

Fachtagung Mikrobiom in Schwangerschaft, Geburt und  
Stillzeit 2019

# Die mütterliche Darmflora als Booster des neugeborenen Immunsystems

Dr. Stephanie Ganal-Vonarburg

Department for BioMedical Research

Inselspital Bern

[stephanie.ganal@dbmr.unibe.ch](mailto:stephanie.ganal@dbmr.unibe.ch)

29. August 2019

**u<sup>b</sup>**

---

**UNIVERSITÄT  
BERN**

**INSELSPITAL**

UNIVERSITÄTSSPITAL BERN  
HOPITAL UNIVERSITAIRE DE BERNE  
BERN UNIVERSITY HOSPITAL

# Sind wir überhaupt Mensch?

50% Mikroben

**100% Human?**



**$10^{13} - 10^{14}$  Mikroben**

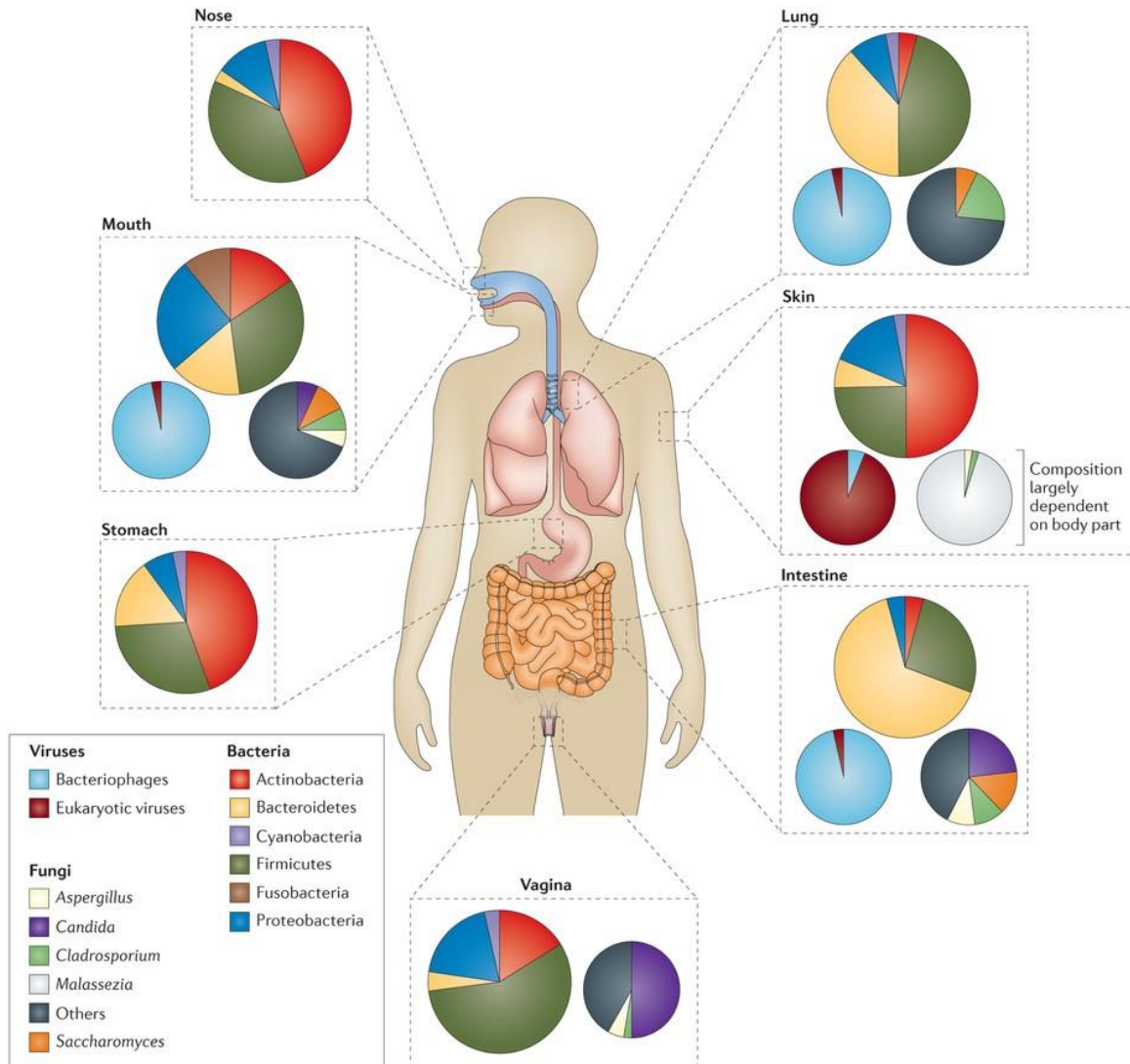
- 0.5 kg

- 500-1000 verschiedene Bakterien

**$10^{12} - 10^{13}$  Körperzellen**

50% menschliche Zellen

# Unsere Körperoberflächen sind mit Mikroben besiedelt



- **Körperoberflächen**
  - Haut
  - Atemwege
  - Darm
  - Urogenitaltrakt
- **Bakterien, Viren, Pilze, Parasiten**
- **Der Darm ist Hauptlebensort für Bakterien**

