

Aus der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
Direktor: Prof. Dr. med. M. Zygmunt
der Universitätsmedizin der Universität Greifswald

Thema: *Fusobacterium nucleatum* beeinflusst Überleben,
Immunantwort und Invasion des Trophoblasten

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung des akademischen

Grades

Doktor der Medizin
(Dr. med.)

der

Universitätsmedizin

der

Universität Greifswald

2022

vorgelegt von:
Martha Eckhardt
geb. am: 22.12.1995
in: Cottbus

Dekan: Prof. Dr. med. Karlhans Endlich
1. Gutachter/in: Prof. Dr. med. Marek Tadeusz Zygmunt
2. Gutachter/in: Prof. Dr. med. Frauke von Versen-Höynck
Ort, Raum: Klinikum in Greifswald, Seminarraum N 0.03
Tag der Disputation: 08.05.2023

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	5
1.1. Entstehung der Schwangerschaft	5
1.2. Pathologien der Frühschwangerschaft	7
1.3. Trophoblast und maternales Immunsystem	8
1.4. Parallelen zwischen Trophoblasten und Karzinomzellen	9
1.5. Intrauterine Infektionen	10
1.6. Mikrobiom der fetomaternalen Einheit	11
1.7. <i>Fusobacterium nucleatum</i>	12
1.8. Ziele der Arbeit	14
2. Material und Methoden	14
2.1. Zelllinien und Bakterien	14
2.2. Untersuchung von Invasion und Migration	15
2.3. Viabilität, Apoptoserate und Zellzyklusanalyse	15
2.4. Zytokin- und Matrixmetalloproteinasensekretion	16
2.5. E-Cadherinexpression und Blockierung des Toll-like Rezeptor 4	16
2.6. Untersuchung der Toll-like Rezeptor 4 und E-Cadherin Signalwege	17
3. Ergebnisse	17
3.1. Geringe Mengen von <i>F. nucleatum</i> fördern die Invasion und beeinträchtigen die Migration nicht	17
3.2. Nur hohe <i>F. nucleatum</i> -Konzentrationen reduzieren die Viabilität und erhöhen die Apoptoserate von Trophoblasten	18
3.3. Die Stimulation mit <i>F. nucleatum</i> induziert in HTR8/SVneo die Sekretion Invasions-fördernder Faktoren, jedoch nicht in BeWo	19
3.4. Durch <i>F. nucleatum</i> -Stimulation ausgelöste IL-6-Sekretion wird durch Toll-like Rezeptor 4 Blockierung aufgehoben	19
3.5. <i>F. nucleatum</i> -Stimulation aktiviert in HTR8/SVneo den Toll-like Rezeptor 4/NF-κB Signalweg	20
3.6. E-Cadherin wird von BeWo und JEG-3 stärker exprimiert als von HTR8/Svneo	20

3.7. Hinweise für Unterschiede in der Aktivierung von β -Catenin durch <i>F. nucleatum</i> zwischen HTR8/SVneo und BeWo	21
4. Diskussion	21
4.1. Verbesserte Invasion durch <i>F. nucleatum</i>	21
4.2. Geringe Bakterienmengen werden toleriert	23
4.3. Übertragbarkeit auf Primärzellen	23
4.4. Die mögliche Rolle von E-Cadherin	26
4.5. Wie <i>F. nucleatum</i> die Immunantwort verändert	27
4.6. Limitationen	29
4.7. Ausblick	30
5. Zusammenfassung	32
6. Literaturverzeichnis	33
7. Publikation	45
8. Danksagung	61

1. Einleitung

Im Alter zwischen 20 und 50 Jahren ist jede beziehungsweise jeder Zehnte Deutsche ungewollt kinderlos [1]. Sind einige alleinstehend oder noch auf der Suche nach dem richtigen Partner, so befindet sich doch der Großteil (58%) der Deutschen mit aktuellem Kinderwunsch in einer festen Partnerschaft [2]. Bei etwa 20% der Paare kann trotz regelmäßiger ungeschützten Geschlechtsverkehrs über ein Jahr keine Schwangerschaft erreicht werden [3], was als Sterilität bezeichnet wird. Die ungewollte Kinderlosigkeit stellt ein wachsendes gesellschaftliches Problem dar, welches neben volkswirtschaftlichen Implikationen vor allem die Alltagswirklichkeit und existenziellen Lebensentwürfe von immer mehr Frauen und Männern betrifft [1].

