegeben. Anschließend erfolgte die Homogenisierung der Probe. Der nach Zentrifugation vorhandene Überstand wurde mehrfach filtriert und anschließend in die Zymo-Spin™ IICR Column übertragen. Diese wurde mittels Waschpuffer mehrfach gewaschen. Anschließend konnte die gewonnene DNA durch 60 °C warmes RNA/DNA-freies

Wasser aus der Säule gelöst werden. Nach erneuter Filtration war die Probe bereit für die weitere Verwendung.

Die Aufreinigung der Proben mittels ZymoBIOMICS DNA Miniprep Kit erfolgte analog zur Aufreinigung der DNA mit Hilfe des ZymoBIOMICS DNA Microprep Kit. Statt 6 BEV-Pellets wurden 9 BEV-Pellets vereinigt, um ausreichend DNA zu gewinnen. Statt 20 µL RNA/DNA-freien Wassers wurden 50 µL auf die Zymo-Spin™ IICR Column gegeben, somit war die extrahierte DNA in einem Volumen von 50 µL gelöst.

Die Menge der durch die Aufreinigung gewonnenen DNA konnte nun photometrisch mit Hilfe der µDrop™ Plate am Varioscan bestimmt werden.

Die Probenvorbereitung für die RT-qPCR erfolgte in einer 96-Well-Platte auf Eis. Pro Ansatz wurden zu 2 µl DNA jeweils 0,5 µL Forward Primer und Reverse Primer (3.1.7) 2 µL DNA-freies Wasser und 5 µL SYBR green reaction Mix gegeben.

Die Durchführung der RT-qPCR erfolgte mit Hilfe des QuantStudio 3, entsprechend der in Abbildung 1 dargestellten Schmelzkurve. Ausgewertet wurde mit Hilfe der Design & Analysis Software 2.6.0.

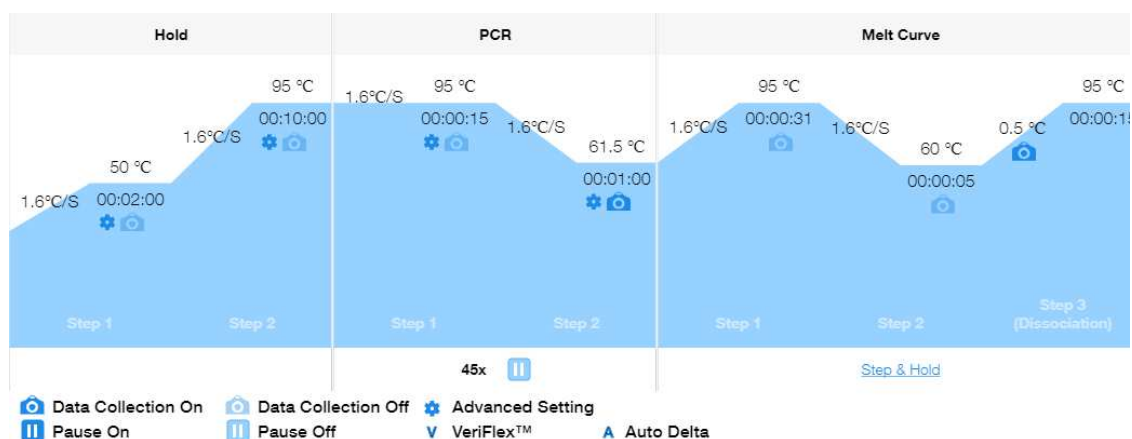


Abbildung 1 Schmelzkurve der RT-qPCR

Dargestellt sind die Anzahl der durchgeführten Zyklen (x-Achse) und die Temperatur (y-Achse), sowie die Dauer der Temperatureinwirkung (auf dem Graph).

3.2.3 Stimulation von PBMC mit BEVs und phänotypische Charakterisierung

Um den Effekt von BEVs auf Immunzellen zu untersuchen, erfolgte eine Kultur von PBMC gesunder Erwachsener ohne oder mit BEVs aus den verschiedenen Quellen für 24 Stunden und im Anschluss eine durchflusszytometrische Analyse.

3.2.3.1 Aufreinigung von PBMCs mittels Dichtegradientenzentrifugation

Um PBMCs aus venösem heparinisiertem Vollblut zu gewinnen, wurde das Blut im Verhältnis von 1:2 mit PBS auf 35 mL aufgefüllt. Anschließend erfolgte das Aufschichten auf Biocoll und die Zentrifugation für 25 min bei 400 rcf bei 20°C ohne Bremse. Der zwischen Plasma (oben aufliegend) und Biocoll entstehende Zellring, bestehend aus mononukleären Zellen, wurde entnommen, mit PBS aufgefüllt und erneut bei 500 rcf für 10 min bei 10 °C zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 10 mL PBS aufgenommen und die Zellzahl mittels Hämozytometer (SYSMEX-XP300) bestimmt. Die restlichen Zellen wurden erneut für 10 min bei 400 rcf bei 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in RPMI-Medium aufgenommen und auf eine Zellzahl von 1×10^7 Zellen / mL eingestellt.

3.2.3.2 Zellkultur von PBMCs mit BEVs

Zur Stimulation von PBMC mit BEVs wurden 1×10^6 PBMCs in einer 24-Well-Zellkulturplatte mit 10 µl eines in insgesamt 100 µl PBS gelösten BEV-Pellets im RPMI - Medium für 24 h bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert (entspricht BEVs aus ca. 6 mg Stuhl). Als Kontrolle dienten PBMC ohne Zugabe von BEVs.

3.2.3.3 Oberflächen-Antikörperfärbung für die Durchflusszytometrie

Nach der Inkubation mit BEVs wurden die PBMC in FACS-Tubes überführt und bei 310 rcf für 5 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen mit den jeweiligen Extrazellulär-Antikörpern (s. Abschnitt 3.1.6) im Dunklen für 10 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde die Probe mit FACS-Flow verdünnt und für 5 min bei 310 rcf und 4 °C zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstands wurden die Zellen mit Hilfe des Durchflusszytometers FACS Canto II analysiert.

3.2.3.4 Durchflusszytometrie der mit BEVs stimulierten PBMCs

Die Durchflusszytometrie ermöglicht mithilfe von durch Laser erzeugtem Streulicht und Antikörper-vermittelter Fluoreszenz die Bestimmung der Größe, Granularität und Detektion spezifischer Oberflächenmerkmale, sowie intrazellulärer Proteine von Zellen (McKinnon, 2018). Das genutzte Durchflusszytometer war der FACS Canto II. Wichtige Messwerte waren bei der Messung, die durch den Vorwärtslaser (FSC) und Seitwärtslaser (SSC) erzeugten Lichtsignale. Außerdem wurden die Farblaser für jeweilige Wellenlängen verwendet. Dabei maß violett 450/50; 502 bis 525 nm, blau 530/30; 585/42; > 670; 780/60 nm und rot 660/20; 780/60nm. Da sich die Farbspektren überschneiden, musste die Einstellung der Laser vor den Versuchen kompensiert werden. Da aufgrund eines Gerätedefektes die Laser des Durchflusszytometers während der Messungen neu eingestellt werden mussten, war ein direkter Vergleich der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) der vor Neueinstellung und nach Neueinstellung gemessenen Proben nicht möglich. Es erfolgte daher eine Normalisierung der Werte (siehe 3.2.4.1).

Das Gating von Monozyten erfolgte anhand des in Abbildung 2 gezeigten Schemas. Es wurde die Expression der Oberflächenmoleküle CD11b, CD16, CD18, CD86, TLR4, PD-L1 und PD-L2 auf Monozyten bestimmt.

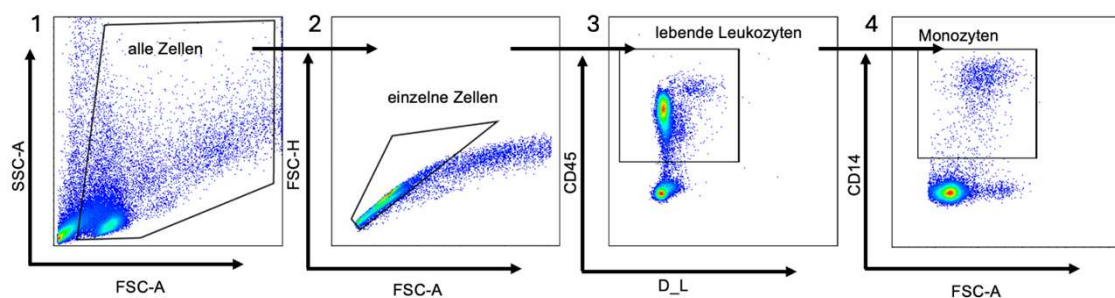


Abbildung 2 Gating-Strategie von Monozyten

Die Abbildung zeigt die Gating-Strategie von Monozyten-Oberflächenmarkern anhand repräsentativer durchflusszytometrischer Bilder. Zunächst wurden Zellen von Zellschrott separiert (1) und Dupletten ausgeschlossen (2), anschließend erfolgte die Eingrenzung auf lebende Leukozyten (CD45+, 3) und Monozyten (CD14+, 4).

Der Phänotyp der T-Zell-Subpopulationen wurden anhand des in Abbildung 3 gezeigten Schemas analysiert. Die Bestimmung der Expression der Oberflächenmarker CD44, CD62L und PD-1 erfolgte auf allen CD3+ T-Zellen (Gating s. Abbildung 3 bis Plot 4).

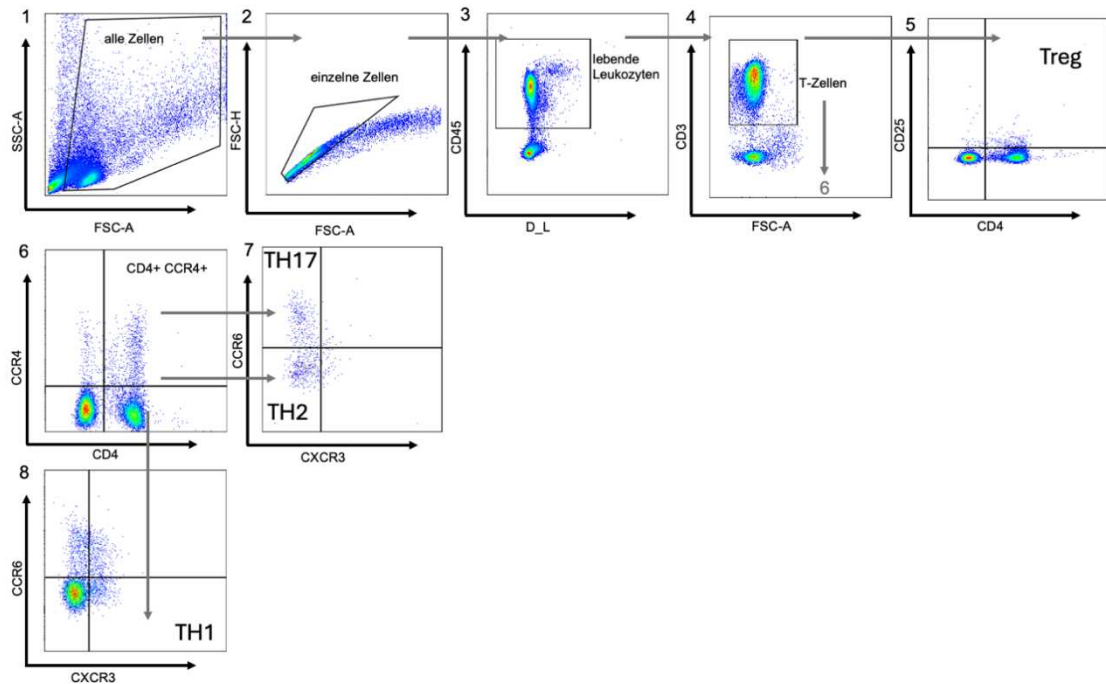


Abbildung 3 Gating-Strategie der untersuchten T-Zell-Subpopulationen

Die Abbildung zeigt die Gating-Strategie der T-Zell-Subpopulationen anhand repräsentativer durchflusszytometrischer Abbildungen. Zunächst wurden Zellen von Zellschrott separiert (1) und Dupletten ausgeschlossen (2), anschließend erfolgte die Eingrenzung auf lebende Leukozyten (CD45+, 3) und T-Zellen (CD3+, 4). Die Bestimmung von Treg (CD4+, CD25+, 5) TH17-Zellen (CD4+, CCR4+, CCR6+, CXCR3+, 7 oben links), TH2-Zellen (CD4+, CCR4-, CCR6- CXCR3-, 7 unten links) und TH1-Zellen (CD4+ CCR4- CCR6- CXCR3+, 8) erfolgte anhand der entsprechenden Oberflächenmarker.

3.2.4 Statistische Auswertung

Die Daten wurden mittels GraphPad Prism 8.1.0 verarbeitet. Die Daten wurden mittels Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung geprüft. Lag eine Normalverteilung vor, wurde ein t-Test für ungepaarte Stichproben angewandt, lag keine Normalverteilung vor, wurde ein Mann-Whitney-Test angewandt. Beim Vergleich mehrerer normalverteilter Gruppen, wurde eine one-way ANOVA, durchgeführt. Lag keine Normalverteilung über mehrere Gruppen vor, wurde der Kruskal-Wallis-Test angewandt. Das Signifikanzniveau Alpha wurde auf 0,05 festgelegt. In der Auswertung wurde das Signifikanzniveau p wie folgt angegeben: *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001.

Für den statistischen Vergleich wurden die in Tabelle 10 aufgeführten Gruppen verwendet. Da die Charakterisierungsversuche generell die Eigenschaften der hergestellten EVs darstellen sollen, wurden einige repräsentative Proben etwa gleichaltriger Kinder der Gruppen FG und NG2, im Folgenden NG/FG, gemessen und als Vergleichsgruppe genutzt.

Tabelle 10 Bezeichnung der Probanden-Gruppen

Gruppe an Probanden	Abkürzung
BEVs Erwachsener	E
BEVs von Neugeborenen und Frühgeborenen mit einem Lebensalter von sieben bis 20 Lebenstagen	NG/FG
BEVs Neugeborener zum Zeitpunkt 1 (Alter: ein bis vier Lebenstage)	NG1
BEVs Neugeborener zum Zeitpunkt 2 (Alter: sieben bis zehn Lebenstage)	NG2
BEVs Neugeborener zum Zeitpunkt 3 (Alter: fünfte Lebenswoche)	NG3
Frühgeborene ohne Antibiotikatherapie (Alter: zehn bis 20 Lebenstage)	FG
Frühgeborene mit Antibiotikatherapie (Alter: zehn bis 20 Lebenstage)	FG AB

3.2.4.1 Normalisierung der Werte bei unterschiedlichen Messwerten

Die Normalisierung der Messwerte vor und nach Laser-Neueinstellung erfolgte über die Formel $Z = \frac{x-\mu}{\delta}$, wobei μ der Mittelwert ($\mu = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$) und δ die Standardabweichung ($\delta = \sqrt{\frac{\sum (x-\bar{x})^2}{(n-1)}}$) der jeweiligen Gruppen ist.

4 Ergebnisse

4.1 Charakterisierung der BEVs

Um die Größe und Konzentration der BEVs zu bestimmen, wurde eine Nanopartikel-Tracking-Analyse (NTA) repräsentativer Proben mittels NanoSight NS300 durchgeführt. BEVs aus Stuhlproben Erwachsener hatten eine Größe von $105,5 \pm 43,02$ nm, die BEVs aus Stuhlproben Neugeborener zwischen sieben und 20 Tagen wiesen eine Größe von $112,9 \pm 31,49$ nm auf. Der Vergleich der beiden Gruppe zeigte keinen signifikanten Unterschied (Abbildung 4 C, $p = 0,7723$, $n = 4 - 7$, t-Test). Die mittlere Konzentration der BEVs in den Proben lag bei Erwachsenen bei $8,94 \times 10^9 \pm 8,03 \times 10^9$ Partikel/ g Stuhl und bei Neugeborenen bei $8,07 \times 10^9 \pm 2,27 \times 10^9$ Partikel/ g Stuhl (Abbildung 4 D, $p = 0,8413$, $n = 4 - 7$, t-Test).

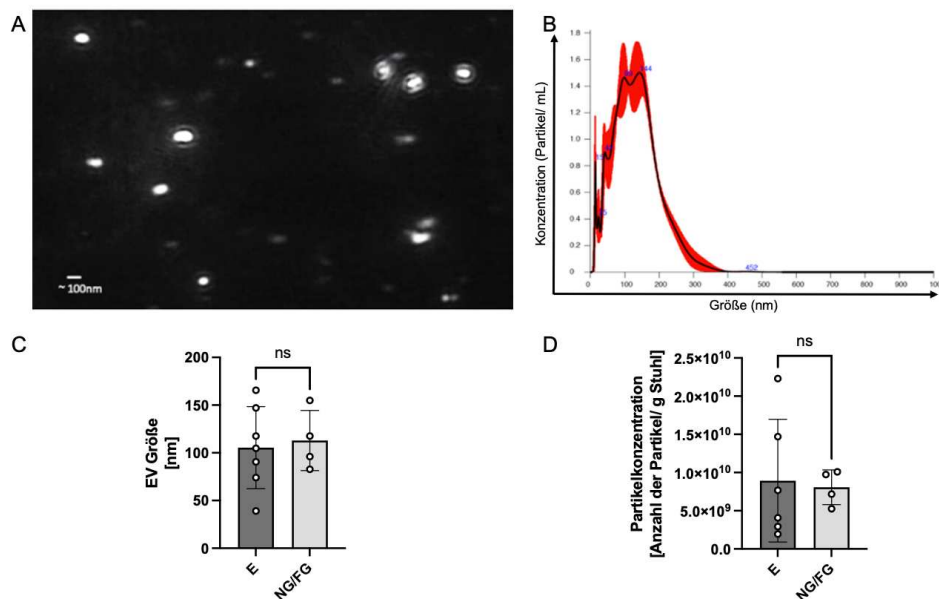


Abbildung 4 Bestimmung der Größe und der Konzentration von BEVs aus Stuhl mittels NTA

A repräsentatives Standbild der NTA-Messung. B beispielhaftes Histogramm der Größenverteilung der BEVs. C+D Säulendiagramme zeigen die Größe in nm (C) und die Konzentration in Partikel / g Stuhl (D) von BEVs aus dem Stuhl Erwachsener (E, dunkelgrau) und Neugeborener und Frühgeborener Probanden mit einem Lebensalter von sieben bis 20 Tagen

(NG/FG, hellgrau) dar. In den Säulendiagrammen sind Mittelwert, Einzelwerte (Punkte) und Standardabweichungen (schwarze Balken) dargestellt. Test: t-Test, n= 4 - 7, ns = nicht signifikant.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration der BEVs wurde ein BCA-Assay durchgeführt. Der Proteingehalt lag bei BEVs aus dem Stuhl Erwachsener (E) bei $2,03 \pm 0,37$ mg / g Stuhl und bei BEVs aus dem Stuhl Neugeborener und Frühgeborener im Alter von sieben bis 20 Tagen (NG/FG) bei $1,96 \pm 0,51$ mg / g Stuhl. Es bestanden keine signifikanten Unterschiede in den Proteinkonzentrationen zwischen den beiden Gruppen (Abbildung 5 A, $p = 0,8416$, $n = 3 - 6$, t-Test).

Zum Ausschluss humanen Ursprungs der BEVs wurde mittels Western Blot das Vorhandensein des ubiquitär vorhandenen Bestandteiles des eukaryotischen Zytoskeletts β -Aktin analysiert. In keiner der BEV-Proben ($n = 5$) konnte β -Aktin detektiert werden (Abbildung 5 B).

Zum Nachweis des bakteriellen Ursprungs der BEVs wurde das Vorhandensein der bakteriellen Proteine Endotoxin und Lipoteichonsäure (LTA) in den BEV-Proben mittels ELISA untersucht. Die Endotoxin-Konzentration betrug in BEV-Proben Erwachsener $0,33 \pm 0,15$ Endotoxin Einheiten (EU) / g Stuhl und in BEV-Proben Neugeborener und Frühgeborener im Alter von sieben bis 20 Lebenstagen (NG/FG) $0,41 \pm 0,13$ EU / g Stuhl (Abbildung 5 C, $p = 0,2372$, $n = 3 - 6$, t-Test). Auch die LTA-Konzentration unterschied sich nicht zwischen BEVs aus Stuhlproben Erwachsener und BEVs aus Stuhlproben Neugeborener und Frühgeborener zwischen dem siebten und 20. Lebenstag (NG/FG) (Abbildung 5 D, E $39,20 \pm 15,64$ EU / g Stuhl, NG/FG $27,86 \pm 0,09$ EU / g Stuhl, $p = 0,2597$, $n = 3 - 7$, t-Test).