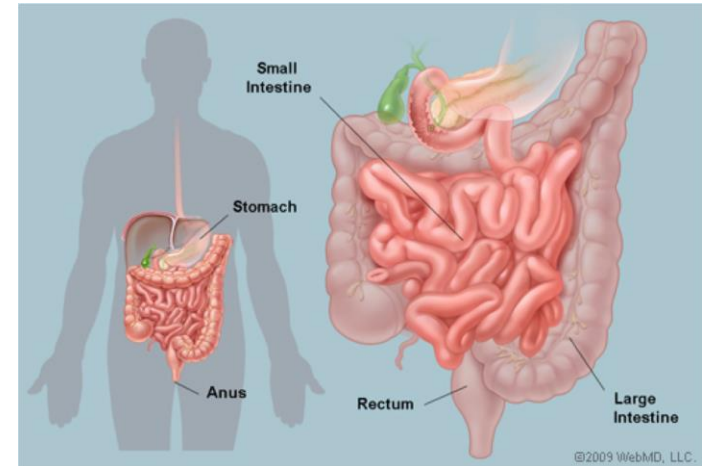
# Die Welt ist voller Bakterien



Extreme Temperaturen

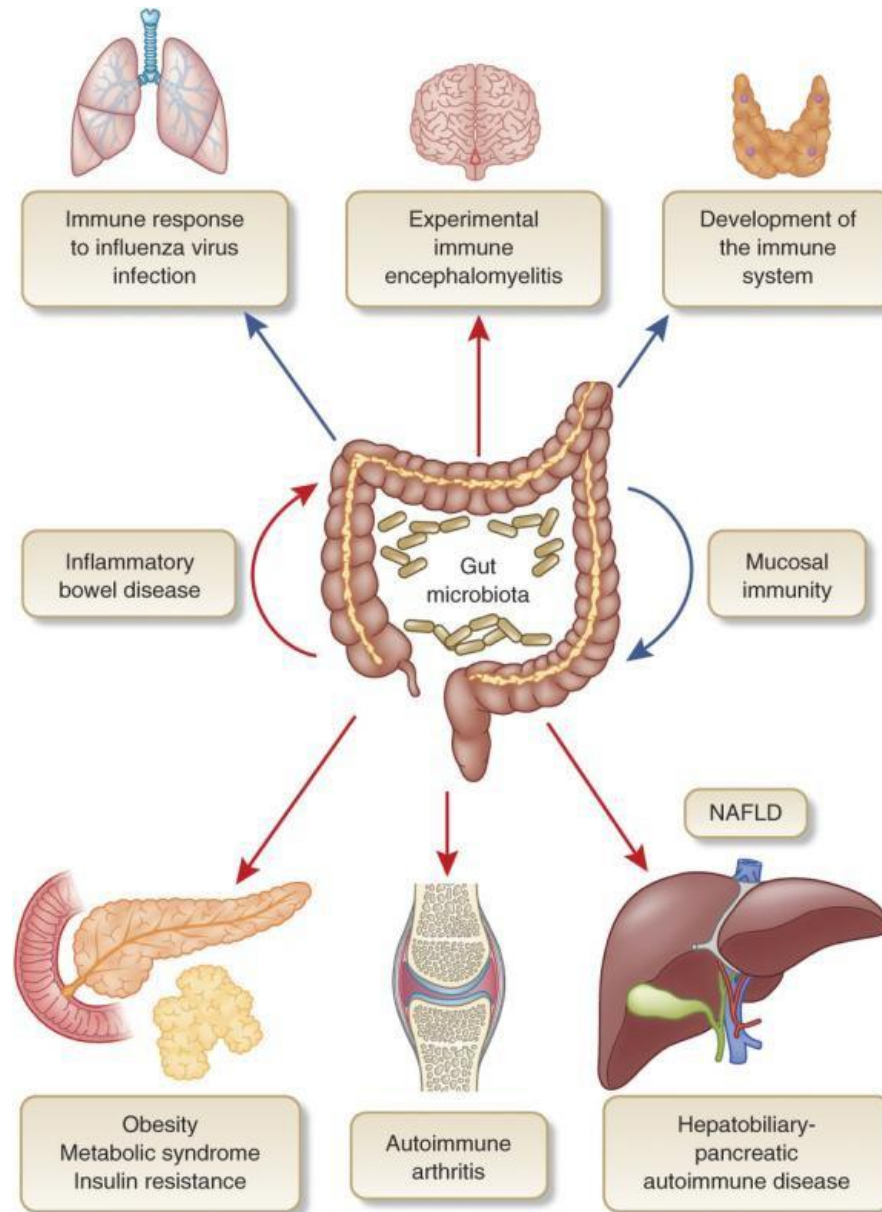


Extreme chemische  
Bedingungen



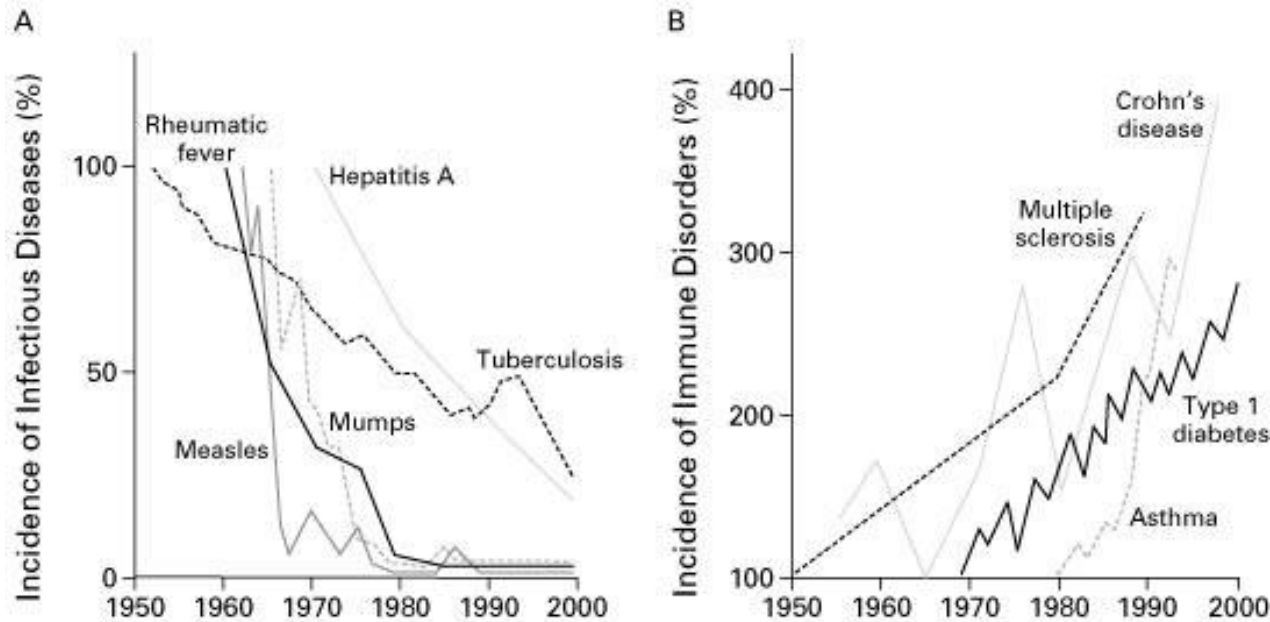
Die dichteste bakterielle  
Ansiedlung befindet sich im  
Darmtrakt von Säuge<eren

# Warum interessieren wir uns so sehr für die Mikrobiota?



Debbie Maizels

# Die „Hygienehypothese“ (Strachan, 1989)



## Die Herkunft eines Kindes beeinflusst dessen Anfälligkeit für Allergien, Asthma, Autoimmunerkrankungen

- Geburt/Kindheit in Entwicklungs-/Industrieland
- Bauernhof/Land/Stadt
- Hygiene/Kontakt zu Tieren/Ernährung/Lebensstil
- Infektionskrankheiten/Impfungen
- Geschwister

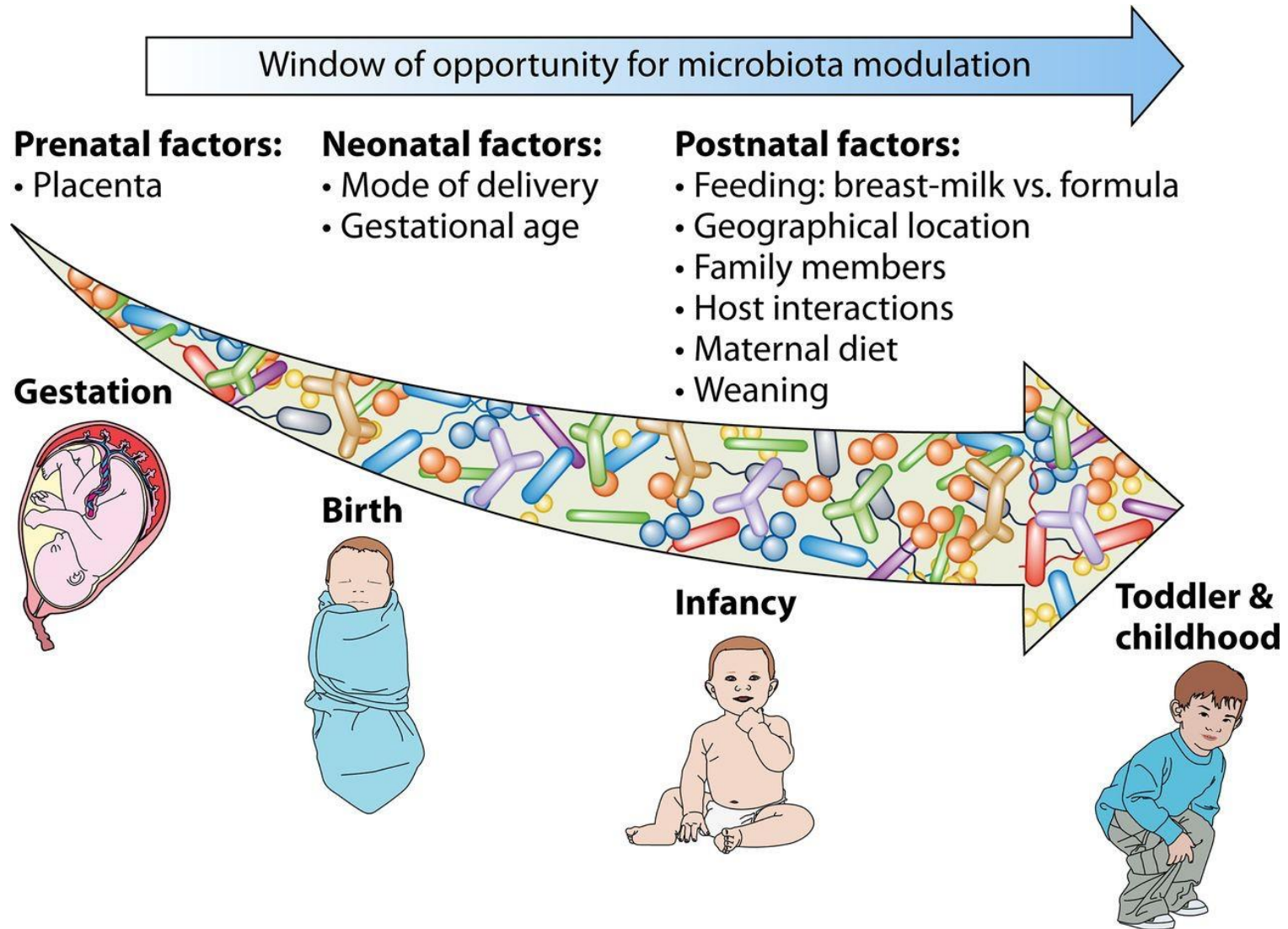
# Die „Hygienehypothese“



Können wir das  
kindliche Immunsystem  
schon vor der Geburt  
stimulieren?



# Kolonisierung mit Mikrobiota beginnt bei der Geburt



# Die menschliche Plazenta und der Fetus sind bis zur Geburt keimfrei

RESEARCH ARTICLE

---

MICROBIOME

## The Placenta Harbors a Unique Microbiome

Kjersti Aagaard,<sup>1,2,3\*</sup> Jun Ma,<sup>1,2</sup> Kathleen M. Antony,<sup>1</sup> Radhika Ganu,<sup>1</sup> Joseph Petrosino,<sup>4</sup> James Versalovic<sup>5</sup>

# Human placenta has no microbiome but can contain potential pathogens

Marcus C. de Goffau<sup>1,2,8</sup>, Susanne Lager<sup>3,4,5,8</sup>, Ulla Sovio<sup>3,4</sup>, Francesca Gaccioli<sup>3,4</sup>, Emma Cook<sup>3</sup>, Sharon J. Peacock<sup>1,6,7</sup>, Julian Parkhill<sup>1,2\*</sup>, D. Stephen Charnock-Jones<sup>3,4,9</sup> & Gordon C. S. Smith<sup>3,4,9\*</sup>

RESEARCH

Open Access

## Lack of detection of a human placenta microbiome in samples from preterm and term deliveries



Jacob S. Leiby<sup>1</sup>, Kevin McCormick<sup>1</sup>, Scott Sherrill-Mix<sup>1</sup>, Erik L. Clarke<sup>1</sup>, Lyanna R. Kessler<sup>1</sup>, Louis J. Taylor<sup>1</sup>, Casey E. Hofstaedter<sup>2</sup>, Aoife M. Roche<sup>1</sup>, Lisa M. Mattei<sup>2</sup>, Kyle Bittinger<sup>2</sup>, Michal A. Elovitz<sup>3</sup>, Rita Leite<sup>3</sup>, Samuel Parry<sup>3\*</sup> and Frederic D. Bushman<sup>1\*</sup>



# Kolonisierung mit Mikrobiota beginnt bei der Geburt

Window of opportunity for microbiota modulation

## Prenatal factors:

- Placenta

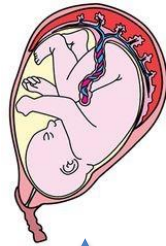
## Neonatal factors:

- Mode of delivery
- Gestational age

## Postnatal factors:

- Feeding: breast-milk vs. formula
- Geographical location
- Family members
- Host interactions
- Maternal diet
- Weaning

## Gestation



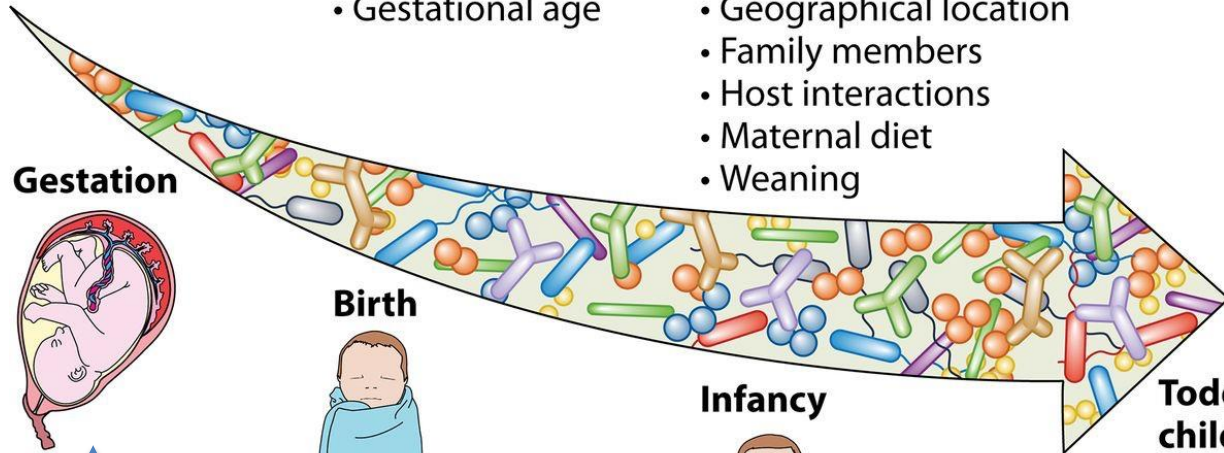
## Birth



## Infancy



## Toddler & childhood



Immunmediatoren ?