Immer mehr Paare mit Kinderwunsch suchen daher medizinische Unterstützung. Die Reproduktionsmedizin kann dabei durch Diagnostik und Therapie bei ungewollter Kinderlosigkeit die natürliche Zeugung unterstützen. Alternativ kann die Befruchtung der Eizelle auch *in vitro* stattfinden. Wurden 2011 in Deutschland bereits etwa 15 000 Kinder, die durch künstliche Befruchtung entstanden sind, geboren, waren es 2015 schon über 20 000 [4]. Mittlerweile werden in Deutschland 3% aller Kinder mit *in vitro*-Fertilisation gezeugt [5]. Die Reproduktionsmedizin leistet somit einen wichtigen Beitrag den Wunsch nach einem eigenen Kind zu verwirklichen. Wichtig für den Erfolg der Reproduktionsmedizin sind dabei genaue Kenntnisse über die Vorgänge während der Schwangerschaftsentstehung und Erhaltung.

1.1. Entstehung der Schwangerschaft

Die Entstehung einer Schwangerschaft ist komplex und beginnt mit einer Eizelle und einem Spermium, welche zu einer befruchteten Eizelle fusionieren. Diese durchläuft mehrere Furchungsteilungen, bis sich am 4. Tag nach der Befruchtung eine Gruppierung der Zellen zeigt. Von der äußeren Zellmasse umgeben entsteht ein Hohlraum, in dem sich Flüssigkeit einlagert. Am Rande dieses Hohlraums befindet sich die Zellmasse, aus welcher sich der Embryo bildet. Die äußere Zellmasse dagegen bildet später den kindlichen Teil der Plazenta sowie Amnion und Chorion. Sie wird als Trophoblast bezeichnet.

Für eine erfolgreiche Implantation spielt das Endometrium eine entscheidende und aktive Rolle. Der Zeitraum der maximalen Aufnahmefähigkeit dauert ca. 4 Tage und

wird als Implantationsfenster bezeichnet [6]. Das Endometrium zeichnet sich währenddessen durch die Differenzierung der endometrialen Drüsen in einen Zustand starker Sekretion und die veränderte Produktion von Adhäsionsmolekülen der Zelloberflächen der luminalen Epithelien aus [7].

Die äußeren Trophoblastzellen treten in Kontakt mit diesen Epithelzellen des Endometriums. Es vollzieht sich dabei eine Differenzierung der Trophoblastzellen. Zum einen verschmelzen die Zellen auf der der Schleimhaut zugewandten Seite zu einem Synzytium, dem Synzytiotrophoblasten, wohingegen die zentraler gelegenen Zellen als Zytotrophoblast bezeichnet werden und stark proliferieren um neue Zellen für den nicht-proliferierenden Synzytiotrophoblasten bereitzustellen. Ist die Implantation abgeschlossen, wird der Embryo zunächst komplett vom Synzytiotrophoblasten umgeben [6].

Im Synzytiotrophoblasten befinden sich flüssigkeitsgefüllte Taschen, in die am 12. Tag nach der Befruchtung Zytotrophoblastzellen einwachsen [8]. Die Zytotrophoblastzellen wachsen in Form von Zellsäulen auch bis an die Dezidua, wo sie als Haftzotten die äußere Synzytiotrophoblastenschicht durchdringen [9]. Am 14. Tag nach der Befruchtung bildet sich aus konfluierenden Zytotrophoblastzellen der Haftzotten eine Hülle aus, die den Embryo samt kindlichem Teil der Plazenta umgibt [8]. Zytotrophoblastzellen, die diese Hülle verlassen und in die Dezidua einwachsen, werden als extravillöse Trophoblasten bezeichnet. Sie invadieren auch in die Endabschnitte der Spiralarterien [9]. Dort formen sie als endovaskuläre extravillöse Trophoblastzellen Propfen in den mütterlichen Spiralarterien um eine sauerstoffarme Umgebung zu erhalten [8].

Erst zwischen der 10. Und 12. Schwangerschaftswoche kommt es zur Auflösung der Propfen in den Gefäßlumen und mit der Blutzirkulation erhöht sich auch die Sauerstoffzufuhr [8]. Die extravillösen Trophoblastzellen bewirken zudem eine Umformung der uterinen Gefäße, sodass nach der Auflösung die Gefäße erweitert und weniger elastisch sind [10]. Durch den geringen Widerstand wird ein hoher Zufluss an mütterlichem Blut ermöglicht [8], welcher für die Versorgung des Kindes notwendig ist. Um den Nährstoffbedarf des Fetus zu decken, der für die Entwicklung essentiell ist, kommt es neben der Vasodilatation ebenfalls zur Neubildung von Gefäßen [11].