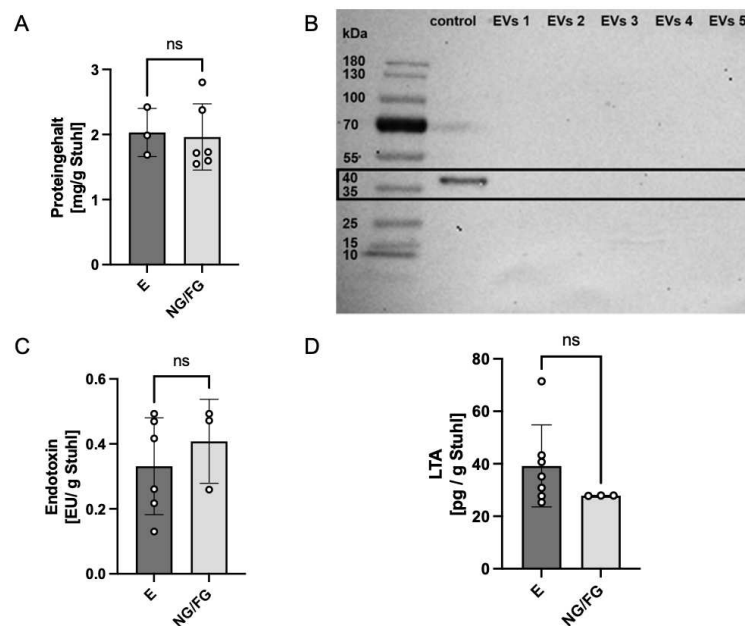


Abbildung 5 Phänotypische Charakterisierung der BEVs aus Stuhl

A Säulendiagramm der mittels BCA bestimmten Proteinkonzentration von BEVs aus dem Stuhl Erwachsener (E, dunkelgrau) und von BEVs aus dem Stuhl Neugeborener und Frühgeborener zwischen dem siebten und 20. Lebenstag (NG/FG, hellgrau) in mg Protein/ g Stuhl. B repräsentative Aufnahme eines Western Blots auf β -Aktin für eine Kontrollprobe (humane mononukleäre Zellen aus dem Blut, Kontrolle links), zwei Proben von BEVs Erwachsener (EVs 1, EVs 2) und drei Proben von Früh- (EVs 3) bzw. Neugeborenen (EVs 4+5). C +D stellen in Säulendiagrammen zeigen den Vergleich der mittels ELISA gemessenen Endotoxin-Konzentration (C) in EU/ g Stuhl und der LTA-Konzentration (D) in pg / g Stuhl zwischen EV-Proben Erwachsener (E) und Neugeborener bzw. Frühgeborener (NG/FG) dar. In den abgebildeten Säulendiagrammen sind Mittelwert, Einzelwerte (Punkte) und Standardabweichungen (schwarze Balken) dargestellt. Test: t-Test, n= 3 - 7, ns = nicht signifikant

4.1.1 Analyse der mikrobiellen Zusammensetzung von BEVs Neugeborener und Erwachsener

Um die Herkunft der BEVs genauer zu analysieren, wurde eine RT-qPCR auf sechs der wichtigsten im humanen intestinalen Mikrobiom vorkommenden Phyla durchgeführt. Es zeigte sich eine Tendenz zu einem geringeren Vorkommen von Bacteroidetes-RNA in BEV-Proben Neugeborener in den ersten vier Lebenstagen im Vergleich zu BEV-Proben Erwachsener, jedoch ohne statistische Signifikanz (Abbildung 6).

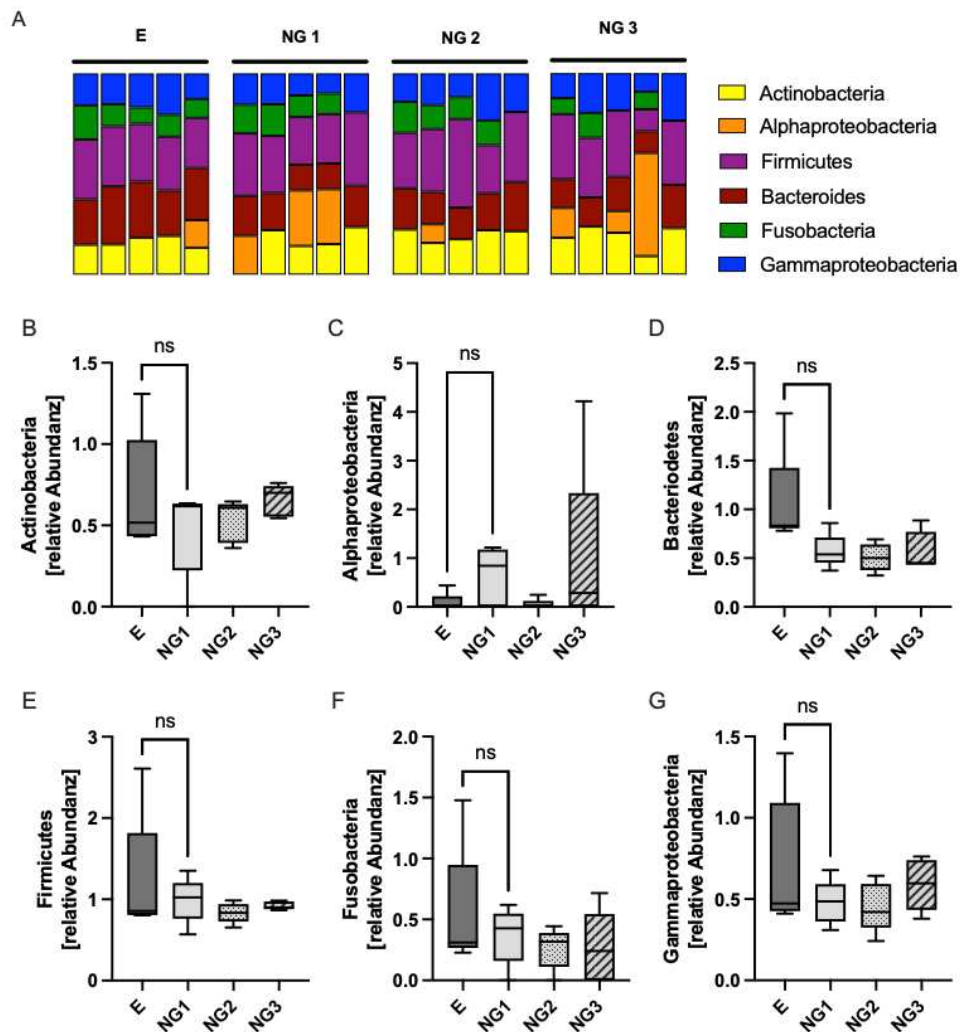


Abbildung 6 RT-qPCR sechs häufiger Phyla des intestinalen Mikrobioms in BEVs Erwachsener und BEVs Neugeborener

A gestapeltes Säulendiagrammen der Anteile der untersuchten Phyla am Gesamtmikrobiom. Die Diagramme stellen die Verteilung der Phyla in BEVs Erwachsener (E), Neugeborener zum Zeitpunkt 1 (NG1), Neugeborener zum Zeitpunkt 2 (NG2) und Neugeborener zum Zeitpunkt 3 (NG3) dar. B - G Box-Plot-Diagramm der relativen Häufigkeit des Vorkommens der einzelnen Phyla bezogen auf die Gesamt- 16s- rRNA in BEVs Erwachsener (E, dunkelgrau), Neugeborener zum Zeitpunkt 1 (NG1, hellgrau), Neugeborener zum Zeitpunkt 2 (NG2, hellgrau dünn gestreift) und Neugeborener zum Zeitpunkt 3 (NG3, hellgrau gestreift). Aufgetragen ist der Interquartilsband (schwarzer Balken, vertikal) und der Median (schwarzer Balken, horizontal). Tests: Mann-Whitney (Actinobacteria, Alphaproteobacteria, Bacteroides, Firmicutes, Fusobacteria) und t-Test (Gammaproteobacteria), n = 5, ns = nicht signifikant

4.1.2 Auswirkungen einer Stimulation mit BEVs auf den Phänotyp von Monozyten

Um den Effekt einer Stimulation mit BEVs Erwachsener und reifer Neugeborener auf den Phänotyp von Monozyten zu untersuchen, wurden PBMCs gesunder erwachsener Spender für 24 h mit BEVs kultiviert. In Vorversuchen unserer Arbeitsgruppe konnte mit Hilfe von mit Carboxyfluorescein-Ester (CFSE) gefärbten BEVs gezeigt werden, dass BEVs von Monozyten aufgenommen werden.

Anschließend wurde die Expression der Oberflächenmoleküle CD11b, CD16, CD18, CD80, CD86, TLR4, PD-L1 und PD-L2 auf Monozyten nach 24-stündiger Stimulation mit BEVs durchflusszytometrisch bestimmt. Abbildung 7 zeigt Punkte-Säulendiagramme der gesamten Messungen

Eine Stimulation mit BEVs führte auf Monozyten zu einer verstärkten Expression des Integrins CD11b im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (us). Dieser Effekt war für NG2 und NG3 ausgeprägter als für BEVs Erwachsener und NG1 (Abbildung 7 A, us MFI 3520 ± 992 versus: E MFI 4979 ± 1927 , $p=0,3301$; NG1 MFI 5006 ± 2132 , $p=0,3318$; NG2 MFI 6610 ± 2196 , $p=0,0080$; NG3 MFI 7047 ± 2348 , $p=0,0022$; $n=8-11$, one-way ANOVA).

Für den Fc-Rezeptor CD16 zeigte sich eine Suppression der Expression durch alle untersuchten BEVs (Abbildung 7 B, us MFI 8043 ± 6407 versus: E MFI 677 ± 655 , $p=0,045$; NG1 MFI 149 ± 207 , $p<0,0001$; NG2 MFI 687 ± 737 , $p=0,0122$; NG3 MFI 314 ± 276 , $p=0,0012$; $n=8-11$, Kruskal-Wallis Test).

Auch die Expression des Integrins CD18 wurde durch die Zugabe von BEVs Erwachsener und Neugeborener aller Altersgruppen signifikant supprimiert (Abbildung 7 C, us MFI 12937 ± 1587 versus: E MFI 7814 ± 3009 , $p=0,0001$; NG1 MFI 7523 ± 1558 , $p<0,0001$; NG2 MFI 10051 ± 2985 , $p=0,0465$; NG3 MFI 8749 ± 2133 , $p=0,0022$; $n=8-11$, one-way ANOVA).

Die Expression des co-stimulatorischen Oberflächenproteins CD80 wurde durch BEV-Stimulation mit adulten BEVs, NG2 und NG3 erhöht (Abbildung 7 D, us MFI 247 ± 79 versus: E MFI 393 ± 114 , $p=0,0312$; NG1 MFI 338 ± 172 , $p>0,5544$;

NG2 MFI 391 ± 68 , $p = 0,0304$; NG3 MFI 451 ± 224 , $p = 0,0279$; $n = 8 - 11$, Kruskal-Wallis). Die Expression von CD86 hingegen wurde durch Stimulation mit BEVs von NG1, NG2 und NG3 supprimiert (Abbildung 7 E, us MFI 1259 ± 416 versus: E MFI 841 ± 194 , $p = 0,2723$; NG1 MFI 748 ± 323 , $p = 0,0022$; NG2 MFI 876 ± 407 , $p = 0,0271$; NG3 MFI 713 ± 151 , $p = 0,0046$; $n = 8 - 11$, Kruskal-Wallis).

Die Expression des Pattern-Recognition-Receptor TLR4 wurde durch NG1 und NG3 signifikant supprimiert, während adulte BEVs keinen Effekt hatten (Abbildung 7 F, us MFI 887 ± 177 versus: E MFI 796 ± 201 , $p > 0,9999$; NG1 MFI 517 ± 99 , $p = 0,0015$; NG2 MFI 617 ± 203 , $p = 0,0567$; NG3 MFI 594 ± 149 , $p = 0,0274$; $n = 8 - 11$, Kruskal-Wallis).

Die Expression der immun-inhibitorisch wirkenden Oberflächen-Moleküle PD-L1 und PD-L2 wurde nur durch BEVs Erwachsener, nicht aber durch BEVs Neugeborener stimuliert, wobei der Effekt nur für PD-L2 signifikant war (PD-L1: Abbildung 7 G, us MFI 506 ± 154 versus: E MFI 1934 ± 1900 , $p = 0,4598$; NG1 MFI 495 ± 297 , $p > 0,9999$; NG2 MFI 1057 ± 834 , $p = 0,7320$; NG3 MFI 1302 ± 1101 , $p = 0,3731$; $n = 8 - 11$, Kruskal-Wallis; PD-L2: Abbildung 7 F, us MFI 454 ± 87 versus: E MFI 646 ± 172 , $p = 0,0097$; NG1 MFI 356 ± 63 , $p = 0,3190$; NG2 MFI 466 ± 153 , $p = 0,9986$; NG3 MFI 513 ± 131 , $p = 0,7252$; $n = 8 - 11$, one-way ANOVA).

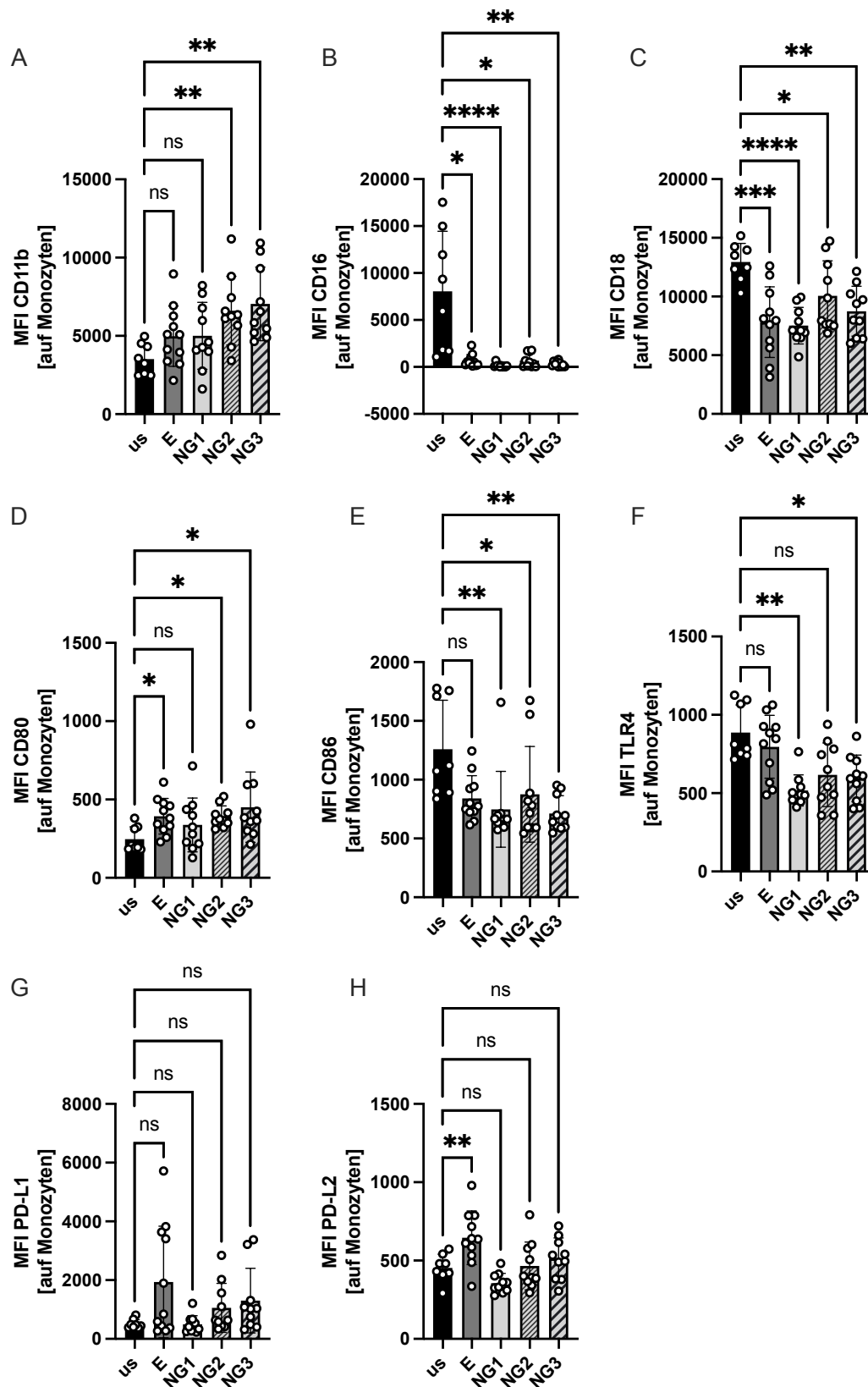


Abbildung 7 Die Stimulation von PBMCs mit BEVs Neugeborener führte zu einer Veränderung der Expression von Oberflächenmarkern auf Monozyten

PBMCs gesunder Erwachsener wurden aus heparinisiertem Vollblut mittels Dichtegradientenzentrifugation gewonnen und für 24 h mit BEVs stimuliert. Die Expression der Oberflächenmarker CD11b, CD16, CD18, CD80, CD86, TLR4, PD-L1 und PD-L2 auf Monozyten wurde durchflusszytometrisch bestimmt. A - H Säulendiagramme der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) von CD11b (A), CD16 (B), CD18 (C), CD80 (D), CD86 (E), TLR4 (F), PD-L1 (G) und PD-L2 (H) auf Monozyten (CD45+, CD14+). Der Versuch wurde entweder ohne die Zugabe von BEVs durchgeführt (unstimuliert, us, schwarz) oder mit BEVs Erwachsener (E, dunkelgrau), BEVs Neugeborener zum Zeitpunkt 1 (NG1, hellgrau), Neugeborener zum Zeitpunkt 2 (NG2, hellgrau dünn gestreift) und Neugeborener zum Zeitpunkt 3 (NG3, hellgrau gestreift). Dargestellt sind Mittelwert, Einzelwerte (Punkte) und Standardabweichungen (schwarze Balken). Tests: one-way ANOVA (CD11b, CD18, PD-L2) und Kruskal-Wallis (CD16, CD80, CD86, TLR4, PD-L1), $n = 8 - 11$, $p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$, $****p < 0,0001$, s = nicht signifikant.

4.1.3 Auswirkungen einer Stimulation mit BEVs auf T-Zell-Subpopulationen

Der Phänotyp von T-Zellen wurde analog zur Untersuchung von Monozyten nach 24h Stimulation einer PBMC-Zellkultur mit BEVs durchflusszytometrisch analysiert. Auch hierzu wurde in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe gezeigt, dass BEVs von T-Zellen aufgenommen werden können.

Der Anteil der CD4-positiven T-Helfer-Zellen stieg nach Stimulation mit BEVs aller Gruppen signifikant im Vergleich zu nicht stimulierten Proben (Abbildung 8 A und B, us 22,24 % $\pm$ 13,33 % versus: E 53,99 % $\pm$ 13,90 %, $p = 0,013$; NG1 64,01 % $\pm$ 6,4 % $p < 0,0001$; NG2 58,92 % $\pm$ 13,51 %, $p = 0,0003$; NG3 61,02 % $\pm$ 5,04 %, $p < 0,0001$; $n = 10 - 20$, Kruskal-Wallis), ein Unterscheid zwischen den mit BEVs stimulierten Gruppen war nicht zu beobachten. Umgekehrt sank der Anteil CD8-positiver zytotoxischer T-Zellen nach Stimulation mit BEVs (Abbildung 8 A und C, us 47,21 % $\pm$ 14,42 % versus: E 33,94 % $\pm$ 13,35 %, $p = 0,0112$; NG1 28,20 % $\pm$ 3,93 %, $p = 0,0003$; NG2 29,68 % $\pm$ 6,74 %, $p = 0,0018$; NG3 29,8 % $\pm$ 4,13 %, $p = 0,0061$; $n = 10 - 19$, Kruskal-Wallis), auch hier zeigten sich keine relevanten Unterschiede zwischen den mit BEVs stimulierten Gruppen.