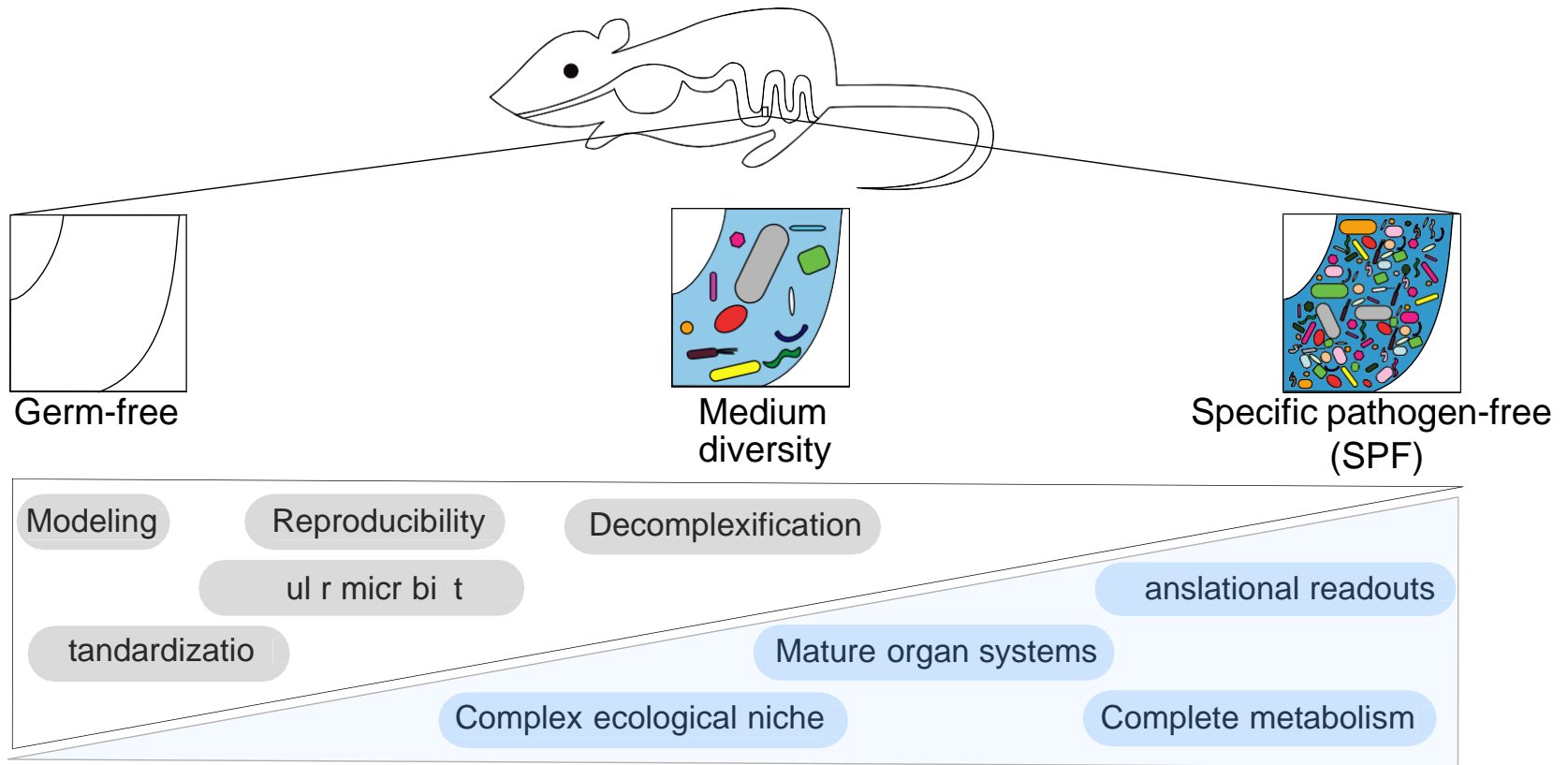
Metaboliten ?

MÜTTERLICHES MIKROBIOM

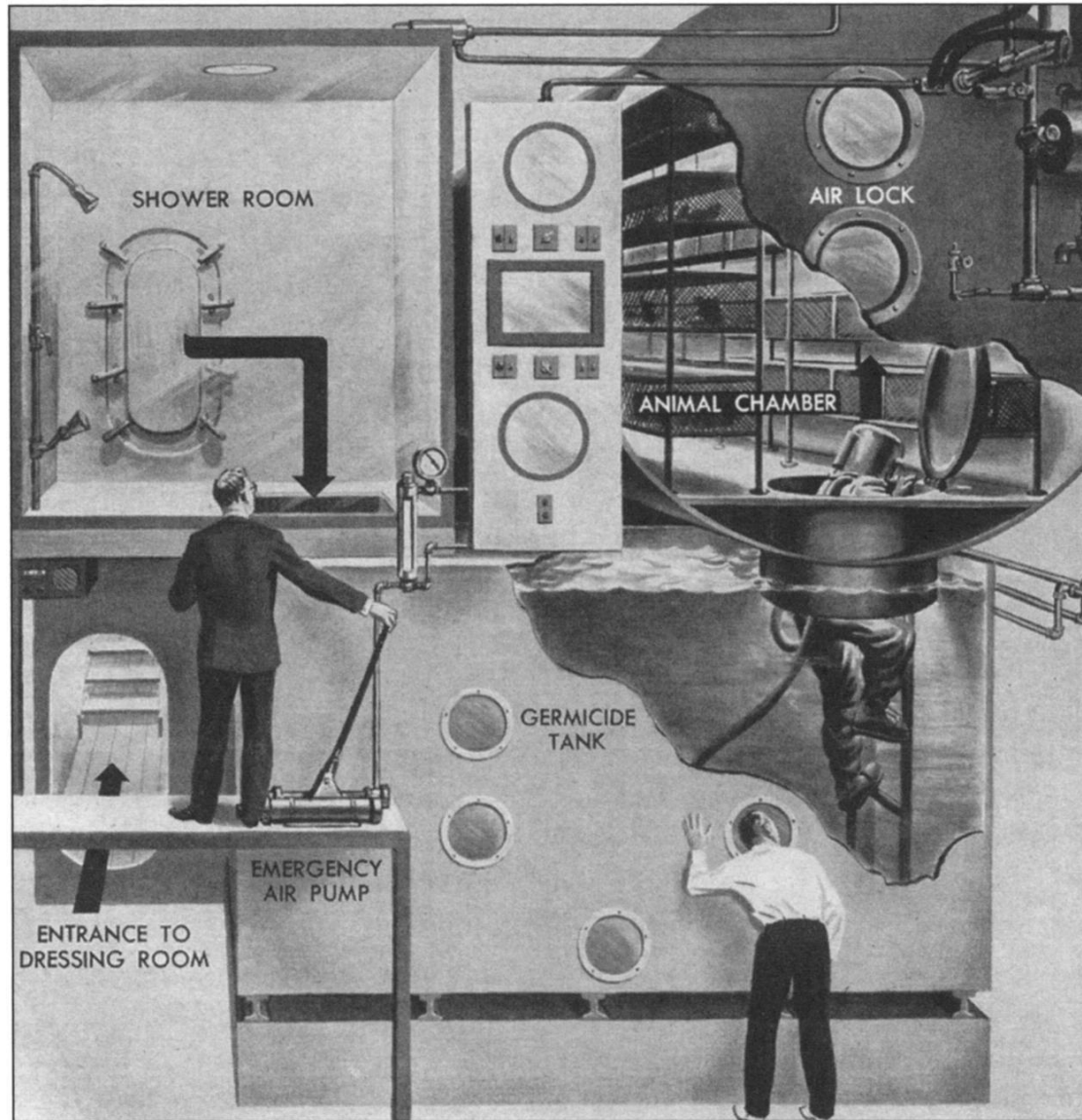
Ernährung / Lifestyle / Antibiotika

# Experimentelle Grundlagenforschung am Mikrobiom

## Arbeit mit keimfreien Mäusen



# Die ersten keimfreien Isolatoren



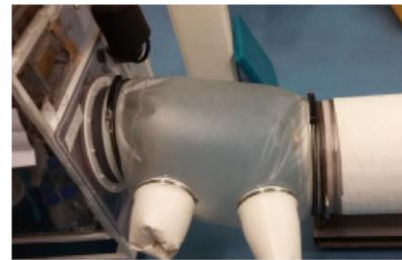
# Arbeit mit keimfreien Mäusen in der Clean Mouse Facility Bern