1.2. Pathologien der Frühschwangerschaft

Diese Prozesse werden von diversen Faktoren reguliert und sind wissenschaftlich noch nicht komplett verstanden [12]. Erfolgen die Invasion und die Gefäßmodulierung nicht adäquat, kann es zu Störungen der uterinen Blutversorgung kommen, welche mit verschiedenen Krankheiten wie Präeklampsie, Frühgeburtlichkeit und intrauteriner Wachstumsrestriktion assoziiert sind [9].

Die Präeklampsie ist beispielsweise eine Multisystemerkrankung, die durch schwangerschaftsinduzierte Hypertonie und Proteinurie definiert wird. Ihre Ursache liegt in der Plazenta, denn erst mit der Geburt dieser gehen die Symptome zurück [13]. Als Problem in der Plazenta wird eine immunologische Veränderung der Funktion des Trophoblasten vermutet [14]. Die Reduktion der Invasivität führt zu einem unzureichenden Gefäßumbau der Spiralarterien [9]. Die dadurch entstehende verminderte Perfusion und die erhöhte Flussgeschwindigkeit verändern die Funktion der Plazenta. Es kommt zu Stress- und Entzündungsreaktionen, welche die Erkrankung auslösen [14].

Als eine gefährliche Komplikation der Präeklampsie kann ein HELLP Syndrom auftreten [15]. Dabei kommt es zur hämolytischen Anämie, Erhöhung der Leberenzyme und Thrombozytopenie [13]. Die einzige kausale Therapie der Präeklampsie ist die Beendigung der Schwangerschaft durch frühzeitige Entbindung des Kindes [13]. Frühgeburtlichkeit ist jedoch mit einer Vielzahl an Komplikationen nach der Geburt verbunden. So treten häufiger Entwicklungsverzögerungen, chronische Lungenerkrankungen, Hörstörungen, Ventrikellblutungen, nekrotisierende Enterokolitiden, Rethinopathien und nosokomiale Infektionen auf [16].

Präeklampsie tritt weltweit bei 2,3 % der Geburten auf [17]. Die Verteilung ist allerdings nicht gleichmäßig, denn während sie in Europa selten vorkommt, tritt sie in Entwicklungsländern häufiger auf [18]. Präeklampsie ist zudem die Ursache für 10 % aller Frühgeburten unter der 35. Schwangerschaftswoche [19]. Bei einer Fehlentwicklung des Trophoblasten kann es, je nach Ausmaß der Störung, auch zu intrauteriner Wachstumsrestriktion (IUGR) oder zum Verlust der Schwangerschaft kommen [20].

Es besteht ein Zusammenhang zwischen intrauterinen Einflüssen auf das Kind und Erkrankungen, welche über das gesamte Lebensalter auftreten. Der gesundheitliche

Zustand des Kindes bei der Geburt beeinflusst auch dessen Anfälligkeit für Erkrankungen als Erwachsener. So ist ein geringes Geburtsgewicht mit erhöhtem Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen, Diabetes mellitus Typ 2, Adipositas und Depression verbunden [22]. Somit stellt eine gesunde Schwangerschaft mit bestmöglicher Entwicklung des Kindes einen wichtigen Grundbaustein für die Gesundheit im gesamten Leben dar.

1.3. Trophoblast und maternales Immunsystem

Eine wichtige Rolle bei der Schwangerschaftsentstehung und Erhaltung hat das mütterliche Immunsystem. Es tritt in Kontakt mit körperfremden Zellen und wird dabei in seiner Funktion moduliert. Der Synzytiotrophoblast, welcher die Plazentazotten umgibt, steht in direktem Kontakt zu maternalem Blut. Die extravillösen Trophoblastzellen wandern in den Uterus ein, wodurch auch sie in engem Kontakt zu maternalen Immunzellen stehen.