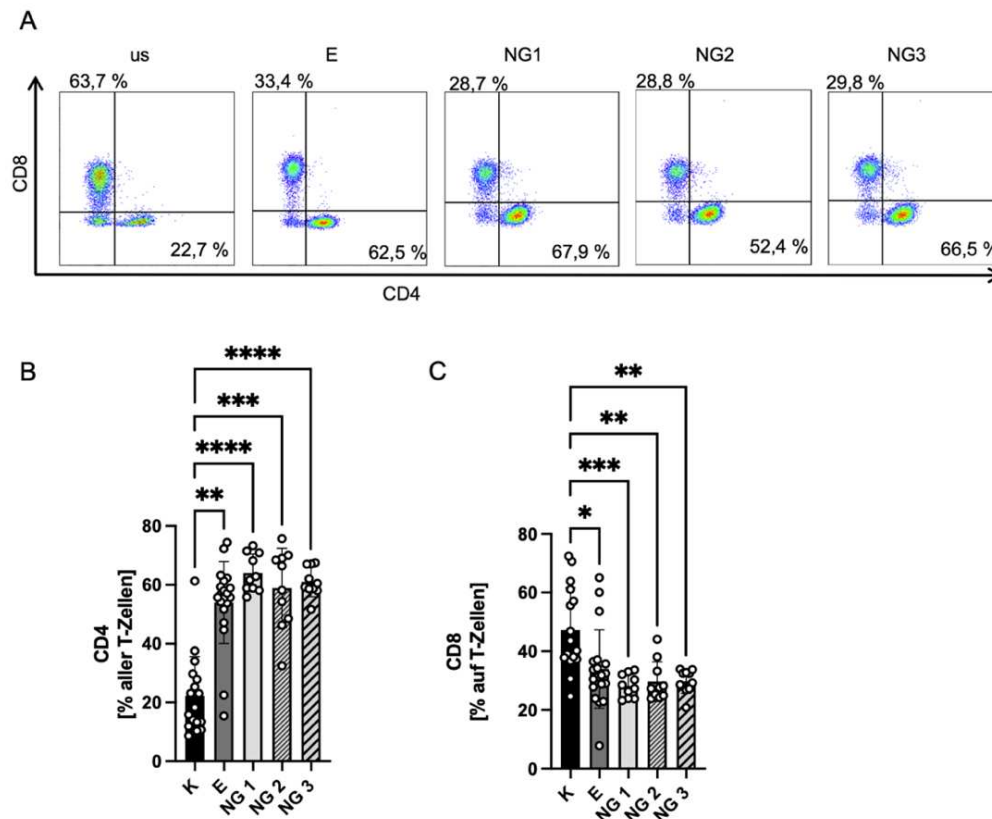


Abbildung 8 Durch BEVs Neugeborener stimulierte T-Zellen exprimieren mehr CD4 und weniger CD8 als nicht-stimulierte T-Zellen

PBMCs gesunder erwachsener Spender wurden aus heparinisiertem Vollblut mittels Dichtegradientenzentrifugation gewonnen und für 24 h mit BEVs stimuliert. Anschließend wurde die Expression der charakteristischen T-Zell-Oberflächenmoleküle CD4 und CD8 durchflusszytometrisch bestimmt. A durchflusszytometrischen Beispielabbildungen zeigen die Expression von CD4 und CD8 auf CD3-positiven T-Zellen bei der unstimulierten Kontrolle (us), nach Stimulation mit-Erwachsenen BEVs (E) und nach Stimulation mit BEVs Neugeborener zum Zeitpunkt 1 (NG1), Zeitpunkt 2 (NG2) und Zeitpunkt 3 (NG3). B + C Säulendiagramme des prozentualen Anteils von T-Helferzellen (B) und cytotoxischen T-Zellen (C) an allen T-Zellen in der unstimulierten Kontrolle (us, schwarz) und nach Stimulation mit BEVs Erwachsener (E, dunkelgrau) und Neugeborener zum Zeitpunkt 1 (NG1, hellgrau), zum Zeitpunkt 2 (NG2, hellgrau dünn gestreift) und zum Zeitpunkt 3 (NG3, hellgrau gestreift) dar. Gezeigt werden Mittelwerte, Einzelwerte (Kreise mit schwarzem Rand) und Standardabweichungen (schwarze Balken). Test: Kruskal-Wallis, n = 10 -19, *p< 0,05, **p< 0,01, ***p< 0,001, ****p< 0,0001.

Des Weiteren wurde der Anteil der verschiedenen TH-Zell-Subpopulationen an den TH-Zellen untersucht. Die Gating-Strategie für die verschiedenen Subpopulationen ist in Abbildung 3 (s. Methodenabschnitt) dargestellt.

Durch Stimulation mit BEVs kam es zu einer Reduktion des Anteils von TH1-Zellen an den CD4-positiven TH-Zellen. Lediglich bei Stimulation mit BEVs zum Zeitpunkt 1 war dieser Effekt nicht statistisch signifikant (Abbildung 9 A, us 6,38 % $\pm$ 2,25 % versus: E 4,54 % $\pm$ 1,85 %, $p = 0,0197$; NG1 4,74 % $\pm$ 1,75 %, $p = 0,1037$; NG2 4,32 % $\pm$ 1,67 %, $p = 0,0271$; NG3 3,84 % $\pm$ 1,11 %, $p = 0,0045$; $n = 10 - 18$, one-way ANOVA).

Der Anteil von TH2- und TH17- Zellen an CD4-positiven TH-Zellen wurde durch die Zugabe von BEVs zur Zellkultur nicht signifikant verändert (Abbildung 9 B und C).

Nach Zugabe von BEVs nahm der Anteil von Treg an den CD4-positiven TH-Zellen zu, unabhängig davon, ob es sich um BEVs Erwachsener oder Neugeborener handelte (Abbildung 9 D, us 1,2 % $\pm$ 1,07 % versus: E 5,23 % $\pm$ 1,47 %, $p = 0,0066$; NG1 5,70 % $\pm$ 3,8 %, $p = 0,0005$; NG2, 5,73 % $\pm$ 5,43 %, $p = 0,0417$; NG3 7,87 % $\pm$ 6,25 %; $p < 0,0001$; $n = 10 - 13$, Kruskal-Wallis).

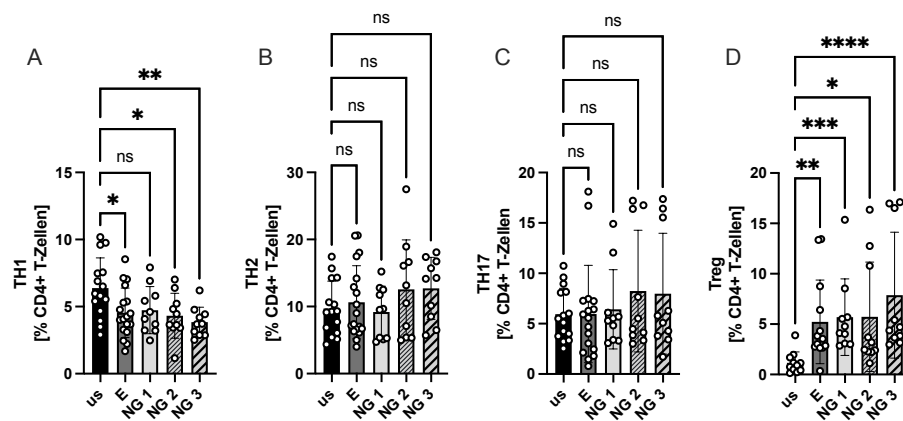


Abbildung 9 Der Anteil von TH1 und Treg an T-Helferzellen wird in Anwesenheit von BEVs Erwachsener und Neugeborener verändert, TH2 und TH17 zeigen keine signifikanten Veränderungen durch BEV-Stimulation

PBMCs gesunder erwachsener Spender wurden aus heparinisiertem Vollblut mittels Dichtegradientenzentrifugation gewonnen und für 24 h mit BEVs stimuliert. Anschließend wurde der Anteil der von TH1-Zellen (CD4+ CCR4- CCR6- CXCR3+ T-Zellen), TH2-Zellen (CD4+ CCR4+ CCR6- CXCR3- T-Zellen), TH17-Zellen (CD4+ CCR4+ CCR6+ CXCR3- T-Zellen) und Treg (CD4+ CD25+ T-Zellen) durchflusszytometrisch bestimmt. A - D Säulendiagrammen des prozentualen Anteils der TH1-(A), TH2- (B), TH17-(C) und Treg-(D) an allen T-Helferzellen. Verglichen wird die unstimulierte Kontrolle (us, schwarz), mit der Stimulation durch BEVs Erwachsener (E, dunkelgrau), Neugeborener zum Zeitpunkt 1 (NG1, hellgrau), zum Zeitpunkt 2 (NG2, hellgrau dünn gestreift) und Neugeborener zum Zeitpunkt 3 (NG3, hellgrau gestreift). Tests: one-way ANOVA (TH1) und Kruskal-Wallis (TH2, TH17, Treg), n = 10 – 19, *p < 0,05, **p < 0,01, *** p = < 0.001, ****p < 0,0001, ns= nicht signifikant.

4.1.4 Auswirkungen einer Stimulation mit BEVs auf T-Zell-Aktivierungsmarker

Neben T-Helferzell-Subpopulationen wurde die Expression der Aktivierungsmarker CD44, CD62L und PD-1 auf T-Zellen ohne und mit Stimulation durch BEVs untersucht. Es zeigte sich eine leichte, aber nicht signifikante Suppression der Expression von CD44 und PD-1 durch Stimulation mit BEVs, während die Expression von CD62L nicht beeinflusst wurde. Zwischen den unterschiedlichen BEV - Gruppen wurden keine Unterschiede beobachtet (Abbildung 10 A bis C).

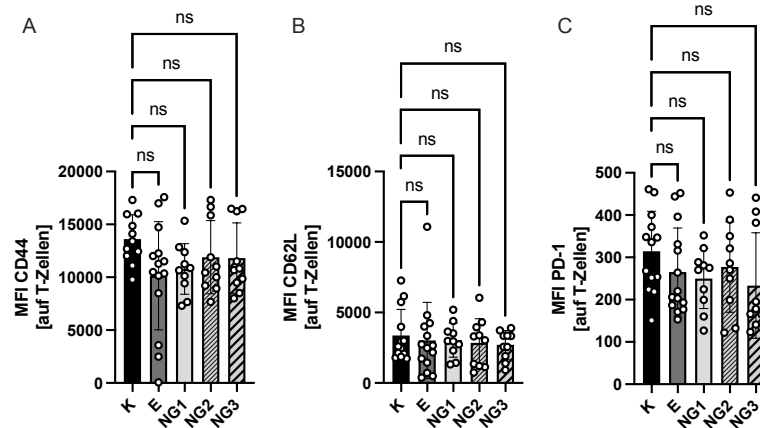


Abbildung 10 Keine Veränderung der Expression der Aktivierungsmarker CD44, CD62L und PD-L1 auf T-Zellen nach Stimulation mit BEVs

PBMCs gesunder erwachsener Spender wurden aus heparinisiertem Vollblut mittels Dichtegradientenzentrifugation gewonnen und für 24 h mit BEVs stimuliert. Anschließend wurde die Expression von CD44, CD62L und PD-L1 auf T-Zellen anhand der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) durchflusszytometrisch bestimmt. A - C Säulendiagramme zeigen den MFI der Oberflächenmoleküle CD44 (A), CD62L (B) und PD-L1 (C) auf T-Zellen unstimulierter PBMCs (us, schwarz) und PBMCs nach Stimulation mit BEVs Erwachsener (E, dunkelgrau), BEVs Neugeborener zum Zeitpunkt 1 (NG1, hellgrau), zum Zeitpunkt 2 (NG2, hellgrau dünn gestreift) und Neugeborener zum Zeitpunkt 3 (NG3, hellgrau gestreift) dar. Gezeigt werden Mittelwerte, Einzelwerte (Punkte) und Standardabweichungen (schwarze Balken). Tests: Kruskal-Wallis, $n = 10 - 14$, ns = nicht signifikant

4.2 Untersuchung der Effekte von BEVs aus dem Stuhl Frühgeborener

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob BEVs aus dem Stuhl Frühgeborener anders auf Immunzellen wirken als BEVs aus dem Stuhl reifgeborener Kinder. Hierzu wurden zunächst BEVs aus Stuhlproben, welche im Alter von zehn bis 20 Lebenstagen von Frühgeborenen ohne Antibiotikaexposition gewonnen wurden, mit den BEVs aus Proben reifer Neugeborener zum Zeitpunkt 2 verglichen.

4.2.1 Mikrobielle Zusammensetzung von BEVs Frühgeborener im Vergleich zu der Zusammensetzung BEVs Neugeborener

Um Unterschiede der Phyla-Zusammensetzung von BEVs aus Stuhl Frühgeborener (FG) und Neugeborener (NG2) zu untersuchen, wurde eine RT-qPCR wie im Vorherigen beschrieben durchgeführt. Es zeigten sich keine

signifikanten Unterschiede in der Zusammensetzung der BEVs Frühgeborener und reifer Neugeborener auf Phylum- Ebene (Abbildung 11).

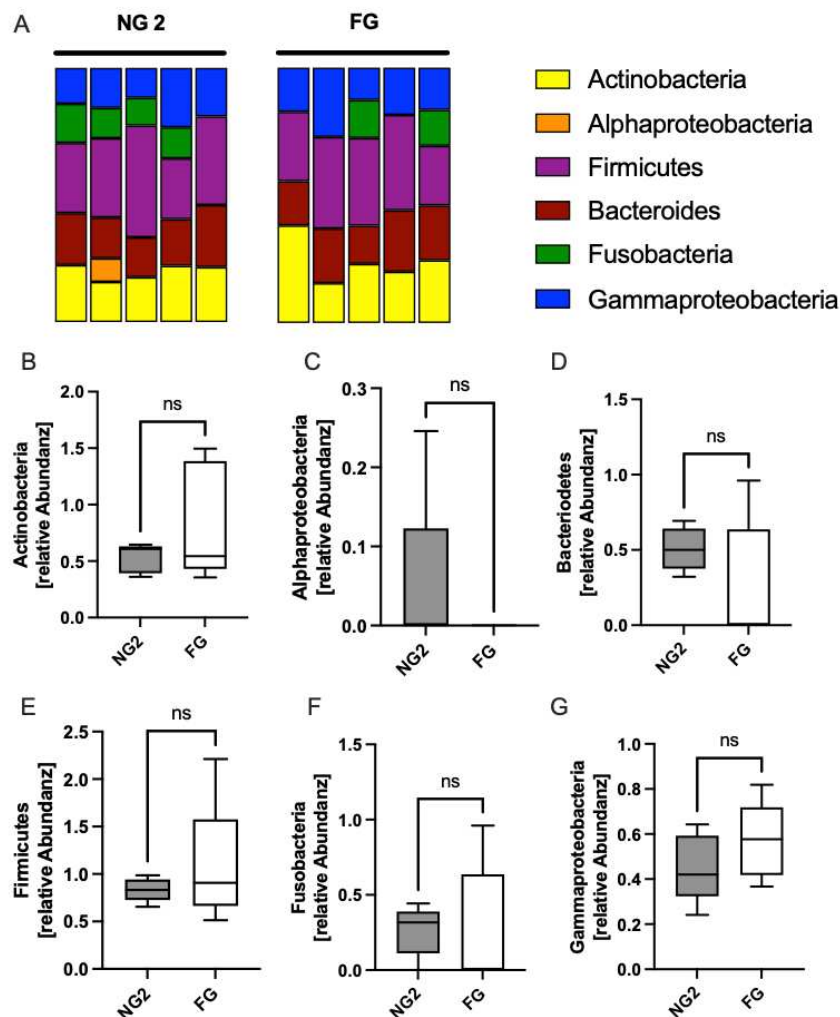


Abbildung 11 RT- qPCR sechs häufiger im intestinalen Mikrobiom vorkommender Phyla aus BEVs Neugeborener zum Zeitpunkt 2 und BEVs Frühgeborener

A gestapelte Säulendiagramme der Anteile der untersuchten Phyla in BEVs Neugeborener zum Zeitpunkt 2 (NG2) und Frühgeborener (FG) am Gesamtmikrobiom. B -G Box-Plot-Diagramme der relativen Häufigkeit des Vorkommens der einzelnen Phyla bezogen auf die Gesamt-16s-rRNA in BEVs Neugeborener zum Zeitpunkt 2 (NG2, dunkelgrau) und Frühgeborener (FG, weiß). Aufgetragen ist der Interquartilsabstand (schwarzer Balken, vertikal) und der Median (schwarzer Balken, horizontal). Tests: t-Test (Actinobacteria, Alphaproteobacteria Firmicutes, Gammaproteobacteria) und Mann-Whitney (Bacteroides, Fusobacteria), n = 5, ns = nicht signifikant.

4.2.2 Auswirkungen einer Stimulation mit BEVs Frühgeborener im Vergleich zu BEVs Neugeborener auf die Monozyten-Aktivierung

Um zu untersuchen, ob BEVs Frühgeborener andere Effekte auf Monozyten zeigen als BEVs reifer Neugeborener, wurden BEVs aus Stuhlproben von Frühgeborenen und reifen Neugeborenen im Alter von sieben bis 20 Lebenstagen vergleichend zu PBMCs gegeben und für 24 h inkubiert. Die gemessenen MFIs der durchflusszytometrischen Analyse wurden wie in 3.2.4.1 beschrieben normalisiert, da zwischen den Versuchen Veränderungen der Einstellung des Durchflusszytometers vorgenommen wurden, welche einen direkten Vergleich der MFIs verhinderten.

Die Expression des Integrin CD11b wurde im Vergleich zu einer Stimulation mit BEVs reifer Neugeborener durch die Zugabe von BEVs Frühgeborener induziert (Abbildung 12 A, NG2 MFI normalisiert $0,19 \pm 0,82$ versus: FG MFI normalisiert $0,96 \pm 0,75$, $p = 0,2087$, t-Test), während die des Integrin CD18 supprimiert wurde (Abbildung 12 C, NG2 MFI normalisiert $0,30 \pm 0,99$ versus: FG MFI normalisiert $1,94 \pm 0,69$, $p = 0,0642$, t-Test). Die Expression der weiteren gemessenen Oberflächenmarker CD16, CD80, CD86, TLR4, PD-L1 und PD-L2 zeigte nach Stimulation mit BEVs von Frühgeborenen und reifen Neugeborenen keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 12 B und D bis H).

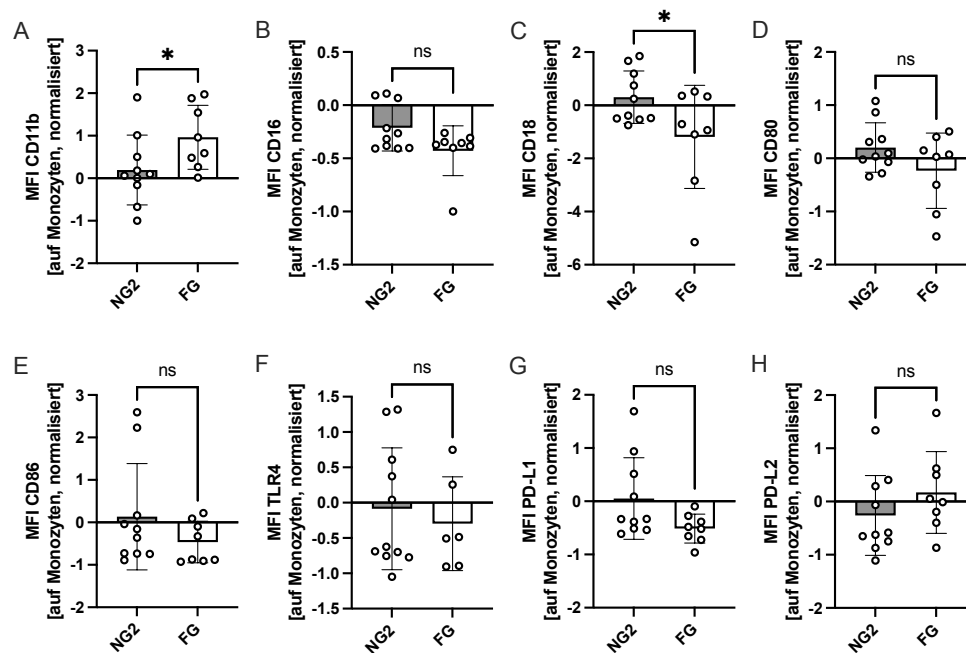


Abbildung 12 Die Stimulation von PBMCs mit BEVs Neugeborener und Frühgeborener führte zu einer Veränderung der Expression von CD11b und CD18 auf Monozyten

PBMCs gesunder erwachsener Spender wurden aus heparinisiertem Vollblut mittels Dichtegradientenzentrifugation gewonnen und für 24 h mit BEVs stimuliert. Anschließend wurde die Expression der Oberflächenmarker CD11b (A), CD16 (B), CD18 (C), CD80 (D), CD86 (E), TLR4 (F), PD-L1 (G) und PD-L2 (H) bestimmt. A - H Säulendiagramme der normalisierten mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) der entsprechenden Marker nach Stimulation mit BEVs Neugeborener zum Zeitpunkt 2 (NG2, grau) und BEVs Frühgeborener (FG, weiß). Abgebildet sind Mittelwerte, Einzelwerte (Punkte) und Standardabweichungen (schwarze Balken). Tests: t-Test (CD11b, CD18, CD80, CD86, PD-L2), Mann-Whitney (CD16, TLR4, PD-L1), $n = 8 - 10$, * $p < 0,05$, ns = nicht signifikant.