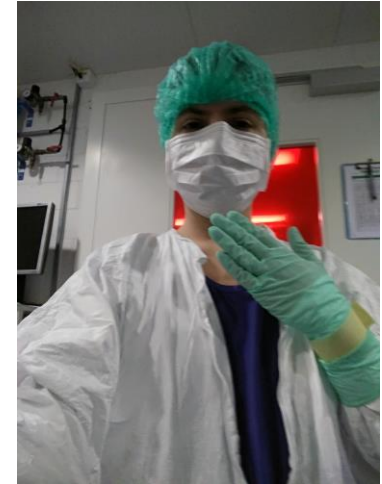
Autoklaviertes  
Wasser und Futter



Peressigsäure-  
sterilisation für 45  
Minuten



Isolator-Trommel-  
Verbindung

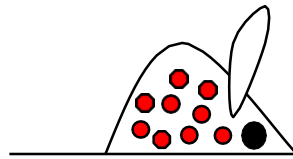


# Grundlagenforschung zum Einfluss des Mikrobioms auf das Immunsystem des Wirts

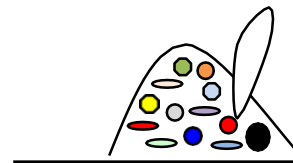
**Keimfreie Mäuse können unter definierten Bedingungen besiedelt werden**

1. Auf natürlichem Wege durch Zusammenleben mit einer besiedelten Maus  
**(Specific pathogen-free =SPF)**
2. Kontrolliert: **gnotobiotische Mäuse**

Monokolonisierung



Modelflora  
(bis zu 12 Bakterien)



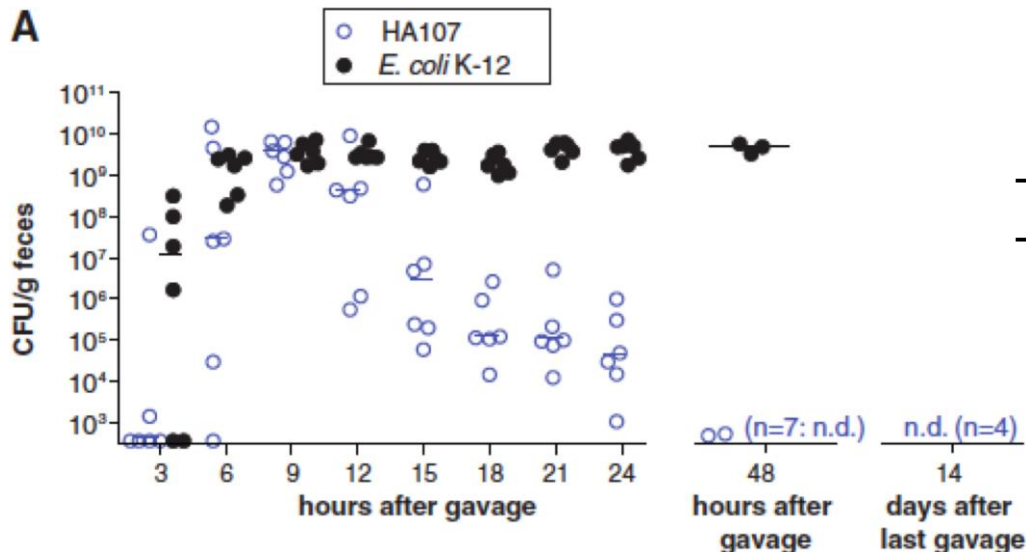
Reversible Kolonisierung



# Reversible Besiedlung keimfreier Mäuse mit *E. coli* Bakterium HA107



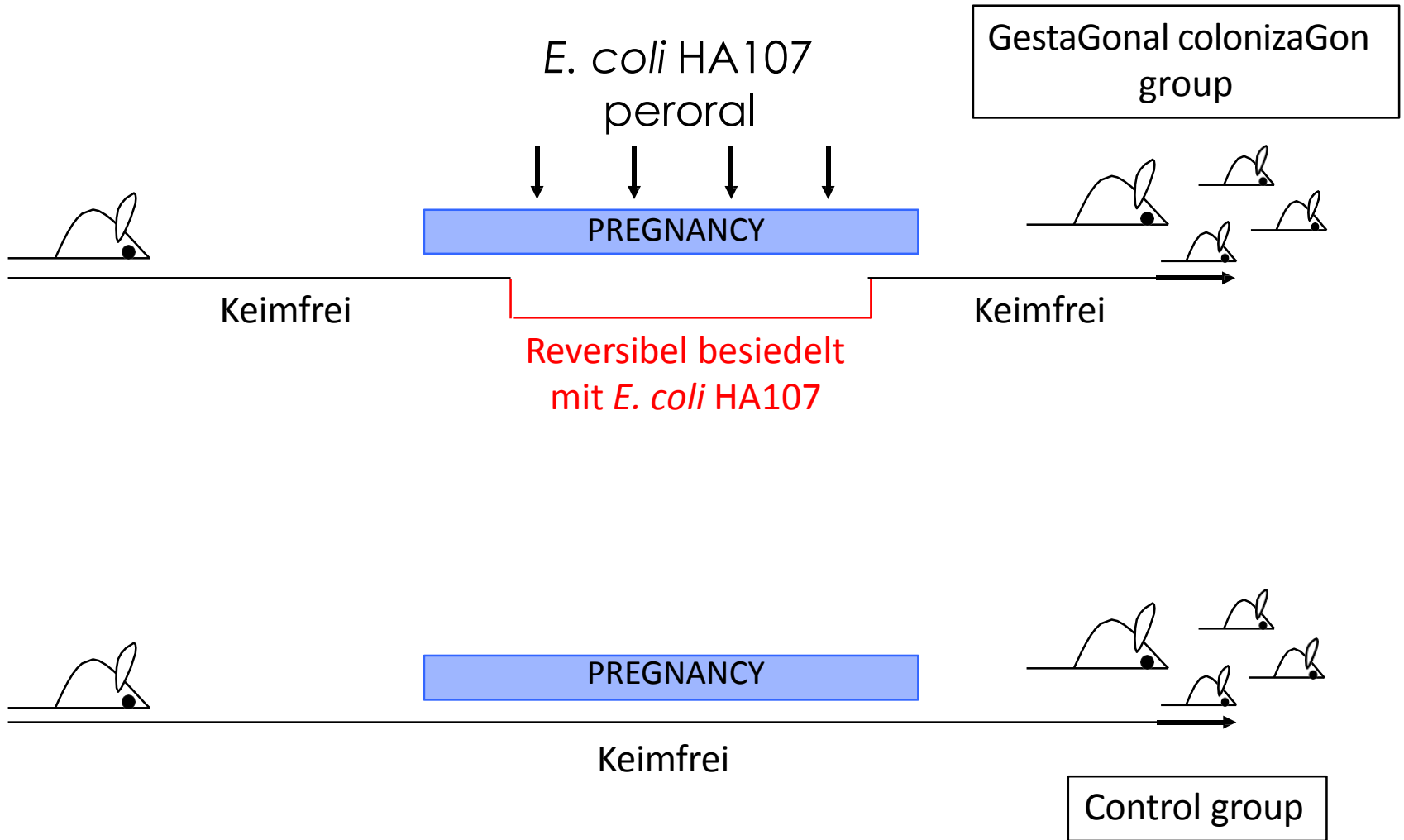
- *Escherichia Coli* K-12 JM83
- Defekt in der Synthese zweier Bestandteile der bakteriellen Zellwand (m-DAP und D-Ala)
  - Bakterien können sich in der Abwesenheit dieser zwei Stoffe nicht vermehren
  - Wachstumsmedium muss mit D-Ala und m-DAP ergänzt werden
  - Besiedelt keimfreie Mäuse für 24-48 Stunden



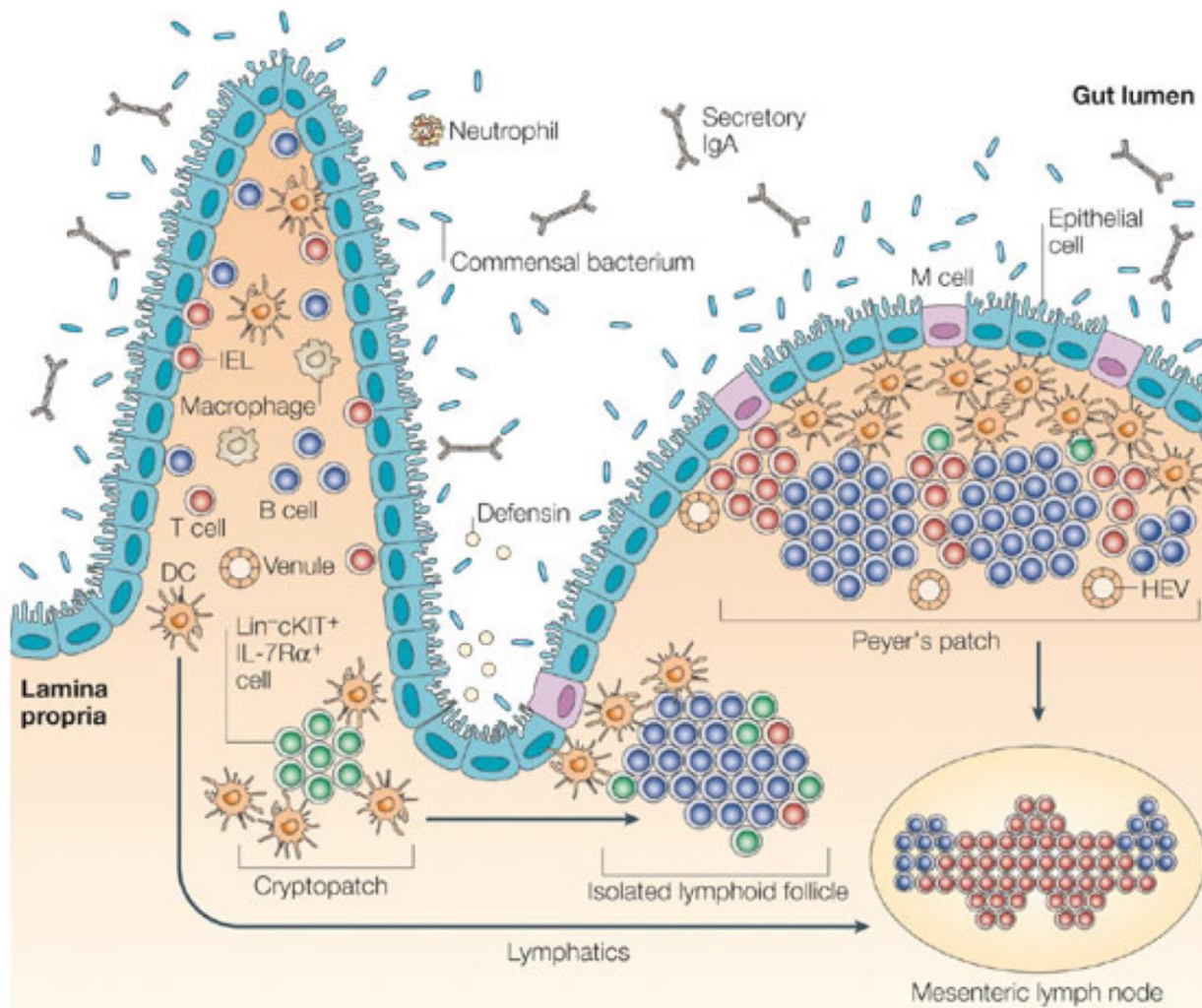
- Definierter Besiedlungszeitraum
- Definierte Bakterienmenge