Insgesamt gibt es viele verschiedene Mechanismen, mit denen eine Immuntoleranz an der Grenze zwischen Mutter und Kind etabliert wird [22]. Lange Zeit ging man davon aus, dass bei der Schwangerschaft ähnlich einer Organtransplantation das Immunsystem unterdrückt werden müsse um die Schwangerschaft zu erhalten [23]. Es sind jedoch viele Immunzellen an der feto-maternalen Schnittstelle präsent. Am häufigsten nachweislich sind *innate lymphoid cells* mit verschiedenen Subgruppen wie natürlichen Killerzellen [24]. Auch Makrophagen, dendritische Zellen und T-Lymphozyten kommen vor [25]. Es wurde angenommen, dass mütterliche Immunzellen die Trophoblastzellen als körperfremde Zellen bekämpfen und somit eine Abstoßungsreaktion auslösen würden. Die Trophoblastzellen interagieren jedoch gezielt mit mütterlichen Immunzellen [26].

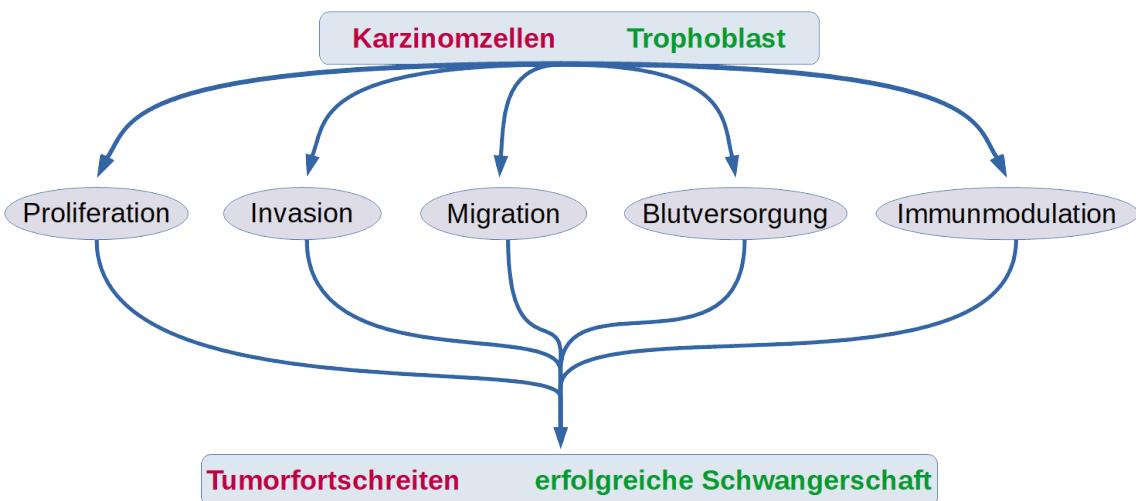
So weisen neue Daten darauf hin, dass über die Interaktion von bestimmten *innate lymphoid cells* mit Trophoblasten die Invasionstiefe reguliert wird [24]. Zudem sekretieren Trophoblasten Zytokine, welche Monozyten, die Vorstufe von Makrophagen, rekrutieren können, die über die Modulation der Umgebung wiederum die Invasion des Trophoblasten fördern [26]. Trophoblasten können folglich durch bakterielle Bestandteile indirekt über Immunzellen beeinflusst werden. Auch eine direkte Interaktion der Trophoblasten mit Bakterien ist dabei möglich. Sie sind nämlich selbst dazu fähig

Bakterienbestandteile zu erkennen und eine Immunantwort zu generieren. Dies gelingt ihnen unter anderem durch die Expression von Toll-like Rezeptoren [23].

1.4. Parallelen zwischen Trophoblasten und Karzinomzellen

Die Funktionen, die Trophoblastzellen erfüllen müssen, um eine physiologische Implantation zu ermöglichen, ähneln den Funktionen, die Karzinomzellen während ihrer Entartung ausüben [27]. So gibt es Gemeinsamkeiten zwischen malignen Karzinomzellen und dem Trophoblast: eine hohe Proliferationsrate, fehlende Zellkontakthemmung, die Schaffung einer Blutversorgung, Migrations- und Invasionspotential und die Modulation des Wirtsimmunsystems [27], [28]. Auch deshalb wird der Trophoblast als pseudo-maligne beschrieben.