4.2.3 Auswirkungen einer Stimulation mit BEVs Frühgeborener im Vergleich zur Stimulation mit BEVs Neugeborener auf T-Helferzell-Populationen und T-Zell-Aktivierungsmarker

Analog zur Untersuchung in 4.1.3 wurde die Wirkung von BEVs Neugeborener (Gestationsalter > 38.SSW) zum Zeitpunkt 2 (NG2) und BEVs aus Stuhlproben Frühgeborener (Gestationsalter < 32. SSW) mit einem Lebensalter von 10 bis 20 Lebenstagen (FG) auf T-Zellen untersucht. Nach Stimulation zeigten sich keine Unterschiede im prozentualen Anteil von CD4- und CD8 - T-Zellen an allen T-Zellen (Abbildung 13 A und B). Ebenso gab es keine signifikanten

Veränderungen bei den T-Helferzell-Populationen TH1, TH2, TH17 und Treg (Abbildung 13 C bis F).

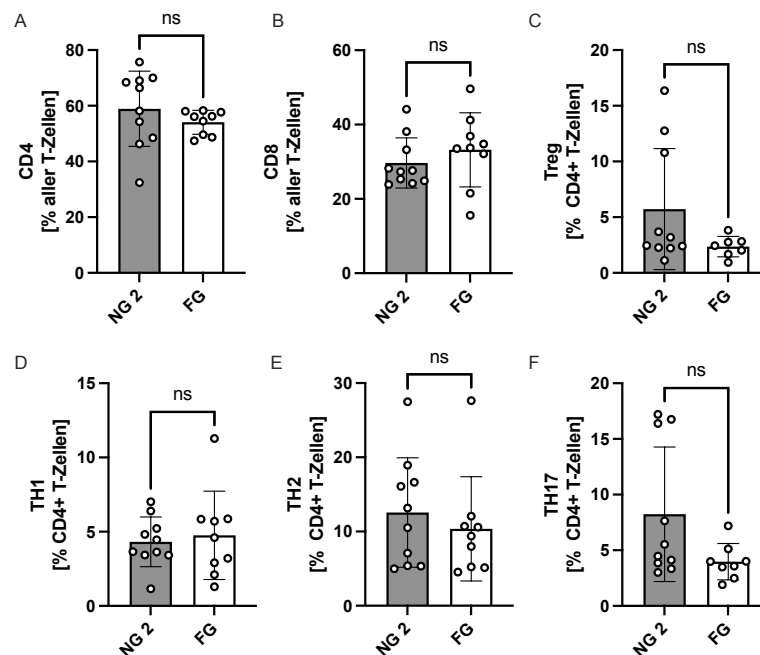


Abbildung 13 Keine Unterschiede im Vorkommen von T-Zell-Subpopulationen nach Stimulation mit BEVs Neugeborener und BEVs Frühgeborener

PBMCs gesunder erwachsener Spender wurden aus heparinisiertem Vollblut mittels Dichtegradientenzentrifugation gewonnen und für 24 h mit BEVs stimuliert. Anschließend wurde der Anteil der Expression der charakteristischen T-Zell-Oberflächenmoleküle CD4, CD8 sowie von TH1-Zellen (CD4+ CCR4- CCR6- CXCR3+ T-Zellen), TH2-Zellen (CD4+ CCR4+ CCR6- CXCR3- T-Zellen), TH17-Zellen (CD4+ CCR4+ CCR6+ CXCR3- T-Zellen) und Treg (CD4+ CD25+ T-Zellen) durchflusszytometrisch bestimmt. A+B Säulendiagramme zeigen den prozentualen Anteil von CD4- (A) und CD8-T-Zellen (B) an allen T-Zellen, C-F Säulendiagramme zeigen den prozentualen Anteil der T-Helferzell-Populationen Treg (C), TH1(D), TH2 (E) und TH17 (F) an allen CD4+ T-Zellen. Die Messung erfolgte nach Stimulation mit BEVs Neugeborener zum Zeitpunkt 2 (NG2, hellgrau dünn gestreift) und Frühgeborener (FG, weiß). Dargestellt sind Mittelwerte, Einzelwerte (Kreise mit schwarzem Rand) und Standardabweichungen (schwarze Balken). Tests: t-Test (CD4, TH1), Mann-Whitney (CD8, Treg, TH2, TH17), n = 8 – 15, ns = nicht signifikant

Neben den T-Zell-Subpopulationen wurde wie oben beschrieben auch die Expression der Aktivierungsmarker CD44, CD62L und PD-1 vergleichend nach Stimulation mit BEVs aus dem Stuhl Neugeborener und aus dem Stuhl

Frühgeborener untersucht. Auch hier mussten für die Auswertung die Messwerte normalisiert werden (s. 3.2.4.1).

Die Expression des Zelladhäsionsmoleküls CD44 und des immun-inhibitorisch wirkenden Oberflächenmoleküls PD-1 zeigte nach Stimulation mit BEVs Frühgeborener eine signifikant geringere Expression als nach Stimulation mit BEVs Neugeborener (Abbildung 14 A, NG 2 MFI normalisiert $0,33 \pm 0,84$ versus: FG MFI normalisiert $-0,70 \pm 0,51$, $p = 0,0027$, Mann-Whitney, $n = 8 - 10$ und Abbildung 14 C, NG 2 MFI normalisiert $0,27 \pm 1,02$ versus: FG MFI normalisiert $-0,65 \pm 0,73$, $p = 0,0194$, t-Test, $n = 8 - 10$). Das Zelladhäsionsmolekül CD62L wurde durch die Zugabe von BEVs Frühgeborener im Vergleich zu Neugeborenen nicht signifikant verändert (Abbildung 14 B).

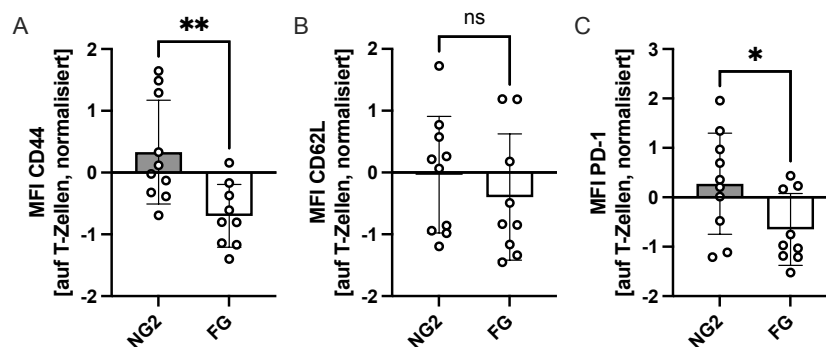


Abbildung 14 Die Stimulation mit BEVs mit BEVs Neugeborener und BEVs Frühgeborener führte zu einer Veränderung der Expression der Aktivierungsmarker CD44 und PD-L1 auf T-Zellen

PBMCs gesunder erwachsener Spender wurden aus heparinisiertem Vollblut mittels Dichtegradientenzentrifugation gewonnen und für 24 h mit BEVs stimuliert. Anschließend wurde die Expression von CD44, CD62L und PD-1 auf T-Zellen anhand der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) durchflusszytometrisch bestimmt und normalisiert. A - C Säulendiagramme des normalisierten MFI von CD44, CD62L und PD-1 auf T-Zellen, welche durch BEVs Neugeborener zum Zeitpunkt 2 (NG2, hellgrau dünn gestreift) und BEVs Frühgeborener (FG, weiß) stimuliert wurden. Gezeigt werden Mittelwerte, Einzelwerte (Kreise mit schwarzem Rand) und Standardabweichungen (schwarze Balken). Test: t-Test (CD44, CD62L und PD-1), $n = 8 - 10$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, ns = nicht signifikant.

4.3 Untersuchung des Effekts einer frühen Antibiotikaexposition auf die Zusammensetzung und die immunologischen Effekte von BEVs aus dem Stuhl Frühgeborener

Zuletzt sollte untersucht werden, ob eine frühe Antibiotikaexposition einen Einfluss auf die Zusammensetzung und die immunologischen Effekte von BEVs aus dem Stuhl Frühgeborener hat. Hierzu wurden BEVs aus Stuhlproben Frühgeborener mit oder ohne Antibiotikaexposition in der ersten Lebenswoche im Alter von zehn bis 20 Lebenstagen aufgereinigt und wie in den vorherigen Abschnitten beschrieben untersucht.

4.3.1 Die mikrobielle Zusammensetzung von BEVs Frühgeborener ohne Antibiotikaexposition im Vergleich zu BEVs Frühgeborener mit Antibiotikaexposition

In RT-qPCR-Untersuchungen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der BEV-Zusammensetzung auf Phylum- Ebene zwischen Frühgeborenen mit und ohne Antibiotika-Exposition in der ersten Lebenswoche (Abbildung 15).

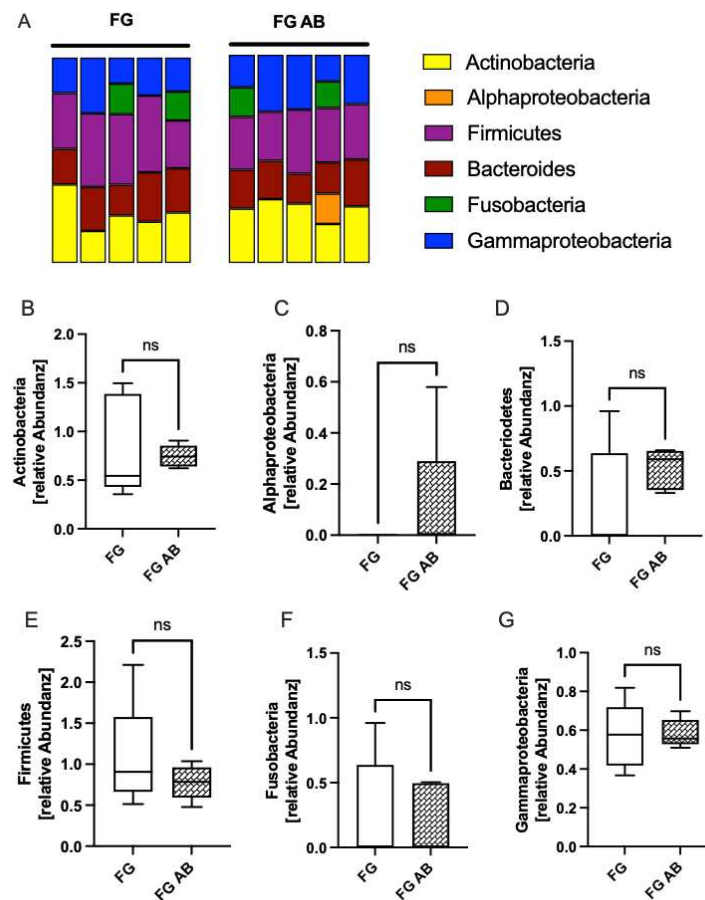


Abbildung 15 RT- qPCR sechs häufiger im intestinalen Mikrobiom vorkommender Phyla aus BEVs Frühgeborener ohne und mit Antibiotikaexposition in der ersten Lebenswoche

A gestapelte Säulendiagramme der Anteile der untersuchten Phyla in BEVs Frühgeborener ohne Antibiotikaexposition (FG) und BEVs Frühgeborener mit Antibiotikaexposition in der ersten Lebenswoche (FG AB) am Gesamtmikrobiom. B - G Box-Plot-Diagramme der relativen Häufigkeit des Vorkommens der einzelnen Phyla bezogen auf die Gesamt-16s-rRNA in BEVs Frühgeborener ohne Antibiotikatherapie (FG, weiß) und BEVs Frühgeborener mit Antibiotikatherapie (FG AB, quer gemustert). Aufgetragen ist der Interquartilsabstand (schwarzer Balken, vertikal) und der Median (schwarzer Balken, horizontal). Tests: t-Test (Actinobacteria, Firmicutes, Gammaproteobacteria) und Mann-Whitney (Alphaproteobacteria, Bacteroides, Fusobacteria), n = 5, ns = nicht signifikant.

4.3.2 Auswirkungen einer Stimulation mit BEVs Frühgeborener mit Antibiotikaexposition im Vergleich zur Stimulation mit BEVs Frühgeborener ohne Antibiotikaexposition auf die Monozyten-Aktivierung

Um die Auswirkung einer frühen Antibiotikatherapie auf den Effekt von BEVs Frühgeborener auf Monozyten zu untersuchen, wurden BEVs aus dem Stuhl von Frühgeborenen ohne und mit Antibiotikaexposition in der ersten Lebenswoche isoliert und wie in den vorangegangenen Abschnitten zu PBMCs gegeben und für 24h inkubiert. Die gemessenen MFIs der durchflusszytometrischen Analyse wurden wie in 3.2.4.1 beschrieben normalisiert. Es zeigten sich keine Unterschiede in der Expression der Oberflächenmarker CD11b, CD16, CD18, CD80, CD86, TLR4, PD-L1 und PD-L2 auf Monozyten nach Stimulation mit BEVs Frühgeborener mit oder ohne Antibiotikatherapie (Abbildung 16).

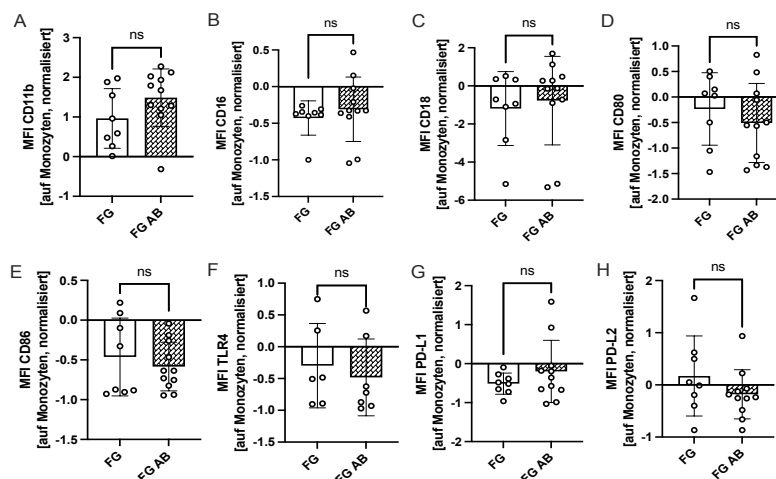


Abbildung 16 Keine Unterschiede in der Expression der untersuchten Oberflächenmarker auf Monozyten nach Stimulation mit BEVs aus dem Stuhl Frühgeborener ohne und mit früher Antibiotikaexposition

A-H Säulendiagramme der Expression der normalisierten mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) der gemessenen immun-aktivatorischen Oberflächenmoleküle CD11b (A), CD16 (B), CD18 (C), CD86 (D) und TLR4 (E) und der immun-inhibitorisch wirkenden Oberflächenmoleküle PD-L1 (F) und PD-L2 (G) auf Monozyten nach Stimulation mit BEVs aus dem Stuhl Frühgeborener ohne Antibiotikatherapie (FG, weiß) und BEVs aus dem Stuhl Frühgeborener mit Antibiotikatherapie (FG AB, weiß quer gemustert) Dargestellt sind Mittelwert, Einzelwerte (Punkte) und Standardabweichungen (schwarze Balken). Tests: t-Test (CD11b, CD18, CD80, CD86, PD-L2) und Mann-Whitney (TLR4, PD-L1), n = 8 – 11, ns= nicht signifikant.

4.3.3 Auswirkung von BEVs Frühgeborener ohne Antibiotikaexposition im Vergleich zu BEVs Frühgeborener ohne Antibiotikaexposition auf T-Helferzell-Populationen und T-Zell-Aktivierungsmarker

Auch bei der Untersuchung des Phänotyps (Abbildung 17) und der Aktivierung (Abbildung 18) von T-Zellen zeigten sich keine relevanten Unterschiede nach Stimulation mit BEVs aus Stuhlproben Frühgeborener ohne Antibiotikatherapie und BEVs Frühgeborener mit Antibiotikatherapie.

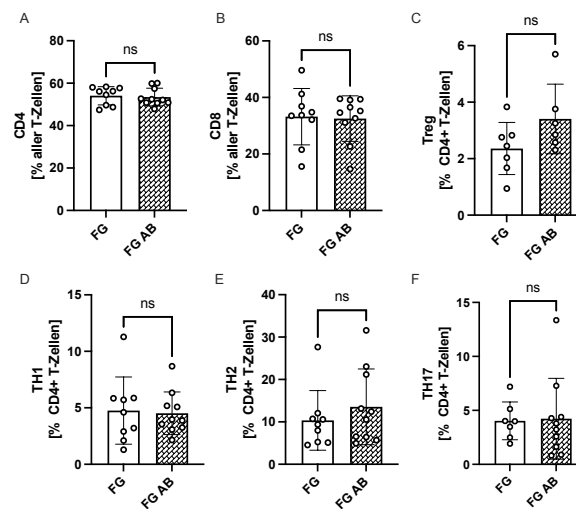


Abbildung 17 Keine Unterschiede im Vorkommen von T-Zell-Subpopulationen nach Stimulation mit BEVs aus dem Stuhl Frühgeborener ohne und mit früher Antibiotikaexposition

PBMCs gesunder erwachsener Spender wurden aus heparinisiertem Vollblut mittels Dichtegradientenzentrifugation gewonnen und für 24 h mit BEVs stimuliert. Anschließend wurde der Anteil der Expression der charakteristischen T-Zell-Oberflächenmoleküle CD4, CD8 sowie von TH1-Zellen (CD4+ CCR4- CCR6- CXCR3+ T-Zellen), TH2-Zellen (CD4+ CCR4+ CCR6- CXCR3- T-Zellen), TH17-Zellen (CD4+ CCR4+ CCR6+ CXCR3- T-Zellen) und Treg (CD4+ CD25+ T-Zellen) durchflusszytometrisch bestimmt. A + B Säulendiagramme zeigen den prozentualen Anteil von CD4- (A) und CD8-T-Zellen (B) an allen T-Zellen, C - F stellen in Säulendiagrammen den prozentualen Anteil der T-Helferzell-Populationen Treg (C), TH1(D), TH2 (E) und TH17 (F) dar. Die Messung erfolgte nach Stimulation mit BEVs Frühgeborener ohne Antibiotikaexposition (FG, weiß) und BEVs Frühgeborener mit Antibiotikaexposition in der ersten Lebenswoche (FG AB, quer gemustert). Dargestellt sind Mittelwerte, Einzelwerte (Kreise mit schwarzem Rand) und Standardabweichungen (schwarze Balken). Tests: t-Test (CD4, Treg, TH1), Mann-Whitney (CD8, Treg, TH2, TH17), n = 8 – 11, ns = nicht signifikant.

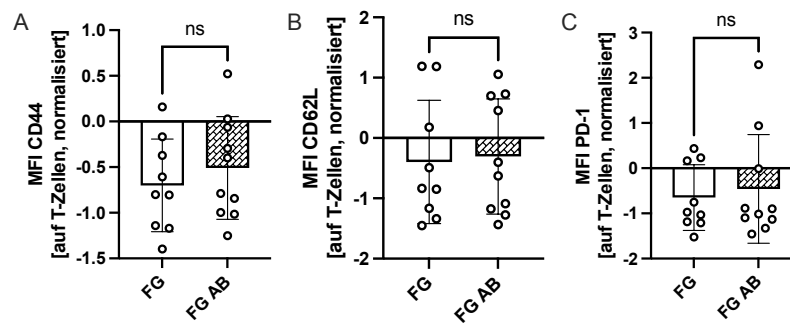


Abbildung 18 Keine Unterschiede der Expression der Aktivierungsmarker CD44, CD62L und PD-L1 auf T-Zellen nach Stimulation mit BEVs Frühgeborener mit und ohne Antibiotikaexposition

PBMCs gesunder erwachsener Spender wurden aus heparinisiertem Vollblut mittels Dichtegradientenzentrifugation gewonnen und für 24 h mit BEVs stimuliert. Anschließend wurde die Expression von CD44, CD62L und PD-L1 auf T-Zellen anhand der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) durchflusszytometrisch bestimmt. A - C Säulendiagramme zeigen den normalisierten MFI der Oberflächenmoleküle CD44 (A), CD62L (B) und PD-L1 (C) auf PBMCs, welche durch BEVs Frühgeborener ohne Antibiotikatherapie (FG, weiß) und BEVs Frühgeborener mit Antibiotikatherapie (FG AB, quer gemustert) stimuliert wurden. Gezeigt werden Mittelwerte, Einzelwerte (Kreise mit schwarzem Rand) und Standardabweichungen (schwarze Balken). Test: t-Test (CD44, CD62L) und Mann-Whitney (PD-1), $n = 9 - 10$, ns = nicht signifikant.

5 Diskussion

Zahlreiche Assoziationsstudien konnten in der Vergangenheit einen Zusammenhang zwischen der Etablierung des frühen intestinalen Mikrobioms und der Entwicklung des Immunsystems z.B. im Rahmen von Allergien und Asthma aufzeigen (Boulund et al., 2025; Cukrowska et al., 2020; De Filippis et al., 2021; Dzidic et al., 2020; Hufnagl et al., 2020; Rey-Mariño & Francino, 2022). Die zugrundeliegenden Mechanismen wurden bisher aber wenig beforscht. In der hier vorgelegten Arbeit wurde untersucht, ob BEVs aus dem Stuhl von Früh- und Neugeborenen Immunzellen beeinflussen und ob es Unterschiede in der immunologischen Wirkung im Vergleich zu BEVs aus dem Stuhl Erwachsener gibt. Die Ergebnisse sollen im folgenden Abschnitt diskutiert und in den Kontext der aktuellen Literatur gesetzt werden.