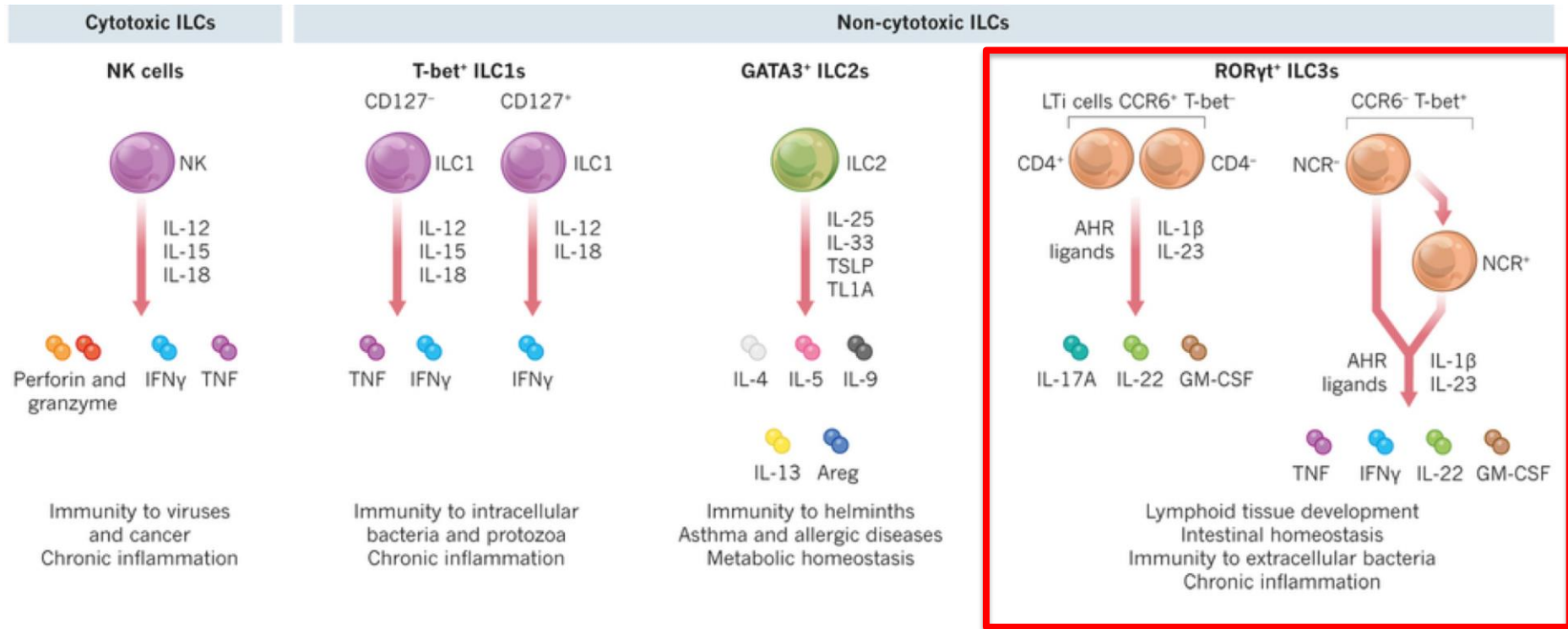
# Modell der Besiedlung während der Schwangerschaft



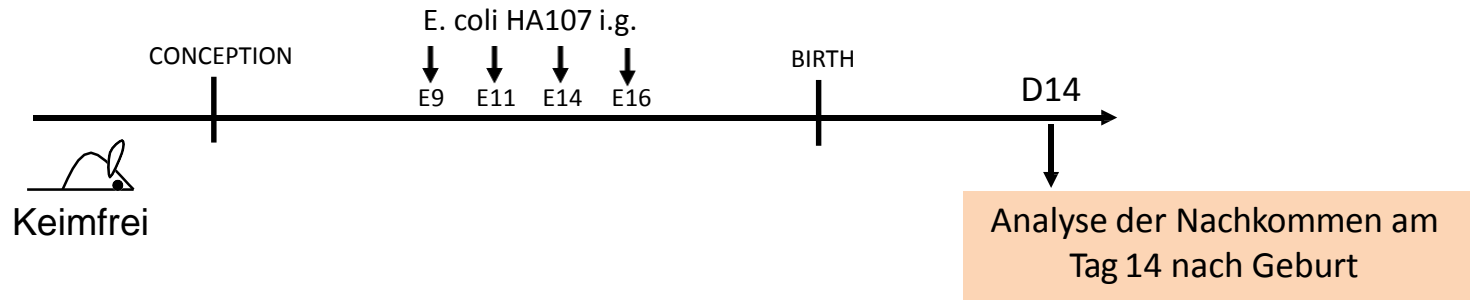
# Das Darmimmunsystem



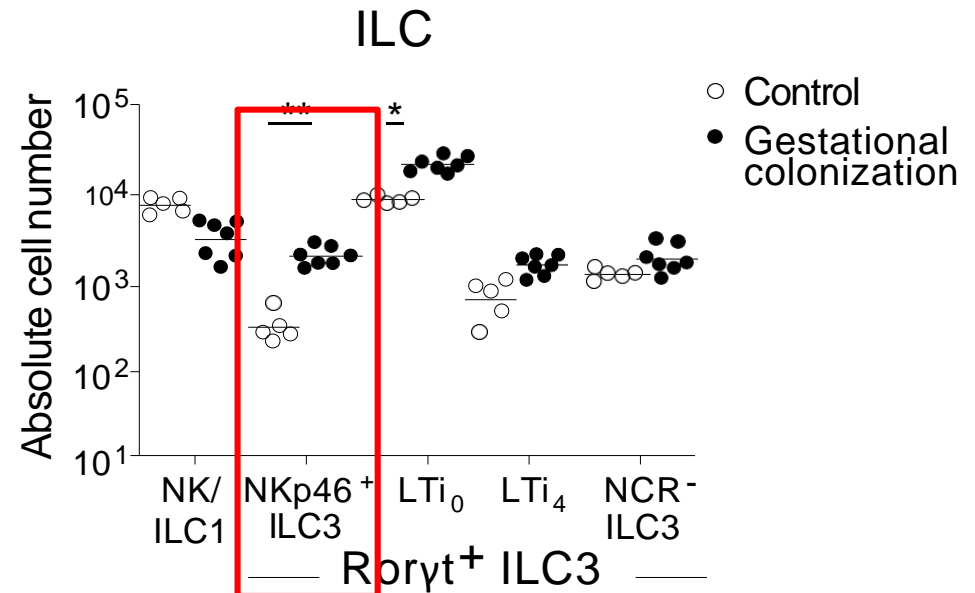
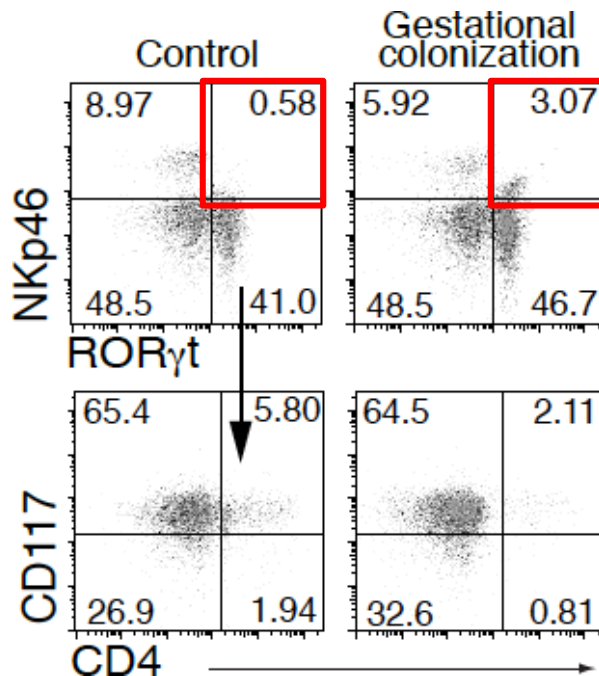
# Innate lymphoid cells (ILC) sind wichtige Effektorzellen des Immunsystems an Körperoberflächen