Parallelen zwischen Trophoblasten und Karzinomzellen



Durch die Ähnlichkeit der Funktionen wird angenommen, dass Trophoblast- und Karzinomzellen gleiche molekulare Mechanismen nutzen [28]. Das Wachstumsverhalten von villösen oder extravillösen Zytotrophoblasten ist vergleichbar mit dem von Tumorzellen nach der neoplastischen Transformation, wobei es bei den erstgenannten streng reguliert und zeitlich begrenzt ist. So stoppt der Teilungsprozess bei extravillösen Zytotrophoblasten im Laufe der Differenzierung [27]. In migrierenden und invadierenden extravillösen Zytotrophoblasten sowie in Tumorzellen ist der Vorgang der Invasion kein bloßer passiver Druck aufgrund von Vermehrung der Zellmasse,

sondern ein aktiver Prozess [27]. Die Integrin-Expression verändert sich und der Verlust von E-Cadherin bewirkt eine verbesserte Motilität [28].

Beide sekretieren zudem Proteasen um sich in Geweben auszubreiten und können bei der Invasion in Gefäße einen vaskulären Phänotyp ausbilden [27], [28]. Auch in der Zytokinsekretion gibt es Gemeinsamkeiten zwischen Trophoblasten und Krebszellen [28]. Das Potential des starken Wachstums und der Invasion ermöglicht im Falle einer malignen Transformation eine Krebserkrankung, kann aber auch die erfolgreiche Einnistung eines Embryos und das Fortbestehen der Schwangerschaft bewirken [27]. Die Modulation der Immunantwort ist dabei sowohl für Krebszellen als auch Trophoblasten relevant [28].

1.5. Intrauterine Infektionen

Die Relevanz einer funktionierenden Immunregulation an der feto-maternalen Schnittstelle zeigt sich auch darin, dass die Schwangerschaft durch Infektionen gefährdet werden kann. So sind beispielsweise Frühgeburten häufig von intrauterinen Infektionen begleitet. Die Rate liegt dabei zwischen 22 und 38 % [29]. Es gilt folglich intrauterine Infektionen zu verhindern. Die Behandlung einer asymptomatischen Bakteriurie bei Schwangeren beispielsweise ist in Deutschland leitliniengerecht und reduziert Frühgeburten [30]. Im Kontrast dazu konnte für die Behandlung der bakteriellen Vaginosen bei Schwangeren kein Nutzen gezeigt werden [30]. Dies deutet darauf hin, dass Bakterienspezies und Menge für die Entstehung einer Pathologie relevant sind.

Der Mechanismus der Entstehung von intrauterinen Infektionen ist noch nicht abschließend geklärt. Es gibt verschiedene Theorien, wie die Bakterien die Amnionhöhle und den Fetus erreichen können [31]. Zum einen wäre eine aufsteigende Infektion aus Vagina oder Zervix möglich. Andererseits ist auch die Übertragung über das Blut durch die Plazenta denkbar. Die retrograde Infektion aus der Peritonealhöhle über die Eileiter wird ebenfalls diskutiert. Durch invasive Verfahren wie beispielsweise Fruchtwasseruntersuchung oder perkutane fetale Blutentnahme ist ebenfalls die Entstehung einer Infektion möglich [31].

1.6. Mikrobiom der fetomaternalen Einheit

Bei den vielfältigen immunmodulatorischen Vorgängen an der feto-maternalen Schnittstelle ist schwer vorstellbar, dass dieses Gleichgewicht auch bei einer bakteriellen Besiedlung aufrechterhalten werden kann. Da Bakterien in der Plazenta durch Infektionen die Schwangerschaft gefährden können, ging man lange davon aus, dass die Plazenta von gesunden Schwangerschaften steril sein müsse und das Vorhandensein von Bakterien negative Folgen habe [32]. Im Rahmen der Mikrobiomforschung ist diese Ansicht aber nun kritisch zu betrachten.

Der menschliche Körper wird von unzähligen Bakterien bevölkert. Als Beispiel seien hier die Darmbakterien genannt, die dem Menschen dabei helfen Nahrung zu verwerten, indem sie Ballaststoffe aufspalten [33]. Das wissenschaftliche Interesse an der Interaktion von Mensch und Mikroorganismus ist groß. Nach der Sequenzierung des kompletten menschlichen Genoms wuchs das Bestreben ebenfalls die Gesamtheit der Mikroorganismen, die den Menschen besiedeln, zu identifizieren und mehr Wissen über sie zu erlangen. Dazu wurde das "*Human Microbiome Project*" ins Leben gerufen, dessen Ziel es ist, die Mikroben über Sequenzierung zu Identifizieren und ihren Einfluss auf Gesundheit und Krankheit des Menschen zu untersuchen [34].