5.1 Charakterisierung der BEVs

Hinsichtlich der Charakterisierung der BEVs orientierten wir uns an den Empfehlungen der Internationalen Gesellschaft für extrazelluläre Vesikel (Théry et al., 2018). Die durchgeführte NTA zeigte eine durchschnittliche Partikel-Größe der aus dem Stuhl Erwachsener isolierten BEVs von $105,5 \pm 43,02$ nm und der aus dem Stuhl Neu- und Frühgeborener isolierten BEVs von $112,9 \pm 31,49$ nm. Die Größen der Partikel unterschieden sich zwischen den einzelnen Gruppen nicht signifikant und lagen im für BEVs erwarteten Bereich von 20 bis 300 nm (Díaz-Garrido et al., 2021). Auch die gemessenen Konzentrationen lagen in einem ähnlichen Bereich wie die Konzentrationen von BEVs aus Stuhl in anderen Arbeiten (Kameli et al., 2021).

Elektronenmikroskopische Aufnahme wurden im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit nicht erstellt, da dies bereits während der Etablierungsphase des Projektes erfolgte. Hierzu wird auf die Dissertationsschrift von Frau Samantha Kewitz aus unserer Arbeitsgruppe verwiesen.

Mittels ELISA wurde das Vorhandensein von Endotoxin und LTA als Oberflächenproteine von gram-negativen (Endotoxin) und gram-positiven (LTA) Bakterien nachgewiesen und somit ein bakterieller Ursprung der EVs bestätigt (Percy & Gründling, 2014; Su & Ding, 2015). Das eukaryotische Strukturprotein

β -Aktin konnte dagegen nicht nachgewiesen werden. Die Quantität des Vorkommens von Endotoxin und LTA unterschied sich nicht zwischen BEVs aus dem Stuhl Erwachsener und Neugeborener bzw. Frühgeborener. Auch auf Phylum-Ebene zeigten sich in der RT-qPCR keine signifikanten Unterschiede zwischen BEVs von Neugeborenen und Erwachsenen. Das ist erstaunlich, da bekannt ist, dass sich das Mikrobiom von Neugeborenen deutlich von dem Erwachsener unterscheidet.

Hierzu muss jedoch angemerkt werden, dass aus der Zusammensetzung der BEVs nicht direkt auf die Zusammensetzung des intestinalen Mikrobioms geschlossen werden kann, wie bereits in anderen Studien gezeigt werden konnte (Li et al., 2023). Außerdem ist als eine Limitation an dieser Stelle zu nennen, dass nur eine RT-qPCR auf Phylum-Ebene durchgeführt wurde, welche nur grobe Unterschiede in der mikrobiellen Komposition der BEVs abgebildet. Für eine genauere Charakterisierung der BEVs wäre hier eine 16s rRNA Sequenzierung sinnvoll (Park et al., 2021).

5.2 Die Wirkung von BEVs Erwachsener und reifer Neugeborener auf den Phänotyp von Immunzellen

Bakterien des intestinalen Mikrobioms passieren im gesunden Zustand die Darmwand nahezu nicht (Schoultz & Keita Å, 2020). Membrangängige BEVs des intestinalen Mikrobioms können dagegen die intestinale Barriere überwinden und so ein möglicher Mechanismus zur Kommunikation zwischen Darmmikrobiom und Immunsystem sein (Bittel et al., 2021). In vorangegangenen Arbeiten anderer Arbeitsgruppen konnte für einzelne Kommensale des intestinalen Mikrobioms bereits gezeigt werden, dass diese Immunzellen modulieren können. So vermitteln BEVs von *Bacteroides fragilis* beispielsweise antiinflammatorische Signale in T-Zellen (Shen et al., 2012). Auch für BEVs von *Bifidobacterium longum* und *Bifidobacterium bifidum* wurden anti-inflammatorische Effekte auf Immunzellen entdeckt (López et al., 2012; Mandelbaum et al., 2023).

Zum Zeitpunkt des Verfassens dieser Arbeit konnten bei der Literaturrecherche zur Wirkung von aus Stuhl extrahierten BEVs auf Immunzellen keine Arbeiten identifiziert werden.

5.2.1 Der Einfluss von BEVs Erwachsener und reifer Neugeborener auf den Phänotyp von Monozyten

Wir beobachteten in unseren Versuchen eine Induktion der Expression des Integrins CD11b auf Monozyten nach Stimulation mit BEVs aus dem Stuhl Neugeborener an den Zeitpunkten 2 und 3. CD11b spielt eine wichtige Rolle bei der Extravasion von Monozyten ins Gewebe und bildet gemeinsam mit CD18 den Komplementrezeptor CR3, welcher die Komplement-abhängige Phagozytose von Mikroorganismen vermittelt (Ehlers, 2000; Murphy, 2018). Eine Stimulation der Expression von CD11b auf Monozyten wird beispielsweise durch LPS vermittelt, welches auf den von uns untersuchten BEVs nachweisbar war (Lichte et al., 2013). Im Gegensatz zur vermehrten CD11b -Expression zeigte sich in unseren Versuchen eine verringerte Expression von CD18 nach Stimulation mit BEVs aus dem Stuhl aller untersuchter Gruppen gegenüber unstimulierten PBMCs. Auch für CD18 ist eine Stimulation der Expression durch LPS beschrieben (Lichte et al., 2013), so dass hier wahrscheinlich andere Komponenten in den von uns isolierten BEVs den LPS-Effekt überdecken. Interessanterweise ist eine herabregulierte Expression von CD18 für residente Makrophagen der Lamina propria beschrieben, welche aus zirkulierenden Monozyten entstehen können (Smith et al., 2011; Smythies et al., 2005). Diese residenten Makrophagen zeigen ein eher immun-regulatorisches Profil und tragen entscheidend zur Toleranz des intestinalen Mikrobioms durch das Immunsystem bei (Dennis et al., 2017; Smith et al., 2011). Weiterführende Untersuchungen wären notwendig, um genauer zu untersuchen, ob die Stimulation mit BEVs zu immun-regulatorischen Umprogrammierung von Monozyten führt. Für den Fc- γ -III Rezeptor CD16 beobachteten wir ebenfalls eine deutliche Herunterregulation auf Monozyten durch Stimulation mit BEVs aus dem Stuhl aller Gruppen. Auch das wurde für Lamina propria Makrophagen, welche dauerhaft in Kontakt mit dem intestinalem Mikrobiom stehen, bereits beschrieben (Smith et al., 2011). Als Mechanismus der Herabregulation der CD16-Expression auf Monozyten wurde beispielsweise die Exposition gegenüber n-Butyrat, einem Stoffwechselprodukt von Darmbakterien, identifiziert (Lasitschka et al., 2017). Da BEVs des Darmmikrobioms kurzkettige Fettsäuren

(SCFAs) wie Butyrat enthalten können (Huang et al., 2023), könnte dies ein potenzieller Vermittler der von uns beobachteten Effekte sein. Um hierzu detailliertere Aussagen treffen zu können, wären Untersuchungen der Komposition der von uns isolierten BEVs notwendig. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass intestinale Makrophagen von neugeborenen Mäusen mit einem sehr niedrigem Geburtsgewicht mehr CD16 exprimieren als normalgewichtige neugeborene Mäuse und dieser Unterschied zu einer erhöhten intestinalen Inflammation beiträgt (Zhang et al., 2022). Dies unterstützt die Hypothese, dass BEVs aus dem Stuhl eher anti-inflammatorische Effekte in Monozyten induzieren.

Die Expression der costimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 auf Monozyten wurde durch die Stimulation mit BEVs gegenläufig reguliert. Während es zu einer Induktion der Expression von CD80 durch BEVs fast aller Gruppen kam, wurde die Expression von CD86 durch BEVs Neugeborener der ersten vier Lebenstage und der fünften Lebenswoche signifikant reduziert. Die Expression von CD80 scheint bei LPS-induzierter Inflammation als früher Marker anzusteigen (Taddio et al., 2021). Umgekehrt wurde im Rahmen der sogenannten Endotoxin-Toleranz eine Herabregulation co-stimulatorischer Moleküle beobachtet (Wolk et al., 2000; Wong et al., 2007). Versuche mit längerer Stimulation mit BEVs konnten auf Grund einer ausgeprägten Herabregulation von CD14 auf Monozyten mit Dauer der Stimulation nicht durchgeführt werden. Daher konnte kein Aufschluss über den zeitlichen Verlauf der Expression der co-stimulatorischen Moleküle gewonnen werden.

Für die Expression des co-inhibitorischen Moleküls PD-L1 auf Monozyten zeigte sich nach Stimulation mit BEVs kein signifikanter Unterschied im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle. Allerdings war eine steigende Tendenz der PD-L1-Expression in Abhängigkeit vom Alter der Neugeborenen zu beobachten. Die Expression von PD-L2 wurde durch die Zugabe von BEVs Erwachsener auf Monozyten signifikant induziert und auch hier zeigte sich eine Zunahme der PD-L2-Expression durch Stimulation mit BEVs bei zunehmendem Alter der Neugeborenen. Im Rahmen einer Immunaktivierung kommt es klassischerweise bereits früh auch zu einer Induktion inhibitorischer Signalwege, mit dem Ziel

einmal begonnene Entzündungsreaktionen auch wieder zu beenden. Die verminderte Induktion von PD-L1 und PD-L2 durch BEVs Neugeborener könnte einerseits auf eine reduzierte Immunogenität im Vergleich zu BEVs aus dem Stuhl Erwachsener hindeuten, andererseits könnte diese Beobachtung auch mit einer prolongierten Immunreaktion auf Bestandteile des Mikrobioms in der Neugeborenenphase weisen. Weiterführende Untersuchungen wären hier notwendig, um die klinische Bedeutung der beobachteten Effekte zu verstehen.

Für den toll like receptor 4 (TLR4), welcher als Pattern recognition receptor (PRR) konservierte Strukturen erkennt (Li et al., 2019) und auf die Komponente Lipid A von LPS spezialisiert ist (Kuzmich et al., 2017; Raetz & Whitfield, 2002), wurde in dieser Arbeit eine Suppression durch Stimulation mit BEVs aus dem Stuhl Neugeborener insbesondere zu frühen Zeitpunkten, nicht aber durch BEVs aus dem Stuhl Erwachsener beobachtet. In vorherigen Studien konnte für BEVs von einzelnen Bakterien des intestinalen Mikrobioms wie z.B. *Fusobacterium nucleatum* (Engevik et al., 2021) oder *Bacteroides thetaiotaomicron* (Gul et al., 2022) eine Stimulation der TLR4-Expression beschrieben werden. Für Monozyten des Neugeborenen konnte in Arbeiten anderer Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass diese im Vergleich zu Monozyten von Erwachsenen weniger TLR4 exprimieren und eine geringere Aktivierung der nachgeschalteten proinflammatorischen Signalkaskade aufweisen (Doughty et al., 2022; Lukas Wisgrill et al., 2016). Möglicherweise trägt eine besondere Komposition von BEVs aus dem Stuhl am Anfang des Lebens zu diesem Effekt bei. TLR4 spielt eine wichtige Rolle bei der Entstehung einer sehr schweren entzündlichen Darmerkrankung des Frühgeborenen, der nekrotisierenden Enterokolitis (NEC) (Gribar et al., 2009; Liu et al., 2022). Eine durch BEVs vermittelte Suppression der TLR4-Expression könnte demnach einen schützenden Einfluss gegenüber der Entwicklung einer NEC haben.

5.2.2 Der Einfluss von BEVs Erwachsener und reifer Neugeborener auf den Phänotyp von T-Zellen

Auf Seiten der T-Zellen beobachteten wir eine Zunahme von T-Helferzellen und eine Abnahme von cytotoxischen T-Zellen nach Stimulation mit BEVs. Da im

Rahmen dieser Studie nur relative und keine absoluten Zellzahlen nach Stimulation mit BEVs bestimmt wurden, könnte eine mögliche Erklärung sein, dass es durch die Aufnahme von BEVs durch T-Zellen in bestimmten Subpopulationen zur Apoptose kommt und sich dadurch die Verhältnisse verschieben.

Innerhalb der T-Helferzellen kam es zu einer Suppression von TH1 (CD4⁺ CCR4⁻ CCR6⁻ CXCR3⁺ T-Zellen) -Zellen durch Stimulation mit BEVs. TH1-Zellen dienen der Abwehr intrazellulärer Bakterien und Viren. Sie bewirken über die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine, wie Interferon- γ (IFN- γ), eine Aktivierung von Zellen der angeborenen Immunität, von CD8-positiven T-Zellen und B-Zellen (Ekkens et al., 2007; Murphy, 2018; Sun et al., 2023). Ähnliche Beobachtungen wie wir machten Ahmadi Badi et al., welche für BEVs von *Bacteroides fragilis* eine Reduktion der IFN- γ -Produktion, welches durch TH1-Zellen produziert wird, nachweisen konnten (Ahmadi Badi et al., 2018; Yang et al., 1999). Auch für BEVs von *Lactobacillus rhamnosus* wurden solche Effekte beobachtet (Mata Forsberg et al., 2019). Eine Reduktion von TH1-Zellen und dem von diesen produzierten IFN- γ könnte auch die Reduktion der CD8-Population in unseren Kulturen erklären, da diese für ihre Differenzierung und Expansion IFN- γ benötigen (Uhl et al., 2023).

Der Anteil von TH2 (CD4⁺ CCR4⁺ CCR6⁻ CXCR3⁻) -Zellen und TH17-Zellen wurde durch die Zugabe von BEVs nicht signifikant verändert. Jedoch wurden regulatorische T-Zellen (Treg, CD4⁺CD25⁺) durch BEVs aller Gruppen induziert. Treg spielen eine zentrale Rolle in der Kontrolle von Infektionen sowie bei der Toleranz des Immunsystems gegenüber harmlosen Antigenen. Durch ihr Zytokin IL-10 hemmen sie unter anderem die Aktivierung von APZs und T-Zellen und tragen damit zu einer Abschwächung der Immunreaktion bei (Collison et al., 2009; Corthay, 2009; Josefowicz et al., 2012; Omenetti & Pizarro, 2015). Die Induktion von Treg durch BEVs von kommensalen Bakterien wie *Bacteroides fragilis* und *Lactobacillus rhamnosus* wurde bereits durch andere Arbeitsgruppen gezeigt (Al-Nedawi et al., 2015; Shen et al., 2012). Auch konnte gezeigt werden, dass BEVs des kommensalen *Bifidobacterium longum* zu einem vermehrten

Auftreten der Treg- assoziierten Zytokine IL-10 und TGF- β führten (Nie et al., 2025). Neugeborene zeigen im Vergleich zu Erwachsenen erhöhte Level an Treg (Sebe et al., 2020; Wang et al., 2010). Diese Treg scheinen wichtig für die Selbsttoleranz und für die Etablierung des intestinalen Mikrobioms bei Neugeborenen zu sein (Geuking et al., 2011). Sie wirken jedoch weniger suppressiv als adulte Treg (Rueda et al., 2015). Möglicherweise tragen BEVs des Mikrobioms zu einer Induktion von Treg bei Neugeborenen bei (Martínez-Ruiz et al., 2023). Außerdem wurde im Rahmen der NEC in Arbeiten anderer Gruppen eine Dysbalance von Treg und TH17-Zellen beobachtet (Yan et al., 2020; Zuiderwijk et al., 2022). Möglicherweise bewirkt daher eine Stimulation von Treg durch BEVs eines gesunden sich etablierenden intestinalen Mikrobioms einen Schutz vor der Entstehung einer NEC (Shen et al., 2022).

Bei der Expression der Aktivierungsmarker CD44 und CD62L und des co-inhibitorischen Moleküles PD-1 auf T-Zellen kam es zu keinen signifikanten Veränderungen durch die Stimulation mit BEVs. Jedoch zeigte sich eine Tendenz zu einer verminderten Expression von CD44 und PD-1 auf T-Zellen durch die BEV-Stimulation unabhängig vom Alter der Probanden. Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen in Monozyten, wo wir eine Tendenz zur Induktion von PD-L1 und PD-L2, den Liganden für PD-1 beobachteten, was bedeutet, dass sich BEVs unterschiedlich auf Zellen des angeborenen und des adaptiven Immunsystems auswirken. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um dies genauer zu beleuchten.

5.3 Die Wirkung von BEVs aus dem Stuhl Neugeborener im Vergleich zu BEVs aus dem Stuhl Frühgeborener auf Immunzellen

Eine für eine Dysbiose besonders vulnerable Patientengruppe sind Frühgeborene. Der unreife Darm, die meist lang andauernde Krankenhausbehandlung, die Ernährung mit Formula-Nahrung und die Exposition gegenüber Medikamenten sind nur einige Faktoren, welche zu Veränderungen des intestinalen Mikrobioms bei Frühgeborenen beitragen (Cuna et al., 2021; Mercer & Arrieta, 2023). Vorangegangene Studien zeigten, dass das Darmmikrobiom Frühgeborener im Gegensatz zu reifen Neugeborenen einen

höheren Anteil an Firmicuten und Proteobakterien aufweist (Dahl et al., 2018; Wandro et al., 2018). Außerdem scheint das Vorkommen von Bacteroidetes und Actinobacteria wie *Bifidobacterium breve* reduziert (Gorreja et al., 2019; Zheng et al., 2020). Auch ist das intestinale Mikrobiom Frühgeborener durch eine geringere Diversität der Mikrobiota gekennzeichnet (Cuna et al., 2021). Diese Veränderungen des intestinalen Mikrobioms stehen im Zusammenhang mit der Entstehung von NEC oder Sepsis in der Neugeborenen-Periode (Madan et al., 2012; Olm et al., 2019). In der hier vorliegenden Arbeit konnten keine Unterschiede in der Zusammensetzung von BEVs aus dem Stuhl Frühgeborener und Reifgeborener gefunden werden. Höchstwahrscheinlich ist dies durch die geringe Probenzahl in unserer Studie bedingt. Zudem scheint es, wie oben bereits erwähnt, so zu sein, dass Mikrobiom-Komposition und BEV-Zusammensetzung nicht immer miteinander korrelieren, so dass aus der BEV-Zusammensetzung nicht direkt auf das Mikrobiom rückgeschlossen werden kann und umgekehrt (Li et al., 2023).

5.3.1 Der Einfluss von BEVs Frühgeborener auf Immunzellen

Beim Vergleich der Wirkung von BEVs aus dem Stuhl reifer Neugeborener und Frühgeborener auf den Phänotyp von Immunzellen zeigten sich nur geringe Unterschiede. Wir beobachteten eine erhöhte Expression von CD11b und eine verminderte Expression von CD18 auf Monozyten, sowie eine verminderte Expression von CD44 und PD-1 auf T-Zellen nach Stimulation mit BEVs aus dem Stuhl Frühgeborener im Vergleich zu BEVs aus dem Stuhl Neugeborener. Auf Seiten der Monozyten scheinen BEVs Frühgeborener damit die gleichen Effekte zu haben wie BEVs reifer Neugeborener nur noch ausgeprägter, was insbesondere hinsichtlich der Herabregulation von CD18, wie sie auf Lamina propria Makrophagen beschrieben wurde, klinisch interessant sein könnte (Smith et al., 2011; Smythies et al., 2005). Als ein möglicher Mechanismus dafür könnte eine verändertes Metabolitprofil der BEVs aus Frühgeborenen-Stuhlproben denkbar sein (Lasitschka et al., 2017; Smith et al., 2011).

Auf Seiten der T-Zellen war ebenfalls der Effekt, den wir schon durch BEVs reifer Neugeborener und Erwachsener beobachteten durch BEVs Frühgeborener

nochmals verstärkt. Die Reduktion der Expression des Aktivierungsmarkers CD44 und des co-inhibitorischen Rezeptors PD-1 könnte auf eine Hemmung der T-Zell-Aktivierung durch BEVs aus dem Stuhl Frühgeborener hindeuten – möglicherweise mit dem physiologischen Zweck, eine Aktivierung der adaptiven Immunität im Rahmen der Etablierung des Mikrobioms zu unterdrücken. Außerdem beobachteten wir eine leichte, aber nicht statistisch signifikante Suppression von TH17-Zellen und Treg durch BEVs aus dem Stuhl Frühgeborener. Beide dieser T-Helferzell-Subpopulationen werden über den Transforming Growth Factor- β (TGF- β) induziert, welcher z.B. durch Zellen des intestinalen Epithels IECs und ortständige Dendritische Zellen sezerniert wird. So könnten BEVs aus dem Stuhl Frühgeborener die TGF- β Produktion modulieren und darüber zu einer Veränderung von T-Helferzell-Populationen beitragen. Weitere Arbeiten sind notwendig, um solche möglichen Interaktionen detaillierter zu untersuchen.