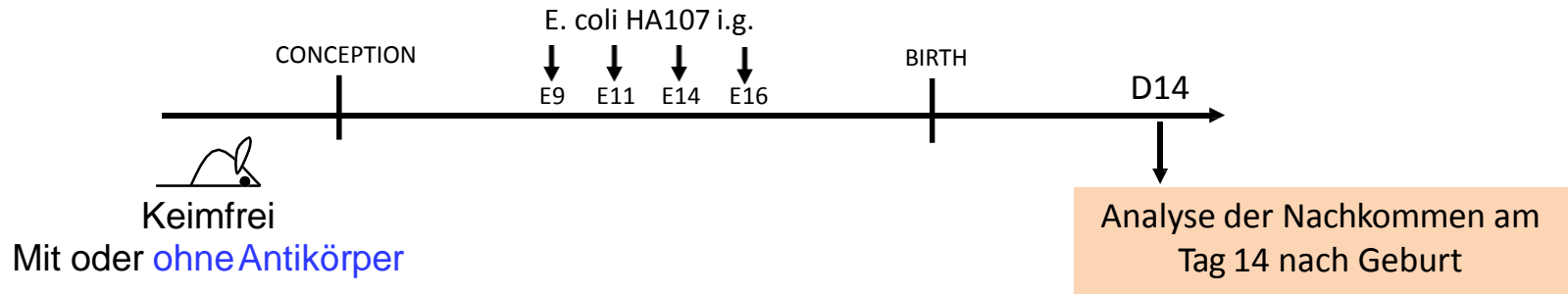
# Mütterliche Besiedlung während der Schwangerschaft wirkt sich positiv auf die Anzahl von ILC3 Zellen im Darm der Neugeborenen aus



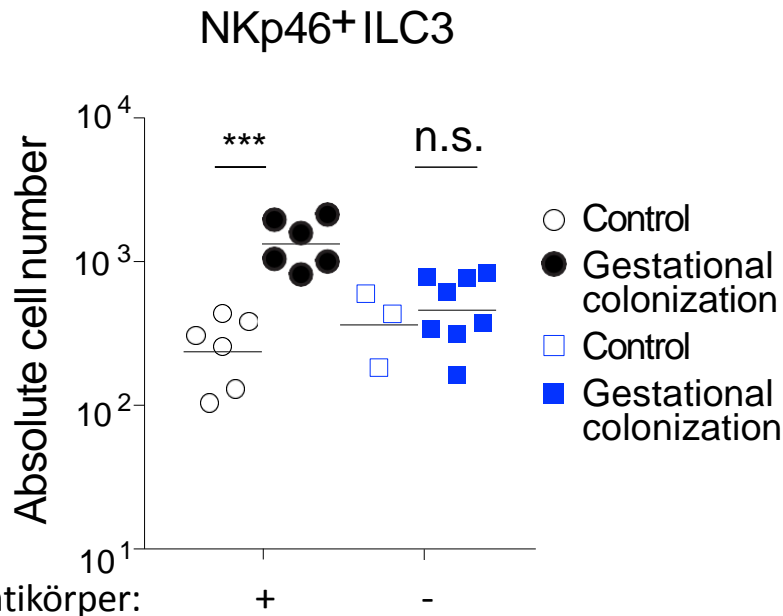
Immunezellen im Dünndarm der Nachkommen, Tag 14 nach Geburt:



# Mütterliche Antikörper spielen beim immunmodulatorischen Effekt der mütterlichen Darmflora eine Rolle



Immunzellen im Dünndarm der Nachkommen, Tag 14 nach Geburt:



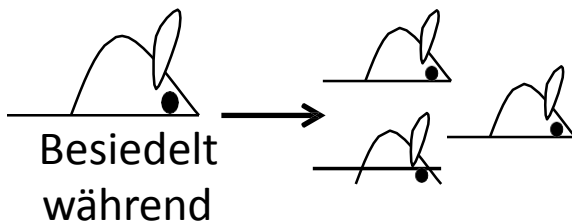
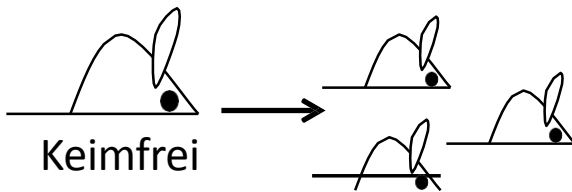
# Mütterliche Darmflora – Schutz bei Besiedlung der Neugeborenen mit natürlicher Darmflora nach der Geburt

Besiedlung mit  
kommensalem  
*E. Coli*

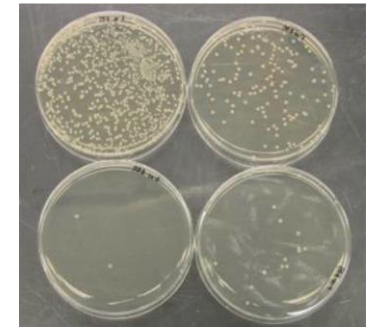
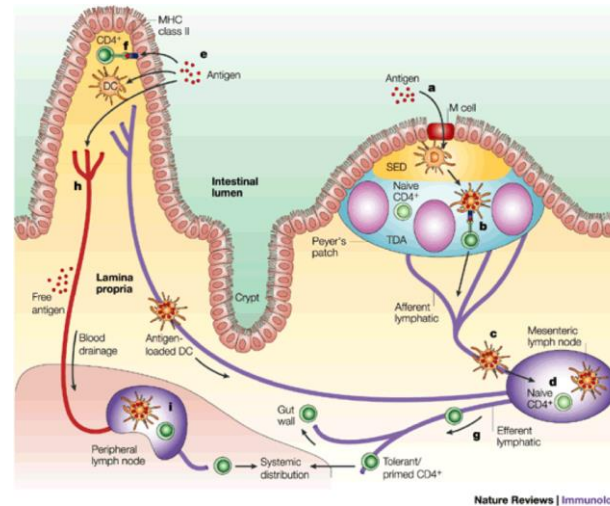


Mütter

Keimfreie  
Nachkommen



Schwangerscha?