Die Kultivierung aus Proben ist nicht für alle Mikroben möglich [34]. Mit Hilfe der genetischen Sequenzen lassen sich aber auch nicht kultivierbare Mikroben nachweisen. Durch Analyse der Gene der 16S-ribosomalen Ribonukleinsäure (RNA) werden taxonomische Rückschlüsse gezogen, was auch im "*Human Microbiome Project*" genutzt wurde [34]. Die Gesamtheit aus den durch Sequenzierung nachgewiesenen Mikroben wird als menschliches Mikrobiom bezeichnet.

Auch das plazentare Mikrobiom wurde mit dieser Sequenzierungsmethode untersucht [35]. Ob es sich bei den so nachgewiesenen Bakterien um lebende, stoffwechselaktive Organismen handelt, ist durch diese Methode leider nicht nachzuweisen. Es könnten außer lebenden Bakterien auch nur Überreste von Bakterien oder Abschnürungen der äußeren Bakterienmembran (outer-membrane vesicles (OMVs)) sein [36].

Das plazentare Mikrobiom wird als Mikrobiom von geringer Menge beschreiben [35], [37]. Verglichen mit dem mütterlichen Mikrobiom der Mundhöhle und des Darms beträgt die RNA-Menge weniger als ein Drittel [37]. Da für die Analyse eine bestimmte Menge Desoxyribonukleinsäure (DNA) benötigt wird, welche bei zu geringer Menge der

Bakterien nicht erreicht wird, könnten einige Bakterien trotzdem nicht nachweisbar sein [38]. Eine mögliche Verunreinigung der Proben wird als Argument gegen die Existenz des plazentaren Mikrobioms aufgeführt [36], [39]. Ausführlich wird diese Thematik in einem Review von Briana *et al.* diskutiert [39].

Nach Bakterienstämmen gegliedert, fallen Ähnlichkeiten des plazentaren Mikrobioms mit dem mütterlichen oralen und dem mütterlichen Darmmikrobiom auf [37]. Dabei zeigt sich eine stärkere Übereinstimmung mit dem oralen Bakterienprofil [37]. Eine große Ähnlichkeit besteht auch mit dem oralen Mikrobiom nicht schwangerer Frauen [35].

In einem Mausmodell konnte in der Vergangenheit die gezielte Translokation von Bakterien, die ursprünglich aus der menschlichen Mundhöhle stammen und in die murine Blutbahn eingebracht wurden, in die Plazenta gezeigt werden [40], [41]. Im Falle einer Bakterämie wäre eine gezielte Verlagerung der Bakterien in die Plazenta somit auch beim Menschen denkbar.

Aagaard *et al.* kamen zu dem Schluss, dass das plazentare Mikrobiom über hämatogene Verbreitung von oralen Mikrobiota während der Plazentation entstehen kann [35]. Die These, dass das plazentare Mikrobiom nicht von nur von einer Quelle stammt, wurde von Gomez-Arango *et al.* aufgestellt. In einer Studie mit 37 Teilnehmerinnen konnte in allen Plazenten ein geringes Vorkommen von nicht-pathogenen Bakterien festgestellt werden [37]. Trotz der vielen Gemeinsamkeiten war die Zusammensetzung des plazentaren Mikrobioms bei einer taxonomischen Betrachtung einzigartig und ermöglichte die Abgrenzung der Proben [37]. Die Möglichkeit, dass Neugeborene schon vor der Geburt im Mutterleib von einer Quelle mit geringem Bakterienvorkommen - wie z. B. der Plazenta - besiedelt werden und sich die Zusammensetzung über die Dauer der Schwangerschaft ändert, wird diskutiert [42]–[44].

1.7. *Fusobacterium nucleatum*

Neben anderen Bakterien wird in gesunden Plazenten auch *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*) nachgewiesen [35], [45]–[49]. Es handelt sich dabei um ein gramnegatives, anaerobes Bakterium, welches am häufigsten in der Mundhöhle vorkommt [50]. Es kann die Permeabilität von Endothel erhöhen und sich so vermutlich hämatogen verbreiten [40]. Zusätzlich könnte es dabei auch anderen Bakterien eine

Passage des Endothels ermöglichen und so zu deren Verbreitung beitragen [51]. Im Mausmodell zeigt sich nach Injektion von *F. nucleatum* in den Blutkreislauf zudem eine Präferenz für die Plazenta als Besiedlungsort [52]. Eine gezielte hämatogene Verbreitung in die Plazenta ausgehend von der Mundhöhle wäre somit auch für den Menschen denkbar.