5.4 Die Wirkung von BEVs Frühgeborener ohne und mit früher Antibiotikaexposition

Antibiotika zählen zu den am häufigsten eingesetzten Medikamenten bei Frühgeborenen (Köstlin-Gille et al., 2023). Eine Reihe an Studien konnte aber zeigen, dass eine frühe Antibiotikaexposition mit einem erhöhten Risiko für inflammatorische Erkrankungen in der Neugeborenenzeit wie der NEC oder der bronchopulmonalen Dysplasie (BPD) (Köstlin-Gille et al., 2023; Vatne et al., 2023) sowie chronischen Erkrankungen im späteren Leben, wie Asthma oder atopische Dermatitis, assoziiert ist (Cuna et al., 2021; Lynn et al., 2018; Rätty et al., 2024; Uzan-Yulzari et al., 2021). Auf Mikrobiomebene wurde ein vermindertes Vorkommen von *Bifidobacteria* (Actinobacteria) und *Lactobacilli* (Firmicutes) und ein erhöhtes Vorkommen von Proteobacteria, besonders *Enterobacteriaceae* infolge einer frühen Antibiotikatherapie beschrieben (Hutchinson et al., 2023). Wir beobachteten auch hier, wie schon in den vorangegangenen Abschnitten beschrieben, keine Unterschiede in der BEV-Zusammensetzung zwischen BEVs aus dem Stuhl Frühgeborener ohne und mit früher Antibiotikaexposition auf Phylum-Ebene. Auch in diesem Fall ist die wahrscheinlichste Erklärung dafür die sehr geringe Probenzahl, die von uns untersucht wurde.

5.4.1 Der Einfluss von BEVs Frühgeborener ohne und mit Antibiotikaexposition auf den Phänotyp von Immunzellen

Hinsichtlich des Effektes von BEVs aus dem Stuhl Frühgeborener ohne und mit früher Antibiotikaexposition auf Immunzellen zeigten sich überraschenderweise ebenfalls keine Unterschiede. Aufgrund der vielfältigen negativen Auswirkungen von Antibiotika auf das Mikrobiom und die langfristige Gesundheit wäre zu erwarten gewesen, dass auch die BEVs der unbehandelten und behandelten Kinder unterschiedliche immunologische Effekte aufweisen. Jedoch muss hier angemerkt werden, dass es sich bei den von uns untersuchten Frühgeborenen um eine sehr heterogene Kohorte handelt und neben der Antibiotikaexposition eine Vielzahl weiterer Einflussfaktoren auf das Mikrobiom vorliegt, wie beispielsweise die Ernährung, der Geburtsmodus, Medikamentengaben etc. Daher ist die von uns untersuchte Fallzahl (8-10 Kinder pro Gruppe) wahrscheinlich zu klein, um Unterschiede aufzudecken.

5.5 Limitationen und Ausblick

Ziel dieser Arbeit war es, Einflüsse von BEVs des intestinalen Mikrobioms Neu- und Frühgeborener auf Immunzellen zu untersuchen. Zur Isolation der in dieser Arbeit verwendeten BEVs wurden Stuhlproben verwendet, was eine einfache und häufig angewandte Methode ist. Allerdings findet sich in Stuhlproben nur ein kleiner Ausschnitt der Mikroorganismen des intestinalen Mikrobioms (Levitan et al., 2023; Shalon et al., 2023), so dass wahrscheinlich nur ein Teil der tatsächlichen Wirkung von BEVs des intestinalen Mikrobioms mit unserer Methode untersucht werden kann. Um eine genaue Darstellung des intestinalen Mikrobioms zu erhalten, wäre eine mukosale (Bürsten-)Biopsie eine geeignete Methode, welche jedoch auf Grund ihrer Invasivität in der Praxis selten durchgeführt wird (Huse et al., 2014). Eine weitere wichtige Limitation dieser Arbeit ist, dass nur eine relativ geringe Probenzahl untersucht werden konnte. Das führt dazu, dass wichtige Einflussfaktoren auf das Mikrobiom, wie beispielsweise die Ernährung der Neu- und Frühgeborenen nicht berücksichtigt werden konnten.

Eine dritte Limitation ist die Tatsache, dass die für die Stimulation von Immunzellen verwendeten BEVs in dieser Arbeit nicht standardmäßig quantifiziert wurden, sondern dass sich die eingesetzte BEV-Menge an der Menge des Stuhls, der zur Aufreinigung verwendet wurde orientierte. In anderen Arbeiten mit extrazellulären Vesikeln zeigte sich, dass die Anzahl der Partikel in der gleichen Menge Stuhl variiert (Kameli et al., 2021), was in unseren Experimenten dazu geführt haben könnte, dass beobachtete Effekte durch veränderte BEV-Mengen zustande kamen oder umgekehrt, dass vorhandene Effekte durch die unterschiedlichen Mengen verdeckt wurden.

Als letzte Limitation ist zu nennen, dass für die Stimulationsversuche in dieser Studie frisch aufgereinigte PBMCs von gesunden erwachsenen männlichen und weiblichen Blut-Spendern verwendet wurden. Es ist bekannt, dass PBMCs verschiedener Spender unterschiedlich auf Stimulation reagieren (Kumasaka et al., 2023; Vissers et al., 2013), so dass nicht auszuschließen ist, dass PBMC-bedingte Effekte zu den beobachteten Effekten beitragen. Um die interindividuellen Faktoren zu minimieren, wurden möglichst viele unterschiedliche PBMC-Spender für die Versuche verwendet.

Als Ausblick auf weitere Untersuchungen ist zu nennen, dass Immunzellen Neugeborener andere Eigenschaften als Immunzellen Erwachsener (Moraes-Pinto et al., 2021) zeigen. Um ein besseres Verständnis der Wirkung von BEVs im kindlichen Organismus zu erlangen, wäre die ergänzende Untersuchung der Wirkung der BEVs auf mononukleäre Zellen aus dem Nabelschnurblut oder aus dem peripheren Blut von Neugeborenen sinnvoll (Frede & Milling, 2021).

Des Weiteren wurde in unseren Versuchen lediglich der Effekt von Stuhl-BEVs auf den Phänotyp von Immunzellen analysiert. Funktionelle Untersuchungen wurden bisher nicht durchgeführt, wären aber eine wichtige Ergänzung zu unseren Versuchen. Beispielsweise könnte die Zytokin-Produktion von Immunzellen nach BEV-Stimulation analysiert werden oder intrazelluläre Signalwege untersucht werden, die mit pro- oder antiinflammatorischer Immunaktivierung in Verbindung stehen (Areström et al., 2012; Lamoreaux et al., 2006). Auch wäre die Untersuchung der Wirkung von BEVs auf andere

Immunzellen wie z.B. B-Zellen, wünschenswert, um ein möglichst vollständiges Bild über die BEV-Immun-Interaktion zu erhalten.

Hinsichtlich translationaler Überlegungen konnte gezeigt werden, dass BEVs im Rahmen von Impfungen nutzbar sein können, entweder als direkter Vermittler der Impfantwort oder als Adjuvans (Nahui Palomino et al., 2021). BEVs können dabei verschiedene Proteine, Lipopolysaccharide oder Toxine der entsprechenden Erreger tragen und damit eine umfassende Immunantwort auslösen, ohne das Risiko einer Vermehrung des Pathogens (Rima et al., 2025). Der auf äußere Membranvesikel (OMVs) basierende Impfstoff Bexsero funktioniert bereits nach diesem Prinzip und wurde 2013 durch die europäische Arzneimittelbehörde EMA zugelassen (Seib et al., 2015).

Die bei Impfungen bereits genutzte Immunogenität von BEVs könnte bei Neugeborenen eventuell in der Zukunft zur Prävention von mit Fehlfunktionen des Immunsystems assoziierten Erkrankungen, wie z.B. Allergien genutzt werden. Ein möglicher Mechanismus, wie das frühe Mikrobiom das Immunsystem langfristig beeinflusst, ist die epigenetische Prägung von Immunzellen (Gutierrez et al., 2020). Auch für BEVs konnte eine solche epigenetische Modulation nachgewiesen werden (Charpentier et al., 2023). Möglicherweise könnten sich zum Beispiel oral verabreichbare BEVs entwickeln lassen, die vor dem Auftreten allergischer Erkrankungen schützen können.

Ein weiterer Ansatz könnte sein, dass statt des Einsatzes von Probiotika bei Frühgeborenen z.B. zur Prävention der NEC, BEVs von probiotisch wirkenden Mikroorganismen verabreicht werden. Diese sind nicht vermehrungsfähig und können zudem gezielt modifiziert werden, beispielsweise um bioaktiver Moleküle wie SCFA zu transportieren (Muñoz-Echeverri et al., 2024). Das zwar geringe, aber doch vorhandene Risiko einer durch Probiotika verursachten Sepsis könnte damit umgangen werden (Land et al., 2005; Underwood et al., 2020).

6 Zusammenfassung

Das intestinale Mikrobiom spielt eine wesentliche Rolle bei Gesunderhaltung und Krankheitsentstehung. Es ist bekannt, dass verschiedene perinatale Einflüsse wie der Geburtsmodus oder eine frühe Antibiotikatherapie zu Veränderungen des Darm-Mikrobioms führen, welche wiederum mit der Entstehung von chronischen Erkrankungen wie Asthma oder Adipositas assoziiert sind (Hufnagl et al., 2020). Die Mikroorganismen des Mikrobioms produzieren extrazelluläre Vesikel (BEVs), die immunmodulatorisch wirken können (Díaz-Garrido et al., 2021). Bisher ist nicht untersucht, wie sich BEVs Neugeborener und Frühgeborener aus dem Stuhl *in vitro* auf Immunzellen auswirken und ob es Unterschiede zur Wirkung von BEVs Erwachsener gibt.

In der hier vorliegenden Arbeit wurden Stuhlproben reifer, per Kaiserschnitt entbundener Neugeborene mit einem Gestationsalter >37 Schwangerschaftswochen (SSW) jeweils an den Lebenstagen eins bis vier, sieben bis zehn und in der fünften Lebenswoche oder Stuhlproben Frühgeborener mit einem Gestationsalter von <32 SSW und einem Lebensalter von zehn bis 20 Lebenstagen mit und ohne Antibiotikaexposition in der ersten Lebenswoche gewonnen. Es erfolgte dann eine Extraktion von BEVs aus dem Stuhl mit Hilfe des Polymers ExoQuick-TC™. Die gewonnenen BEVs wurden mittels Nanopartikel-Tracking-Analyse quantifiziert und vermessen. Es erfolgte der Nachweis bakterieller Proteine mittels ELISA. Außerdem wurde eine RT-qPCR auf wichtigste im menschlichen Mikrobiom vorkommenden Bakterien-Phyla durchgeführt. Als Kontrolle dienten BEVs aus dem Stuhl gesunder Erwachsener. Um die Wirkung der BEVs aus dem Stuhl auf Immunzellen zu untersuchen wurden die isolierten BEVs für 24 h zu frisch isolierten mononukleären Zellen (PBMC) gesunder erwachsener Spender gegeben. Der Phänotyp von Monozyten und T-Zellen ohne und mit BEV-Stimulation wurde daraufhin durchflusszytometrisch analysiert.

Bei Monozyten zeigten sich sowohl pro- als auch antiinflammatorische Effekte durch die Stimulation mit BEVs. Die meisten der beobachteten Effekte wurden gleichermaßen durch BEVs Erwachsener und Neugeborener hervorgerufen. Als

für BEVs Neugeborener spezifischer Effekt zeigte sich eine Suppression der Expression von TLR4 im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle und zu mit BEVs aus dem Stuhl Erwachsener stimulierten PBMC. Außerdem zeigte sich im Vergleich zur Stimulation mit Erwachsenen-BEVs eine fehlende Induktion des co-inhibitorischen Moleküls PD-L2 durch BEVs Neugeborener. Auf Seiten der T-Zellen zeigte sich eine Suppression von pro-inflammatorischen TH1-Zellen und eine Induktion von regulatorischen T-Zellen durch BEVs aller Gruppen. Neugeborenen-spezifische Effekte waren hier nicht zu beobachten. Auch wurden nur sehr geringe Unterschiede in der Wirkung von BEVs aus dem Stuhl Frühgeborener verglichen mit der Wirkung von BEVs von reifen Neugeborenen auf den Immunzell-Phänotyp beobachtet. Eine frühe Antibiotikaexposition hatte in unseren Versuchen keinen Effekt auf die immunologische Wirkung der BEVs.

Zusammenfassend konnte mit der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass BEVs aus dem Stuhl immunologisch wirksam sein können. Eine Suppression der Expression von TLR4 durch BEVs aus dem Stuhl Neugeborener könnte ein Mechanismus sein, wie BEVs vor überschießenden Immunreaktionen im Rahmen der Mikrobiometablierung schützen. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um die Bedeutung von BEVs auf die Immunadaptation des Neugeborenen detaillierter zu untersuchen.

7 Literaturverzeichnis

- Ahmadi Badi, S., Khatami, S., Irani, S., & Siadat, S. D. (2018). Induction Effects of *Bacteroides fragilis* Derived Outer Membrane Vesicles on Toll Like Receptor 2, Toll Like Receptor 4 Genes Expression and Cytokines Concentration in Human Intestinal Epithelial Cells. *Cell Journal (Yakhteh)*, 21(1), 57-61. <https://doi.org/10.22074/cellj.2019.5750>
- Al-Nedawi, K., Mian, M. F., Hossain, N., Karimi, K., Mao, Y. K., Forsythe, P., Min, K. K., Stanis, A. M., Kunze, W. A., & Bienenstock, J. (2015). Gut commensal microvesicles reproduce parent bacterial signals to host immune and enteric nervous systems. *Faseb j*, 29(2), 684-695. <https://doi.org/10.1096/fj.14-259721>
- Anthony, W. E., Burnham, C. D., Dantas, G., & Kwon, J. H. (2021). The Gut Microbiome as a Reservoir for Antimicrobial Resistance. *J Infect Dis*, 223(12 Suppl 2), S209-s213. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa497>
- Areström, I., Zuber, B., Bengtsson, T., & Ahlborg, N. (2012). Measurement of human latent transforming growth factor- β 1 using a latency associated protein-reactive ELISA. *Journal of Immunological Methods*, 379(1), 23-29. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jim.2012.02.016>
- Attia Hussein Mahmoud, H., Parekh, R., Dhandibhotla, S., Sai, T., Pradhan, A., Alugula, S., Cevallos-Cueva, M., Hayes, B. K., Athanti, S., Abdin, Z., & K, B. (2023). Insight Into Neonatal Sepsis: An Overview. *Cureus*, 15(9), e45530. <https://doi.org/10.7759/cureus.45530>
- Basha, S., Surendran, N., & Pichichero, M. (2014). Immune responses in neonates. *Expert Rev Clin Immunol*, 10(9), 1171-1184. <https://doi.org/10.1586/1744666x.2014.942288>
- Bittel, M., Reichert, P., Sarfati, I., Dressel, A., Leikam, S., Uderhardt, S., Stolzer, I., Phu, T. A., Ng, M., Vu, N. K., Tenzer, S., Distler, U., Wirtz, S., Rothhammer, V., Neurath, M. F., Raffai, R. L., Günther, C., & Momma, S. (2021). Visualizing transfer of microbial biomolecules by outer membrane vesicles in microbe-host-communication in vivo. *J Extracell Vesicles*, 10(12), e12159. <https://doi.org/10.1002/jev2.12159>
- Boulund, U., Thorsen, J., Trivedi, U., Tranæs, K., Jiang, J., Shah, S. A., & Stokholm, J. (2025). The role of the early-life gut microbiome in childhood asthma. *Gut Microbes*, 17(1), 2457489. <https://doi.org/10.1080/19490976.2025.2457489>
- Brown, E. M., Clardy, J., & Xavier, R. J. (2023). Gut microbiome lipid metabolism and its impact on host physiology. *Cell Host Microbe*, 31(2), 173-186. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2023.01.009>
- Bunnell, T. M., Burbach, B. J., Shimizu, Y., & Ervasti, J. M. (2011). β -Actin specifically controls cell growth, migration, and the G-actin pool. *Mol Biol Cell*, 22(21), 4047-4058. <https://doi.org/10.1091/mbc.E11-06-0582>
- Champagne-Jorgensen, K., Jose, T. A., Stanis, A. M., Mian, M. F., Hynes, A. P., & Bienenstock, J. (2021). Bacterial membrane vesicles and phages in blood after consumption of *Lactobacillus rhamnosus* JB-1. *Gut Microbes*, 13(1), 1993583. <https://doi.org/10.1080/19490976.2021.1993583>
- Charpentier, L. A., Dolben, E. F., Hendricks, M. R., Hogan, D. A., Bomberger, J. M., & Stanton, B. A. (2023). Bacterial Outer Membrane Vesicles and Immune

- Modulation of the Host. *Membranes* (Basel), 13(9). <https://doi.org/10.3390/membranes13090752>
- Coillard, A., & Segura, E. (2019). In vivo Differentiation of Human Monocytes. *Front Immunol*, 10, 1907. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01907>
- Collison, L. W., Pillai, M. R., Chaturvedi, V., & Vignali, D. A. (2009). Regulatory T cell suppression is potentiated by target T cells in a cell contact, IL-35- and IL-10-dependent manner. *J Immunol*, 182(10), 6121-6128. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0803646>
- Corthay, A. (2009). How do regulatory T cells work? *Scand J Immunol*, 70(4), 326-336. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2009.02308.x>
- Cuenca, A. G., Wynn, J. L., Moldawer, L. L., & Levy, O. (2013). Role of innate immunity in neonatal infection. *Am J Perinatol*, 30(2), 105-112. <https://doi.org/10.1055/s-0032-1333412>
- Cukrowska, B., Biełła, J. B., Zakrzewska, M., Klukowski, M., & Maciorkowska, E. (2020). The Relationship between the Infant Gut Microbiota and Allergy. The Role of Bifidobacterium breve and Prebiotic Oligosaccharides in the Activation of Anti-Allergic Mechanisms in Early Life. *Nutrients*, 12(4). <https://doi.org/10.3390/nu12040946>
- Cuna, A., Morowitz, M. J., Ahmed, I., Umar, S., & Sampath, V. (2021). Dynamics of the preterm gut microbiome in health and disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 320(4), G411-g419. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00399.2020>
- Dahl, C., Stigum, H., Valeur, J., Iszatt, N., Lenters, V., Peddada, S., Bjørnholt, J. V., Midtvedt, T., Mandal, S., & Eggesbø, M. (2018). Preterm infants have distinct microbiomes not explained by mode of delivery, breastfeeding duration or antibiotic exposure. *Int J Epidemiol*, 47(5), 1658-1669. <https://doi.org/10.1093/ije/dyy064>
- De Filippis, F., Paparo, L., Nocerino, R., Della Gatta, G., Carucci, L., Russo, R., Pasolli, E., Ercolini, D., & Berni Canani, R. (2021). Specific gut microbiome signatures and the associated pro-inflammatory functions are linked to pediatric allergy and acquisition of immune tolerance. *Nat Commun*, 12(1), 5958. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26266-z>
- Dennis, E. A., Robinson, T. O., Smythies, L. E., & Smith, P. D. (2017). Characterization of Human Blood Monocytes and Intestinal Macrophages. *Curr Protoc Immunol*, 118, 14.13.11-14.13.14. <https://doi.org/10.1002/cpim.30>
- Díaz-Garrido, N., Badia, J., & Baldomà, L. (2021). Microbiota-derived extracellular vesicles in interkingdom communication in the gut. *J Extracell Vesicles*, 10(13), e12161. <https://doi.org/10.1002/jev2.12161> (J Extracell Vesicles)
- Doughty, C., Oppermann, L., Hartmann, N.-U., Dreschers, S., Gille, C., & Orlikowsky, T. (2022). Monocytes in Neonatal Bacterial Sepsis: Think Tank or Workhorse? *BioChem*, 2(1), 27-42. <https://www.mdpi.com/2673-6411/2/1/3>
- Dzidic, M., Mira, A., Artacho, A., Abrahamsson, T. R., Jenmalm, M. C., & Collado, M. C. (2020). Allergy development is associated with consumption of breastmilk with a reduced microbial richness in the first month of life. *Pediatric Allergy and Immunology*, 31(3), 250-257. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/pai.13176>