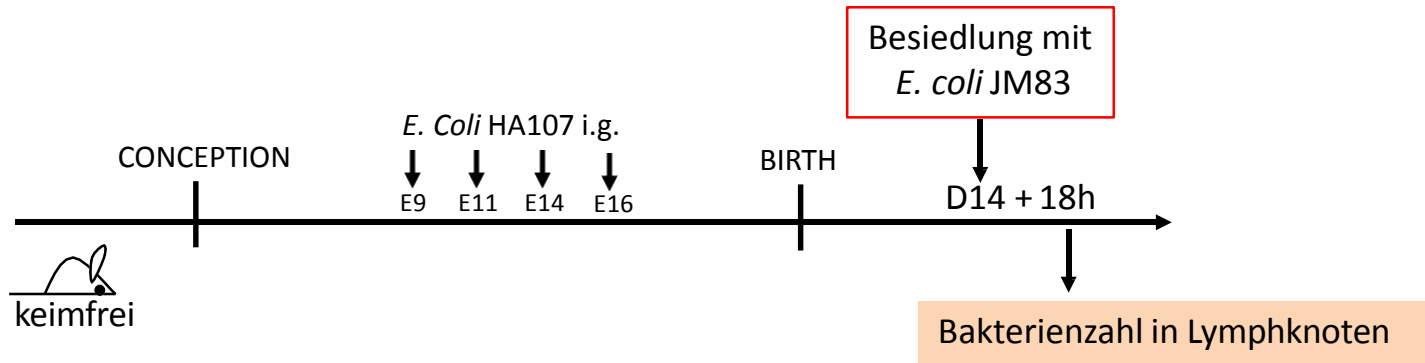
18h

Herausnehmen  
der  
mesenterialen  
Lymphknoten

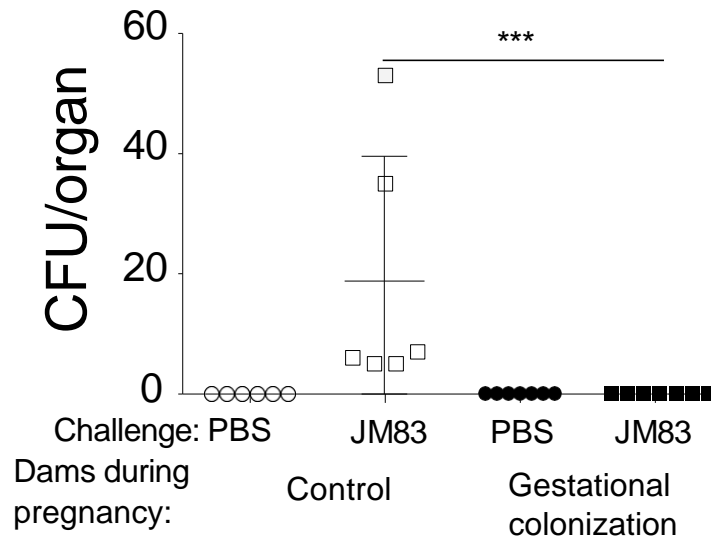


Bakterienzahl  
in  
Lymphknoten

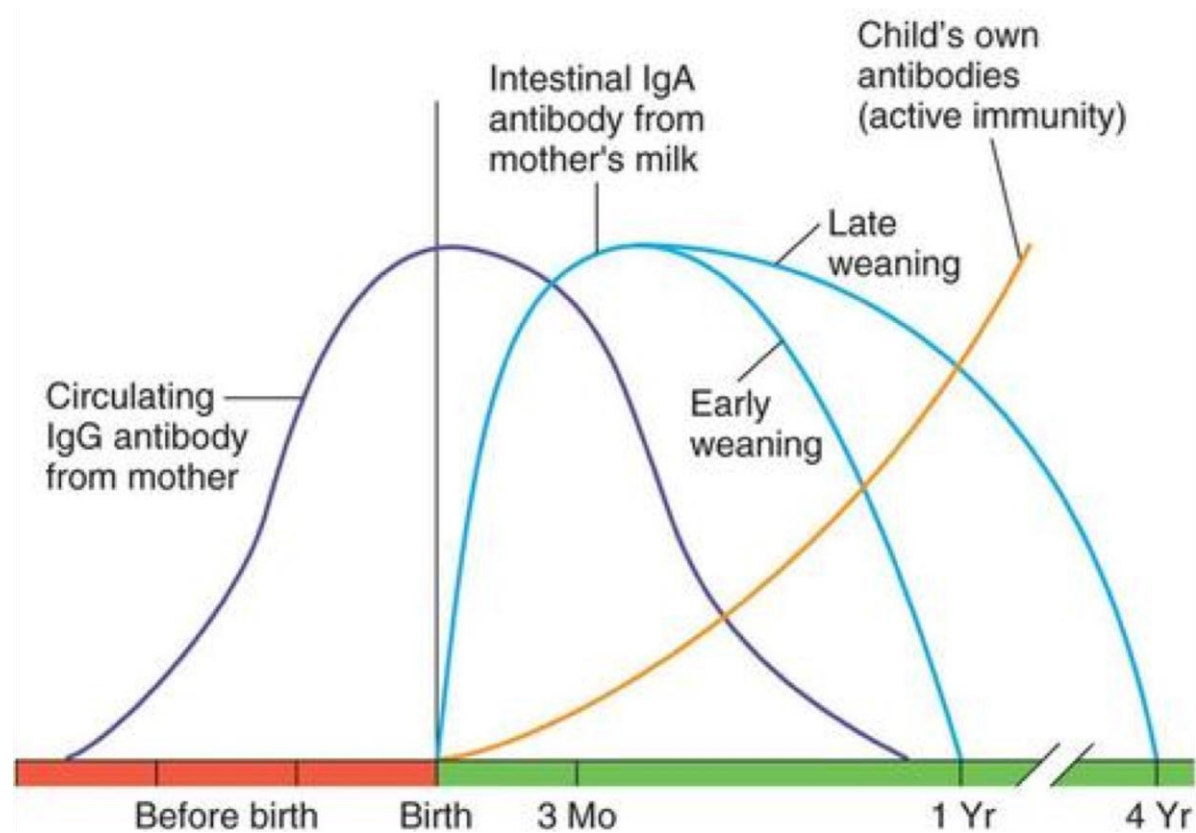
# Mütterliche Darmflora – Schutz bei Besiedlung der Neugeborenen mit natürlicher Darmflora nach der Geburt