- Ehlers, M. R. (2000). CR3: a general purpose adhesion-recognition receptor essential for innate immunity. *Microbes Infect*, 2(3), 289-294. [https://doi.org/10.1016/s1286-4579\(00\)00299-9](https://doi.org/10.1016/s1286-4579(00)00299-9)
- Ekkens, M. J., Shedlock, D. J., Jung, E., Troy, A., Pearce, E. L., Shen, H., & Pearce, E. J. (2007). Th1 and Th2 cells help CD8 T-cell responses. *Infect Immun*, 75(5), 2291-2296. <https://doi.org/10.1128/iai.01328-06>
- El Aidy, S., Hooiveld, G., Tremaroli, V., Bäckhed, F., & Kleerebezem, M. (2013). The gut microbiota and mucosal homeostasis: colonized at birth or at adulthood, does it matter? *Gut Microbes*, 4(2), 118-124. <https://doi.org/10.4161/gmic.23362>
- Engevik, M. A., Danhof, H. A., Ruan, W., Engevik, A. C., Chang-Graham, A. L., Engevik, K. A., Shi, Z., Zhao, Y., Brand, C. K., Krystofiak, E. S., Venable, S., Liu, X., Hirschi, K. D., Hyser, J. M., Spinler, J. K., Britton, R. A., & Versalovic, J. (2021). *Fusobacterium nucleatum* Secretes Outer Membrane Vesicles and Promotes Intestinal Inflammation. *mBio*, 12(2). <https://doi.org/10.1128/mBio.02706-20>
- Fábrega, M. J., Rodríguez-Nogales, A., Garrido-Mesa, J., Algieri, F., Badía, J., Giménez, R., Gálvez, J., & Balmón, L. (2017). Intestinal Anti-inflammatory Effects of Outer Membrane Vesicles from *Escherichia coli* Nissle 1917 in DSS-Experimental Colitis in Mice. *Front Microbiol*, 8, 1274. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01274>
- Ferretti, P., Pasolli, E., Tett, A., Asnicar, F., Gorfer, V., Fedi, S., Armanini, F., Truong, D. T., Manara, S., Zolfo, M., Beghini, F., Bertorelli, R., De Sanctis, V., Bariletti, I., Canto, R., Clementi, R., Cologna, M., Crifò, T., Cusumano, G.,...Segata, N. (2018). Mother-to-Infant Microbial Transmission from Different Body Sites Shapes the Developing Infant Gut Microbiome. *Cell Host Microbe*, 24(1), 133-145.e135. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.06.005>
- Fike, A. J., Kumova, O. K., & Carey, A. J. (2019). Dissecting the defects in the neonatal CD8(+) T-cell response. *J Leukoc Biol*, 106(5), 1051-1061. <https://doi.org/10.1002/jlb.5ru0319-105r>
- Frede, A., & Milling, S. (2021). Teaching tolerance: Diverse cellular interactions enable healthy maturation. *Immunology*, 163(3), 237-238. <https://doi.org/10.1111/imm.13381>
- Geuking, M. B., Cahenzli, J., Lawson, M. A., Ng, D. C., Slack, E., Hapfelmeier, S., McCoy, K. D., & Macpherson, A. J. (2011). Intestinal bacterial colonization induces mutualistic regulatory T cell responses. *Immunity*, 34(5), 794-806. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.03.021>
- Gill, S. R., Pop, M., Deboy, R. T., Eckburg, P. B., Turnbaugh, P. J., Samuel, B. S., Gordon, J. I., Relman, D. A., Fraser-Liggett, C. M., & Nelson, K. E. (2006). Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science*, 312(5778), 1355-1359. <https://doi.org/10.1126/science.1124234>
- Giordano, N. P., Cian, M. B., & Dalebroux, Z. D. (2020). Outer Membrane Lipid Secretion and the Innate Immune Response to Gram-Negative Bacteria. *Infect Immun*, 88(7). <https://doi.org/10.1128/iai.00920-19>
- Gomez de Agüero, M., Ganai-Vonarburg, S. C., Fuhrer, T., Rupp, S., Uchimura, Y., Li, H., Steinert, A., Heikenwalder, M., Hapfelmeier, S., Sauer, U., McCoy, K. D., & Macpherson, A. J. (2016). The maternal microbiota drives early postnatal innate

- immune development. *Science*, 351(6279), 1296-1302. <https://doi.org/doi:10.1126/science.aad2571>
- Gopalakrishna, K. P., & Hand, T. W. (2020). Influence of Maternal Milk on the Neonatal Intestinal Microbiome. *Nutrients*, 12(3). <https://doi.org/10.3390/nu12030823>
- Gorreja, F., Rush, S. T., Kasper, D. L., Meng, D., & Walker, W. A. (2019). The developmentally regulated fetal enterocyte gene, ZP4, mediates anti-inflammation by the symbiotic bacterial surface factor polysaccharide A on *Bacteroides fragilis*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 317(4), G398-g407. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00046.2019>
- Gribar, S. C., Sodhi, C. P., Richardson, W. M., Anand, R. J., Gittes, G. K., Branca, M. F., Jakub, A., Shi, X. H., Shah, S., Ozolek, J. A., & Hackam, D. J. (2009). Reciprocal expression and signaling of TLR4 and TLR9 in the pathogenesis and treatment of necrotizing enterocolitis. *J Immunol*, 182(1), 636-646. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.182.1.636>
- Guilliams, M., Mildner, A., & Yona, S. (2018). Developmental and Functional Heterogeneity of Monocytes. *Immunity*, 49(4), 595-613. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.10.005>
- Gul, L., Modos, D., Fonseca, S., Madgwick, M., Thomas, J. P., Sudhakar, P., Booth, C., Stentz, R., Carding, S. R., & Korcsmaros, T. (2022). Extracellular vesicles produced by the human commensal gut bacterium *Bacteroides thetaiotaomicron* affect host immune pathways in a cell-type specific manner that are altered in inflammatory bowel disease. *J Extracell Vesicles*, 11(1), e12189. <https://doi.org/10.1002/jev2.12189>
- Gutierrez, M. J., Nino, G., Hong, X., & Wang, X. (2020). Epigenomics and Early Life Human Humoral Immunity: Novel Paradigms and Research Opportunities. *Front Immunol*, 11, 1766. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01766>
- Henrick, B. M., Rodriguez, L., Lakshmikanth, T., Pou, C., Henckel, E., Arzoomand, A., Olin, A., Wang, J., Mikes, J., Tan, Z., Chen, Y., Ehrlich, A. M., Bernhardsson, A. K., Mugabo, C. H., Ambrosiani, Y., Gustafsson, A., Chew, S., Brown, H. K., Prambs, J.,...Brodin, P. (2021). Bifidobacteria-mediated immune system imprinting early in life. *Cell*, 184(15), 3884-3898.e3811. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.05.030>
- Huang, C. (2020). Germinal Center Reaction. In J.-Y. Wang (Ed.), *B Cells in Immunity and Tolerance* (pp. 47-53). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-15-3532-1_4
- Huang, J., Wang, X., Wang, Z., Deng, L., Wang, Y., Tang, Y., Luo, L., & Leung, E. L. (2023). Extracellular vesicles as a novel mediator of interkingdom communication. *Cytokine Growth Factor Rev*, 73, 173-184. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2023.08.005>
- Hufnagl, K., Pali-Schöll, I., Roth-Walter, F., & Jensen-Jarolim, E. (2020). Dysbiosis of the gut and lung microbiome has a role in asthma. *Semin Immunopathol*, 42(1), 75-93. <https://doi.org/10.1007/s00281-019-00775-y>
- Huse, S. M., Young, V. B., Morrison, H. G., Antonopoulos, D. A., Kwon, J., Dalal, S., Arrieta, R., Hubert, N. A., Shen, L., Vineis, J. H., Koval, J. C., Sogin, M. L., Chang, E. B., & Raffals, L. E. (2014). Comparison of brush and biopsy sampling methods

- of the ileal pouch for assessment of mucosa-associated microbiota of human subjects. *Microbiome*, 2(1), 5. <https://doi.org/10.1186/2049-2618-2-5>
- Hutchinson, R. A., Costeloe, K. L., Wade, W. G., Millar, M. R., Ansbro, K., Stacey, F., & Fleming, P. F. (2023). Intravenous antibiotics in preterm infants have a negative effect upon microbiome development throughout preterm life. *Gut Pathogens*, 15(1), 18. <https://doi.org/10.1186/s13099-023-00544-1>
- Josefowicz, S. Z., Lu, L. F., & Rudensky, A. Y. (2012). Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Annu Rev Immunol*, 30, 531-564. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141623>
- Kameli, N., Borman, R., Lpez-Iglesias, C., Savelkoul, P., & Stassen, F. R. M. (2021). Characterization of Feces-Derived Bacterial Membrane Vesicles and the Impact of Their Origin on the Inflammatory Response. *Front Cell Infect Microbiol*, 11, 667987. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.667987>
- Kim, S. Y., & Yi, D. Y. (2020). Analysis of the human breast milk microbiome and bacterial extracellular vesicles in healthy mothers. *Exp Mol Med*, 52(8), 1288-1297. <https://doi.org/10.1038/s12276-020-0470-5>
- Kollmann, T. R., Crabtree, J., Rein-Weston, A., Blimkie, D., Thommai, F., Wang, X. Y., Lavoie, P. M., Furlong, J., Fortuno, E. S., 3rd, Hajjar, A. M., Hawkins, N. R., Self, S. G., & Wilson, C. B. (2009). Neonatal innate TLR-mediated responses are distinct from those of adults. *J Immunol*, 183(11), 7150-7160. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901481>
- Korpela, K., Blakstad, E. W., Moltu, S. J., Strommen, K., Nakstad, B., Ronnestad, A. E., Braekke, K., Iversen, P. O., Drevon, C. A., & de Vos, W. (2018). Intestinal microbiota development and gestational age in preterm neonates. *Sci Rep*, 8(1), 2453. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20827-x>
- Korpela, K., Salonen, A., Saxen, H., Nikkonen, A., Peltola, V., Jaakkola, T., de Vos, W., & Kolho, K. L. (2020). Antibiotics in early life associate with specific gut microbiota signatures in a prospective longitudinal infant cohort. *Pediatr Res*, 88(3), 438-443. <https://doi.org/10.1038/s41390-020-0761-5>
- Köstlin-Gille, N., Serna-Higueta, L. M., Bubser, C., Arand, J., Haag, L., Schwarz, C. E., Heideking, M., Poets, C. F., & Gille, C. (2023). Early initiation of antibiotic therapy and short-term outcomes in preterm infants: a single-centre retrospective cohort analysis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, 108(6), 623-630. <https://doi.org/10.1136/archdischild-2022-325113>
- Kumasaka, N., Rostom, R., Huang, N., Polanski, K., Meyer, K. B., Patel, S., Boyd, R., Gomez, C., Barnett, S. N., Panousis, N. I., Schwartzentruber, J., Ghousaini, M., Lyons, P. A., Calero-Nieto, F. J., Göttgens, B., Barnes, J. L., Worlock, K. B., Yoshida, M., Nikolić, M. Z.,...Teichmann, S. A. (2023). Mapping interindividual dynamics of innate immune response at single-cell resolution. *Nature Genetics*, 55(6), 1066-1075. <https://doi.org/10.1038/s41588-023-01421-y>
- Kuzmich, N. N., Sivak, K. V., Chubarev, V. N., Porozov, Y. B., Savateeva-Lyubimova, T. N., & Peri, F. (2017). TLR4 Signaling Pathway Modulators as Potential Therapeutics in Inflammation and Sepsis. *Vaccines*, 5(4), 34. <https://www.mdpi.com/2076-393X/5/4/34>
- Lajqi, T., Köstlin-Gille, N., Hillmer, S., Braun, M., Kranig, S. A., Dietz, S., Krause, C., Rühle, J., Frommhold, D., Pöschl, J., Gille, C., & Hudalla, H. (2022). Gut

- Microbiota-Derived Small Extracellular Vesicles Endorse Memory-like Inflammatory Responses in Murine Neutrophils. *Biomedicines*, 10(2). <https://doi.org/10.3390/biomedicines10020442>
- Lamoreaux, L., Roederer, M., & Koup, R. (2006). Intracellular cytokine optimization and standard operating procedure. *Nature Protocols*, 1(3), 1507-1516. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.268>
- Land, M. H., Rouster-Stevens, K., Woods, C. R., Cannon, M. L., Cnota, J., & Shetty, A. K. (2005). Lactobacillus sepsis associated with probiotic therapy. *Pediatrics*, 115(1), 178-181. <https://doi.org/10.1542/peds.2004-2137>
- Lasitschka, F., Giese, T., Paparella, M., Kurzhals, S. R., Wabnitz, G., Jacob, K., Gras, J., Bode, K. A., Heninger, A. K., Sziskzai, T., Samstag, Y., Leszinski, C., Jocher, B., Al-Saeedi, M., Meuer, S. C., & Schröder-Braunstein, J. (2017). Human monocytes downregulate innate response receptors following exposure to the microbial metabolite n-butyrate. *Immun Inflamm Dis*, 5(4), 480-492. <https://doi.org/10.1002/iid3.184>
- Levitán, O., Ma, L., Giovannelli, D., Burleson, D. B., McCaffrey, P., Vala, A., & Johnson, D. A. (2023). The gut microbiome-Does stool represent right? *Heliyon*, 9(3), e13602. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e13602>
- Li, C. C., Hsu, W. F., Chiang, P. C., Kuo, M. C., Wo, A. M., & Tseng, Y. J. (2023). Characterization of markers, functional properties, and microbiome composition in human gut-derived bacterial extracellular vesicles. *Gut Microbes*, 15(2), 2288200. <https://doi.org/10.1080/19490976.2023.2288200>
- Li, P., Wu, Y. H., Zhu, Y. T., Li, M. X., & Pei, H. H. (2019). Requirement of Rab21 in LPS-induced TLR4 signaling and pro-inflammatory responses in macrophages and monocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 508(1), 169-176. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.11.074>
- Liang, X., Dai, N., Sheng, K., Lu, H., Wang, J., Chen, L., & Wang, Y. (2022). Gut bacterial extracellular vesicles: important players in regulating intestinal microenvironment. *Gut Microbes*, 14(1), 2134689. <https://doi.org/10.1080/19490976.2022.2134689>
- Lichte, P., Grigoleit, J. S., Steiner, E. M., Kullmann, J. S., Schedlowski, M., Oberbeck, R., & Kobbe, P. (2013). Low dose LPS does not increase TLR4 expression on monocytes in a human in vivo model. *Cytokine*, 63(1), 74-80. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2013.04.014>
- Liu, T., Zong, H., Chen, X., Li, S., Liu, Z., Cui, X., Jia, G., & Shi, Y. (2022). Toll-like receptor 4-mediated necroptosis in the development of necrotizing enterocolitis. *Pediatric Research*, 91(1), 73-82. <https://doi.org/10.1038/s41390-021-01457-y>
- López, P., González-Rodríguez, I., Sánchez, B., Gueimonde, M., Margolles, A., & Suárez, A. (2012). Treg-inducing membrane vesicles from Bifidobacterium bifidum LMG13195 as potential adjuvants in immunotherapy. *Vaccine*, 30(5), 825-829. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.11.115>
- Low, J. S. Y., Soh, S. E., Lee, Y. K., Kwek, K. Y. C., Holbrook, J. D., Van der Beek, E. M., Shek, L. P., Goh, A. E. N., Teoh, O. H., Godfrey, K. M., Chong, Y. S., Knol, J., & Lay, C. (2017). Ratio of Klebsiella/Bifidobacterium in early life correlates with later development of paediatric allergy. *Benef Microbes*, 8(5), 681-695. <https://doi.org/10.3920/bm2017.0020>

- Lynn, M. A., Tumes, D. J., Choo, J. M., Sribnaia, A., Blake, S. J., Leong, L. E. X., Young, G. P., Marshall, H. S., Wesselingh, S. L., Rogers, G. B., & Lynn, D. J. (2018). Early-Life Antibiotic-Driven Dysbiosis Leads to Dysregulated Vaccine Immune Responses in Mice. *Cell Host Microbe*, 23(5), 653-660.e655. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.04.009>
- Madan, J. C., Salari, R. C., Saxena, D., Davidson, L., Toole, G. A., Moore, J. H., Sogin, M. L., Foster, J. A., Edwards, W. H., Palumbo, P., & Hibberd, P. L. (2012). Gut microbial colonisation in premature neonates predicts neonatal sepsis. *Archives of Disease in Childhood - Fetal and Neonatal Edition*, 97(6), F456. <https://doi.org/10.1136/fetalneonatal-2011-301373>
- Mandelbaum, N., Zhang, L., Carasso, S., Ziv, T., Lifshiz-Simon, S., Davidovich, I., Luz, I., Berinstein, E., Gefen, T., Cooks, T., Talmon, Y., Balskus, E. P., & Geva-Zatorsky, N. (2023). Extracellular vesicles of the Gram-positive gut symbiont *Bifidobacterium longum* induce immune-modulatory, anti-inflammatory effects. *NPJ Biofilms Microbiomes*, 9(1), 30. <https://doi.org/10.1038/s41522-023-00400-9>
- Martínez-Ruiz, S., Sáez-Fuertes, L., Casanova-Crespo, S., Rodríguez-Lagunas, M. J., Pérez-Cano, F. J., Badia, J., & Baldoma, L. (2023). Microbiota-Derived Extracellular Vesicles Promote Immunity and Intestinal Maturation in Suckling Rats. *Nutrients*, 15(21). <https://doi.org/10.3390/nu15214701>
- Mata Forsberg, M., Björkander, S., Pang, Y., Lundqvist, L., Ndi, M., Ott, M., Escribá, I. B., Jaeger, M. C., Roos, S., & Sverremark-Ekström, E. (2019). Extracellular Membrane Vesicles from Lactobacilli Dampen IFN- γ Responses in a Monocyte-Dependent Manner. *Sci Rep*, 9(1), 17109. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53576-6>
- McKinnon, K. M. (2018). Flow Cytometry: An Overview. *Curr Protoc Immunol*, 120, 5.1.1-5.1.11. <https://doi.org/10.1002/cpim.40>
- Mercer, E. M., & Arrieta, M. C. (2023). Probiotics to improve the gut microbiome in premature infants: are we there yet? *Gut Microbes*, 15(1), 2201160. <https://doi.org/10.1080/19490976.2023.2201160>
- Mishra, A., Lai, G. C., Yao, L. J., Aung, T. T., Shental, N., Rotter-Maskowitz, A., Shepherdson, E., Singh, G. S. N., Pai, R., Shanti, A., Wong, R. M. M., Lee, A., Khyriem, C., Dutertre, C. A., Chakarov, S., Srinivasan, K. G., Shadan, N. B., Zhang, X. M., Khalilnezhad, S.,...Ginhoux, F. (2021). Microbial exposure during early human development primes fetal immune cells. *Cell*, 184(13), 3394-3409.e3320. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.04.039>
- Mold, J. E., Venkatasubrahmanyam, S., Burt, T. D., Michaëlsson, J., Rivera, J. M., Galkina, S. A., Weinberg, K., Stoddart, C. A., & McCune, J. M. (2010). Fetal and adult hematopoietic stem cells give rise to distinct T cell lineages in humans. *Science*, 330(6011), 1695-1699. <https://doi.org/10.1126/science.1196509>
- Moraes-Pinto, M. I., Suano-Souza, F., & Aranda, C. S. (2021). Immune system: development and acquisition of immunological competence. *J Pediatr (Rio J)*, 97 Suppl 1(Suppl 1), S59-s66. <https://doi.org/10.1016/j.jped.2020.10.006>
- Muñoz-Echeverri, L. M., Benavides-López, S., Geiger, O., Trujillo-Roldán, M. A., & Valdez-Cruz, N. A. (2024). Bacterial extracellular vesicles: biotechnological

- perspective for enhanced productivity. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 40(6), 174. <https://doi.org/10.1007/s11274-024-03963-7>
- Murphy, K. (2018). *JANEWAY IMMUNOLOGIE*. SPRINGER.
- Nahui Palomino, R. A., Vanpouille, C., Costantini, P. E., & Margolis, L. (2021). Microbiota-host communications: Bacterial extracellular vesicles as a common language. *PLoS Pathog*, 17(5), e1009508. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009508>
- Nie, X., Li, Q., Ji, H., Zhang, S., Wang, Y., Xie, J., & Nie, S. (2025). Bifidobacterium longum NSP001-derived extracellular vesicles ameliorate ulcerative colitis by modulating T cell responses in gut microbiota-(in)dependent manners. *npj Biofilms and Microbiomes*, 11(1), 27. <https://doi.org/10.1038/s41522-025-00663-4>
- O'Donoghue, E. J., & Krachler, A. M. (2016). Mechanisms of outer membrane vesicle entry into host cells. *Cell Microbiol*, 18(11), 1508-1517. <https://doi.org/10.1111/cmi.12655>
- Olm, M. R., Bhattacharya, N., Crits-Christoph, A., Firek, B. A., Baker, R., Song, Y. S., Morowitz, M. J., & Banfield, J. F. (2019). Necrotizing enterocolitis is preceded by increased gut bacterial replication, Klebsiella, and fimbriae-encoding bacteria. *Sci Adv*, 5(12), eaax5727. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aax5727>
- Omenetti, S., & Pizarro, T. T. (2015). The Treg/Th17 Axis: A Dynamic Balance Regulated by the Gut Microbiome. *Front Immunol*, 6, 639. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00639>
- Park, J., Kim, N. E., Yoon, H., Shin, C. M., Kim, N., Lee, D. H., Park, J. Y., Choi, C. H., Kim, J. G., Kim, Y. K., Shin, T. S., Yang, J., & Park, Y. S. (2021). Fecal Microbiota and Gut Microbe-Derived Extracellular Vesicles in Colorectal Cancer. *Front Oncol*, 11, 650026. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.650026>
- Percy, M. G., & Gründling, A. (2014). Lipoteichoic acid synthesis and function in gram-positive bacteria. *Annu Rev Microbiol*, 68, 81-100. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091213-112949>
- Petursdottir, D. H., Nordlander, S., Qazi, K. R., Carvalho-Queiroz, C., Ahmed Osman, O., Hell, E., Björkander, S., Haileselassie, Y., Navis, M., Kokkinou, E., Lio, I. Z. L., Hennemann, J., Brodin, B., Huseby, D. L., Nilsson, C., Hughes, D., Udekwu, K. I., & Sverremark-Ekström, E. (2017). Early-Life Human Microbiota Associated With Childhood Allergy Promotes the T Helper 17 Axis in Mice. *Front Immunol*, 8, 1699. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01699>
- Rackaityte, E., Halkias, J., Fukui, E. M., Mendoza, V. F., Hayzelden, C., Crawford, E. D., Fujimura, K. E., Burt, T. D., & Lynch, S. V. (2020). Viable bacterial colonization is highly limited in the human intestine in utero. *Nat Med*, 26(4), 599-607. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0761-3>
- Raetz, C. R., & Whitfield, C. (2002). Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem*, 71, 635-700. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.71.110601.135414>
- Räty, S., Ollila, H., Turta, O., Pärtty, A., Peltola, V., Lagström, H., Lempainen, J., & Rautava, S. (2024). Neonatal and early infancy antibiotic exposure is associated with childhood atopic dermatitis, wheeze and asthma. *European Journal of Pediatrics*, 183(12), 5191-5202. <https://doi.org/10.1007/s00431-024-05775-1>

- Rey-Mariño, A., & Francino, M. P. (2022). Nutrition, Gut Microbiota, and Allergy Development in Infants. *Nutrients*, 14(20). <https://doi.org/10.3390/nu14204316>
- Reyman, M., van Houten, M. A., van Baarle, D., Bosch, A., Man, W. H., Chu, M., Arp, K., Watson, R. L., Sanders, E. A. M., Fuentes, S., & Bogaert, D. (2019). Impact of delivery mode-associated gut microbiota dynamics on health in the first year of life. *Nat Commun*, 10(1), 4997. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13014-7>
- Rima, M., Dakramanji, M., El Hayek, E., El Khoury, T., Fajloun, Z., & Rima, M. (2025). Unveiling the wonders of bacteria-derived extracellular vesicles: From fundamental functions to beneficial applications. *Heliyon*, 11(4), e42509. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2025.e42509>
- Rossol, M., Heine, H., Meusch, U., Quandt, D., Klein, C., Sweet, M. J., & Hauschildt, S. (2011). LPS-induced cytokine production in human monocytes and macrophages. *Crit Rev Immunol*, 31(5), 379-446. <https://doi.org/10.1615/critrevimmunol.v31.i5.20>
- Rudd, B. D. (2020). Neonatal T Cells: A Reinterpretation. *Annu Rev Immunol*, 38, 229-247. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-091319-083608>
- Rueda, C. M., Moreno-Fernandez, M. E., Jackson, C. M., Kallapur, S. G., Jobe, A. H., & Chougnet, C. A. (2015). Neonatal regulatory T cells have reduced capacity to suppress dendritic cell function. *Eur J Immunol*, 45(9), 2582-2592. <https://doi.org/10.1002/eji.201445371>
- Sanchez-Schmitz, G., Morrocchi, E., Cooney, M., Soni, D., Khatun, R., Palma, P., Dowling, D. J., & Levy, O. (2020). Neonatal monocytes demonstrate impaired homeostatic extravasation into a microphysiological human vascular model. *Scientific Reports*, 10(1), 17836. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74639-z>
- Schaack, B., Hindré, T., Quansah, N., Hannani, D., Mercier, C., & Laurin, D. (2022). Microbiota-Derived Extracellular Vesicles Detected in Human Blood from Healthy Donors. *Int J Mol Sci*, 23(22). <https://doi.org/10.3390/ijms232213787>
- Schoultz, I., & Keita Å, V. (2020). The Intestinal Barrier and Current Techniques for the Assessment of Gut Permeability. *Cells*, 9(8). <https://doi.org/10.3390/cells9081909>
- Schwechheimer, C., Sullivan, C. J., & Kuehn, M. J. (2013). Envelope control of outer membrane vesicle production in Gram-negative bacteria. *Biochemistry*, 52(18), 3031-3040. <https://doi.org/10.1021/bi400164t>
- Sebe, A., Anliker, B., Rau, J., & Renner, M. (2020). [Genetically modified regulatory T cells: therapeutic concepts and regulatory aspects]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*, 63(11), 1403-1411. <https://doi.org/10.1007/s00103-020-03230-8> (Genetisch modifizierte regulatorische T-Zellen: Therapiekonzepte und ihr regulatorischer Rahmen.)
- Seib, K. L., Maria, S., Maurizio, C., Daniela, T., & Masignani, V. (2015). Neisseria meningitidis factor H-binding protein fHbp: a key virulence factor and vaccine antigen. *Expert Review of Vaccines*, 14(6), 841-859. <https://doi.org/10.1586/14760584.2015.1016915>
- Shalon, D., Culver, R. N., Grembi, J. A., Folz, J., Treit, P. V., Shi, H., Rosenberger, F. A., Dethlefsen, L., Meng, X., Yaffe, E., Aranda-Díaz, A., Geyer, P. E., Mueller-Reif, J. B., Spencer, S., Patterson, A. D., Triadafilopoulos, G., Holmes, S. P., Mann, M., Fiehn, O.,...Huang, K. C. (2023). Profiling the human intestinal

- environment under physiological conditions. *Nature*, 617(7961), 581-591. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-05989-7>
- Shen, Q., Huang, Z., Yao, J., & Jin, Y. (2022). Extracellular vesicles-mediated interaction within intestinal microenvironment in inflammatory bowel disease. *Journal of Advanced Research*, 37, 221-233. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jare.2021.07.002>
- Shen, Y., Torchia, Maria Letizia G., Lawson, Gregory W., Karp, Christopher L., Ashwell, Jonathan D., & Mazmanian, Sarkis K. (2012). Outer Membrane Vesicles of a Human Commensal Mediate Immune Regulation and Disease Protection. *Cell Host & Microbe*, 12(4), 509-520. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.08.004>
- Smith, C. J., & Osborn, A. M. (2009). Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiol Ecol*, 67(1), 6-20. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00629.x>
- Smith, P. D., Smythies, L. E., Shen, R., Greenwell-Wild, T., Gliozzi, M., & Wahl, S. M. (2011). Intestinal macrophages and response to microbial encroachment. *Mucosal Immunol*, 4(1), 31-42. <https://doi.org/10.1038/mi.2010.66>
- Smythies, L. E., Sellers, M., Clements, R. H., Mosteller-Barnum, M., Meng, G., Benjamin, W. H., Orenstein, J. M., & Smith, P. D. (2005). Human intestinal macrophages display profound inflammatory anergy despite avid phagocytic and bacteriocidal activity. *J Clin Invest*, 115(1), 66-75. <https://doi.org/10.1172/jci19229>
- Stewart, C. J., Ajami, N. J., O'Brien, J. L., Hutchinson, D. S., Smith, D. P., Wong, M. C., Ross, M. C., Lloyd, R. E., Doddapaneni, H., Metcalf, G. A., Muzny, D., Gibbs, R. A., Vatanen, T., Huttenhower, C., Xavier, R. J., Rewers, M., Hagopian, W., Toppari, J., Ziegler, A. G.,...Petrosino, J. F. (2018). Temporal development of the gut microbiome in early childhood from the TEDDY study. *Nature*, 562(7728), 583-588. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0617-x>
- Su, W., & Ding, X. (2015). Methods of Endotoxin Detection. *J Lab Autom*, 20(4), 354-364. <https://doi.org/10.1177/2211068215572136>
- Sun, L., Su, Y., Jiao, A., Wang, X., & Zhang, B. (2023). T cells in health and disease. *Signal Transduct Target Ther*, 8(1), 235. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01471-y>
- Taddio, M. F., Castro Jaramillo, C. A., Runge, P., Blanc, A., Keller, C., Talip, Z., Béhé, M., van der Meulen, N. P., Halin, C., Schibli, R., & Krämer, S. D. (2021). In Vivo Imaging of Local Inflammation: Monitoring LPS-Induced CD80/CD86 Upregulation by PET. *Molecular Imaging and Biology*, 23(2), 196-207. <https://doi.org/10.1007/s11307-020-01543-3>
- Takiishi, T., Fenero, C. I. M., & Câmara, N. O. S. (2017). Intestinal barrier and gut microbiota: Shaping our immune responses throughout life. *Tissue Barriers*, 5(4), e1373208. <https://doi.org/10.1080/21688370.2017.1373208>
- Tatkiewicz, W., Elizondo, E., Moreno, E., Díez-Gil, C., Ventosa, N., Veciana, J., & Ratera, I. (2015). Methods for characterization of protein aggregates. *Methods Mol Biol*, 1258, 387-401. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2205-5_22
- Théry, C., Witwer, K. W., Aikawa, E., Alcaraz, M. J., Anderson, J. D., Andriantsitohaina, R., Antoniou, A., Arab, T., Archer, F., Atkin-Smith, G. K., Ayre, D. C., Bach, J. M., Bachurski, D., Baharvand, H., Balaj, L., Baldacchino, S., Bauer, N. N., Baxter, A. A., Bebawy, M.,...Zuba-Surma, E. K. (2018). Minimal information for studies of

- extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles*, 7(1), 1535750. <https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1535750> (J Extracell Vesicles)
- Tun, H. M., Bridgman, S. L., Chari, R., Field, C. J., Guttman, D. S., Becker, A. B., Mandhane, P. J., Turvey, S. E., Subbarao, P., Sears, M. R., Scott, J. A., & Kozyskyj, A. L. (2018). Roles of Birth Mode and Infant Gut Microbiota in Intergenerational Transmission of Overweight and Obesity From Mother to Offspring. *JAMA Pediatr*, 172(4), 368-377. <https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2017.5535>
- Turunen, J., Tejesvi, M. V., Suokas, M., Virtanen, N., Paalanne, N., Kaisanlahti, A., Reunanen, J., & Tapiainen, T. (2022). Bacterial extracellular vesicles in the microbiome of first-pass meconium in newborn infants. *Pediatr Res*. <https://doi.org/10.1038/s41390-022-02242-1>
- Uhl, L. F. K., Cai, H., Oram, S. L., Mahale, J. N., MacLean, A. J., Mazet, J. M., Piccirilli, T., He, A. J., Lau, D., Elliott, T., & Gerard, A. (2023). Interferon- γ couples CD8+ T cell avidity and differentiation during infection. *Nature Communications*, 14(1), 6727. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-42455-4>
- Underwood, M. A., Umberger, E., & Patel, R. M. (2020). Safety and efficacy of probiotic administration to preterm infants: ten common questions. *Pediatr Res*, 88(Suppl 1), 48-55. <https://doi.org/10.1038/s41390-020-1080-6>
- Uzan-Yulzari, A., Turta, O., Belogolovski, A., Ziv, O., Kunz, C., Perschbacher, S., Neuman, H., Pasolli, E., Oz, A., Ben-Amram, H., Kumar, H., Ollila, H., Kaljonen, A., Isolauri, E., Salminen, S., Lagström, H., Segata, N., Sharon, I., Louzoun, Y.,...Koren, O. (2021). Neonatal antibiotic exposure impairs child growth during the first six years of life by perturbing intestinal microbial colonization. *Nature Communications*, 12(1), 443. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20495-4>
- Vatne, A., Hapnes, N., Stensvold, H. J., Dalen, I., Guthe, H. J., Støen, R., Brigtson, A. K., Rønnestad, A. E., & Klingenberg, C. (2023). Early Empirical Antibiotics and Adverse Clinical Outcomes in Infants Born Very Preterm: A Population-Based Cohort. *The Journal of Pediatrics*, 253, 107-114.e105. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2022.09.029>
- Visser, M., Habets, M. N., Ahout, I. M., Jans, J., de Jonge, M. I., Diavatopoulos, D. A., & Ferwerda, G. (2013). An in vitro model to study immune responses of human peripheral blood mononuclear cells to human respiratory syncytial virus infection. *J Vis Exp*(82), e50766. <https://doi.org/10.3791/50766>
- Walker, J. M. (1994). The bicinchoninic acid (BCA) assay for protein quantitation. *Methods Mol Biol*, 32, 5-8. <https://doi.org/10.1385/0-89603-268-x:5>
- Wandro, S., Osborne, S., Enriquez, C., Bixby, C., Arrieta, A., & Whiteson, K. (2018). The Microbiome and Metabolome of Preterm Infant Stool Are Personalized and Not Driven by Health Outcomes, Including Necrotizing Enterocolitis and Late-Onset Sepsis. *mSphere*, 3(3), 10.1128/msphere.00104-00118. <https://doi.org/10.1128/msphere.00104-18>
- Wang, G., Miyahara, Y., Guo, Z., Khattar, M., Stepkowski, S. M., & Chen, W. (2010). "Default" generation of neonatal regulatory T cells. *J Immunol*, 185(1), 71-78. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903806>

- Wisgrill, L., Groschopf, A., Herndl, E., Sadeghi, K., Spittler, A., Berger, A., & Förster-Waldl, E. (2016). Reduced TNF- α response in preterm neonates is associated with impaired nonclassic monocyte function. *J Leukoc Biol*, 100(3), 607-612. <https://doi.org/10.1189/jlb.4A0116-001RR>
- Wisgrill, L., Groschopf, A., Herndl, E., Sadeghi, K., Spittler, A., Berger, A., & Förster-Waldl, E. (2016). Reduced TNF- α response in preterm neonates is associated with impaired nonclassic monocyte function. *Journal of Leukocyte Biology*, 100(3), 607-612. <https://doi.org/10.1189/jlb.4A0116-001RR>
- Wolk, K., Docke, W. D., von Baehr, V., Volk, H. D., & Sabat, R. (2000). Impaired antigen presentation by human monocytes during endotoxin tolerance. *Blood*, 96(1), 218-223. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10891454
- Wong, H. R., Shanley, T. P., Sakthivel, B., Cvijanovich, N., Lin, R., Allen, G. L., Thomas, N. J., Doctor, A., Kalyanaraman, M., Tofil, N. M., Penfil, S., Monaco, M., Tagavilla, M. A., Odoms, K., Dunsmore, K., Barnes, M., & Aronow, B. J. (2007). Genome-level expression profiles in pediatric septic shock indicate a role for altered zinc homeostasis in poor outcome. *Physiol Genomics*, 30(2), 146-155. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00024.2007>
- Xiao, L., Wang, J., Zheng, J., Li, X., & Zhao, F. (2021). Deterministic transition of enterotypes shapes the infant gut microbiome at an early age. *Genome Biol*, 22(1), 243. <https://doi.org/10.1186/s13059-021-02463-3>
- Xiao, L., & Zhao, F. (2023). Microbial transmission, colonisation and succession: from pregnancy to infancy. *Gut*. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2022-328970>
- Xu, Y., Milburn, O., Beiersdorfer, T., Du, L., Akinbi, H., & Haslam, D. B. (2022). Antibiotic exposure prevents acquisition of beneficial metabolic functions in the preterm infant gut microbiome. *Microbiome*, 10(1), 103. <https://doi.org/10.1186/s40168-022-01300-4>
- Yan, J. B., Luo, M. M., Chen, Z. Y., & He, B. H. (2020). The Function and Role of the Th17/Treg Cell Balance in Inflammatory Bowel Disease. *J Immunol Res*, 2020, 8813558. <https://doi.org/10.1155/2020/8813558>
- Yang, J., Murphy, T. L., Ouyang, W., & Murphy, K. M. (1999). Induction of interferon-gamma production in Th1 CD4⁺ T cells: evidence for two distinct pathways for promoter activation. *Eur J Immunol*, 29(2), 548-555. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1521-4141\(199902\)29:02<548::Aid-immu548>3.0.Co;2-z](https://doi.org/10.1002/(sici)1521-4141(199902)29:02<548::Aid-immu548>3.0.Co;2-z)
- Zhang, H., Zhang, Z., Liao, Y., Zhang, W., & Tang, D. (2022). The Complex Link and Disease Between the Gut Microbiome and the Immune System in Infants. *Front Cell Infect Microbiol*, 12, 924119. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.924119>
- Zheng, N., Gao, Y., Zhu, W., Meng, D., & Walker, W. A. (2020). Short chain fatty acids produced by colonizing intestinal commensal bacterial interaction with expressed breast milk are anti-inflammatory in human immature enterocytes. *PLoS One*, 15(2), e0229283. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229283>
- Zhu, J. (2015). T helper 2 (Th2) cell differentiation, type 2 innate lymphoid cell (ILC2) development and regulation of interleukin-4 (IL-4) and IL-13 production. *Cytokine*, 75(1), 14-24. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2015.05.010>

- Zuiderwijk, M. O., van der Burg, M., Bekker, V., & Schoenaker, M. H. D. (2022). Regulatory T Cells in Development and Prediction of Necrotizing Enterocolitis in Preterm Neonates: A Scoping Review. *Int J Mol Sci*, 23(18). <https://doi.org/10.3390/ijms231810903>

8 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Klinik Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen Neonatologie und neonatologische Intensivmedizin im Labor für neonatale Immunologie und Immuntoleranz unter Betreuung von Prof. Natascha Köstlin-Gille durchgeführt.

Die Versuche wurden nach Einarbeitung durch Labormitglieder von mir eigenständig durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig durch mich.

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

Tübingen, den 20.07.2025

9 Danksagung

Mein Dank gilt meiner Betreuerin PD Dr. Natascha Köstlin-Gille die mich mit großem Fachwissen, wertvollen Ratschlägen und stetiger Motivation durch alle Phasen dieser Arbeit begleitet hat. Außerdem möchte ich der Arbeitsgruppe für Neonatale Immunologie der Universitätsklinik Tübingen danken. Nur durch eure Unterstützung war es für mich möglich mich als Medizinerin einem naturwissenschaftlichen Thema auf diese Weise auseinanderzusetzen. Vielen Dank, dass ich bei euch so viel Lernen durfte.

Im Labor habe ich meine gute Freundin Samantha Kewitz kennengelernt, ihr möchte ich besonders für Ihre großartige Unterstützung, Geduld und Anleitung danken.

Durch mein Studium und auch durch meine Dissertation haben mich Rebecca Dost, Hanne Grollmann und Nina Rödiger begleitet. Für ihre Unterstützung und die großartige gemeinsame Zeit in der Uni, der Bibliothek und danach bedanke ich mich ganz herzlich.

Mein besonderer Dank gilt meinem Partner Friedrich Horn, für seinen Support und seine Unterstützung, seine Geduld, sein offenes Ohr und die Notfall-Essensversorgung im Labor und auch zu Hause, ohne ihn wäre ich das ein oder andere Mal verhungert!

Außerdem möchte ich meinem wundervollen Sohn Gustav für lange Mittagsschläfe danken, in denen ich diese Arbeit korrigieren konnte.

Zuletzt gilt mein Dank meinen Freunden und meiner Familie, insbesondere meiner Mutter, die mir meinen Bildungsweg ermöglicht hat und für mich ein großes Vorbild ist. Ohne eure Unterstützung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

10 Vorträge/ Posterpräsentationen

49. Jahrestagung der Gesellschaft für Neonatologie und Pädiatrische Intensivmedizin (GNPI) gemeinsam mit der 35. Jahrestagung des wissenschaftlichen Arbeitskreises (WAKKA), Hamburg, 15.06.- 17.06.2023

Die Wirkung von extrazellulären Vesikeln aus dem Stuhl Neu- und Frühgeborener auf den Phänotyp von B- und T-Zellen im Blut

Luzia Uhlig, Samantha Kewitz, Stefanie Dietz, Christian Poets, Christian Gille, Natascha Köstlin-Gille

31. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Perinatale Medizin, Berlin, 30.11.- 02.12.2023

Die Wirkung von extrazellulären Vesikeln aus dem Stuhl Neu- und Frühgeborener auf den Phänotyp von Monozyten und T-Zellen

Luzia Uhlig, Samantha Kewitz, Jessica Rühle, Stefanie Dietz, Christian F Poets, Christian Gille, Natascha Köstlin-Gille