## Bacteria translocation MLN *E. coli* JM83

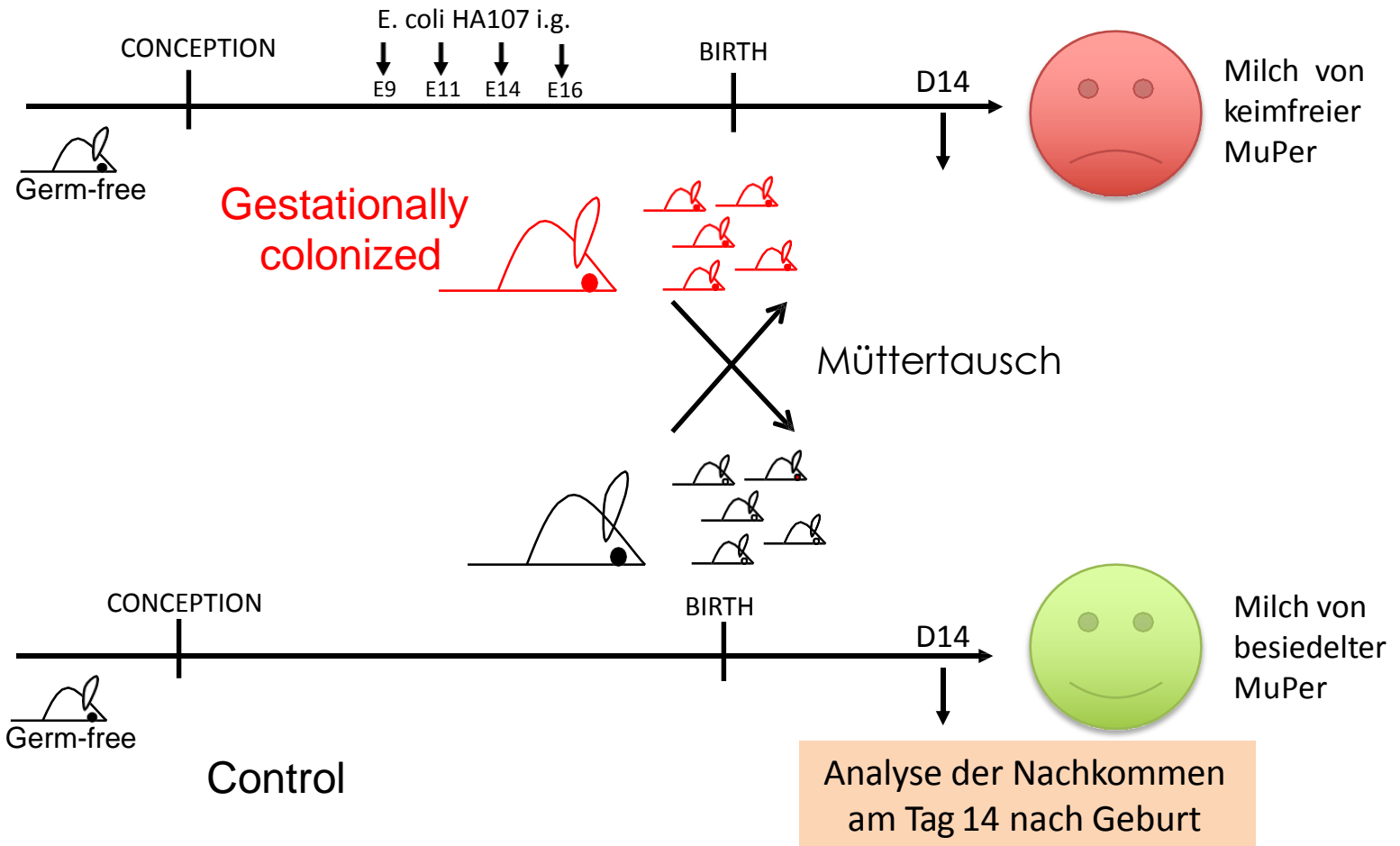


# Mütterliche Antikörper werden über Plazenta und Muttermilch an die Nachkommen übertragen



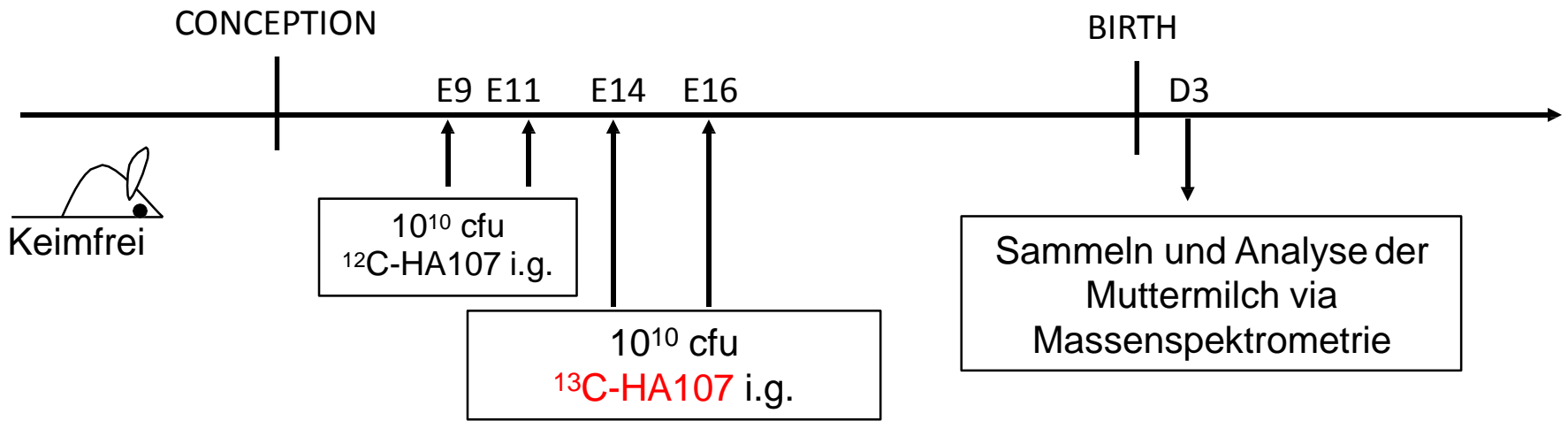


# Werden immunstimulierende Signale der mütterlichen Mikrobiota über die Plazenta oder über die Muttermilch übertragen?

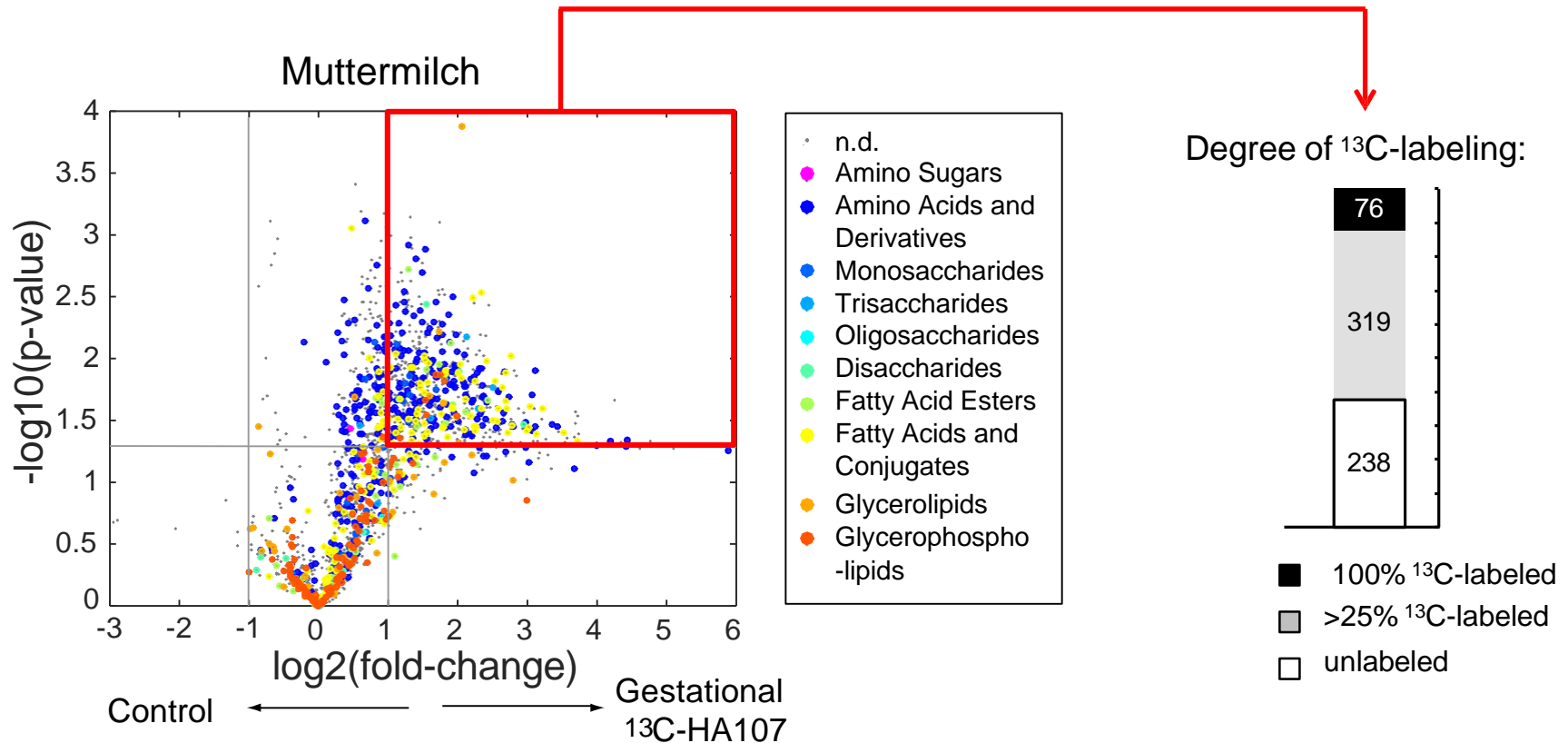


# Isotopenmarkierung von *E. coli* HA107 ermöglicht Nachweis bakterieller Produkte im mütterlichen und kindlichen Organismus

- *E. coli* HA107 wird mit dem schweren Kohlenstoffatom  $^{13}\text{C}$  markiert
- Nur 1 % aller Kohlenstoffatome in der Natur sind  $^{13}\text{C}$ , der Rest  $^{12}\text{C}$
- Nur Stoffwechselprodukte der mütterlichen Darmflora beinhalten ausschließlich  $^{13}\text{C}$ -Atome



# Besiedlung keimfreier Mäuse während der Schwangerschaft verändert die metabolische Zusammensetzung der Muttermilch



→ Bakterielle Metaboliten werden über die Muttermilch auf die Neugeborenen übertragen

# Muttermilch beinhaltet bakterielle immunstimulatorische Stoffwechselprodukte

Tissue	Compound	Sum formula	WT		JH/-	
			fold-change	p-value	fold-change	p-value
Milk	Kynurenine	[+10] C10H12N2O3	7.807	0.0325	2.529	> 0.05
	Indolelactic acid	[+11] C11H11NO3	6.790	0.0341	n.d.	
	5-Hydroxy-L-tryptophan	[+11] C11H12N2O3	5.248	0.0308	1.791	> 0.05
	Hydroxykynurenamine	[+9] C9H12N2O2	4.973	0.0278	0.974	> 0.05
	Hydroxykynurenine	[+10] C10H12N2O4	4.539	0.0406	1.457	> 0.05
	5-Methoxytryptamine	[+11] C11H14N2O	4.181	0.0380	1.190	> 0.05
	5-Methoxytryptophol	[+11] C11H13NO2	3.808	0.0109	1.235	> 0.05
	Indole-5,6-quinone	[+8] C8H5NO2	2.024	0.0019	1.307	0.0057
Neonatal liver	Hydroxykynurenine	[+10] C10H12N2O4	2.394	< 0.0001	1.679	0.0015
Neonatal spleen	Hydroxykynurenine	[+10] C10H12N2O4	2.754	< 0.0001	1.656	0.0015



Indole-3-carbinol



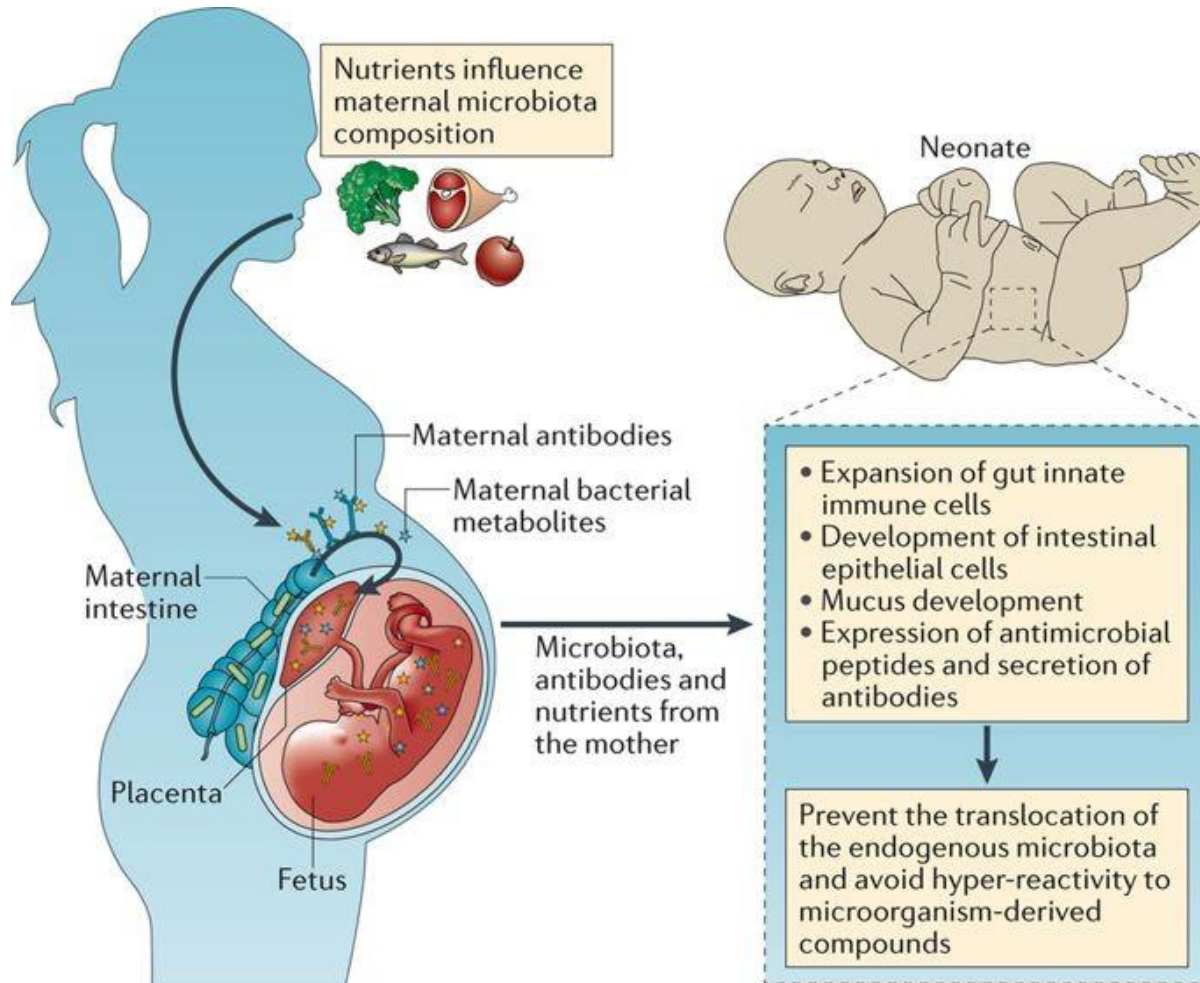
Füttern keimfreier Mäuse während Schwangerschaft mit Indole-3-carbinol



Reifung des neugeborenen Immunsystems

# Zusammenfassung

## Mütterliche Mikrobiota und Entwicklung des neugeborenen Immunsystems



Nature Reviews | Immunology

## Klinische Studie:

# “Trajectory of microbiota maturation in healthy Bern infants – a network approach”

Time ± tolerance interval	Enrollment	Days after birth		Weeks after birth							Years after birth	
		0-3 ±3	10 ±5	6 ±2	10 ±4	14 ±4	24 ±6	36 ±8	48 ±8	96 ±12	5 ±1	10 ±1
Information about the study	+											
Check inclusion/ exclusion criteria	+											
Signing of written informed consent	+											
Medical history	+											
Baseline questionnaire	+											
Follow-up questionnaire		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maternal stool samples	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maternal skin swab	+			+			+		+	+	+	+
Maternal milk samples, if nursing		+	+	+	+	+	+	+	+	+		
Infant stool samples		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Infant skin swabs		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

→ Rekrutierung von 120 Mutter-Kind-Paaren

→ Mikrobiotanalyse Mutter-Kind/Analyse der Milch/Krankheitsgeschichte Kind

*In collaboration with Benjamin Misselwitz and Christiane Sokollik (Inselspital Bern)*

# Danksagung



Andrew  
Macpherson



Mercedes  
Gomez de Agüero

Jakob Zimmermann  
Bahtiyar Yilmaz  
Sandra Rupp  
Hai Li  
Kathy McCoy  
Francesca Ronchi

Members of the  
Macpherson laboratory

Clean Mouse Facility, UniBe  
Jorum Kirundi  
Animal technicians

NGS Platform, UniBe  
Tosso Loeb  
Muriel Fragnière  
Sabrina Schenk

Bioinformatics Unit, UniBe  
Rémy Brugmann

ETH Zürich  
Uwe Sauer  
Tobias Fuhrer