Auch bei unerwünschten Schwangerschaftsverläufen kann *F. nucleatum* nachgewiesen werden und wird daher mit Chorioamnionitis (Infektion von Eihäuten und Amnionflüssigkeit), Früh- und Fehlgeburt, neonataler Sepsis und Präeklampsie in Verbindung gebracht [53]. Es kommt auch im menschlichen Darm vor und wird dort mit der Entstehung von kolorektalen Karzinomen assoziiert [54]–[56]. Mehrere Studien zeigen, dass in kolorektalen Adenomen und Karzinomen *F. nucleatum* Konzentrationen höher sind als im gesunden Gewebe [57], [58]. Zudem ist eine größere Menge an *F. nucleatum*-DNA im Gewebe mit einem fortgeschrittenen Tumorgeschehen und einer schlechten Prognose assoziiert [54], [59]. Auch in Gewebe aus Mamma-, Pankreas- und Plattenepithelkarzinomen wurde *F. nucleatum* nachgewiesen [60]–[62].

F. nucleatum fördert *in vitro* Zellwachstum und Invasion von Kolonkarzinomzelllinien [59]. Im Mausmodell beschleunigt *F. nucleatum* das Fortschreiten von Brustkrebs und induziert in Kolonkarzinomzelllinien ein beschleunigtes Tumorwachstum und ein erhöhtes Tumorgewicht [59], [63]. Auch das Immunsystem wird durch *F. nucleatum* moduliert. Sie erhöhen in Tumoren die Anzahl von CD4T-Zell-hemmenden *myeloid-derived suppressor cells*, Granulozyten und tumor-assoziierten Neutrophilen [56]. Letztere sind wiederum an der Angiogenese und der Modulation der Immunumgebung von Tumoren beteiligt [64]. Zudem inhibieren *F. nucleatum* NK-Zellen, T-Helferzellen und zytotoxische T-Zellen [65]. In Endothelzellen wird durch *F. nucleatum* ebenfalls die Angiogenese gefördert indem vermehrt VEGF (*vascular endothelial growth factor*) freigesetzt wird und auch die Expression eines Rezeptors dafür erhöht wird [66]. *F. nucleatum* begünstigt somit die Entstehung und das Fortschreiten von Karzinomen indem Proliferation, Invasion und Angiogenese gefördert werden, während das Immunsystem herunterreguliert wird.

1.8. Ziele der Arbeit

Proliferation, Invasion, Angiogenese und Immunmodulation sind sowohl für das Fortschreiten von Karzinomen als auch die Entwicklung der Plazenta relevant [28]. Der förderliche Effekt von *F. nucleatum* auf diese Prozesse könnte ebenfalls die Plazentation unterstützen. Über gemeinsame molekulare Mechanismen von Trophoblasten und Karzinomzellen könnte durch *F. nucleatum* somit auch die Invasivität und das Wachstumsverhalten des Trophoblasten verbessert werden.

Wie geringe Bakterienmengen die Funktion des Trophoblasten beeinflussen wurde noch nicht untersucht. Auch die Rolle von *F. nucleatum* in gesunden Schwangerschaften sowie die Grenzpunkte, ab wann eine nicht-pathogene Bakterienbesiedlung zu einem Gesundheitsrisiko wird, sind bis jetzt noch nicht bekannt. In der Diskussion um die Existenz des plazentaren Mikrobioms stellt sich auch die Frage, ob eine physiologische Plazentation grundsätzlich mit dem Vorhandensein bakterieller Bestandteile vereinbar ist [67].

Wie geringe Bakterienmengen die Plazentation beeinflussen und unter welchen Umständen negative oder positive Auswirkungen auf die Funktion des Trophoblasten auftreten, sollte deshalb untersucht werden. Diese Arbeit wurde durchgeführt, um herauszufinden ob eine geringe Menge von *F. nucleatum* die Invasions- und Migrationskapazität des Trophoblasten steigern kann. Ebenfalls von Interesse waren der Einfluss von *F. nucleatum* auf Trophoblastwachstum und Proliferation. Auch die Immunreaktion des Trophoblasten sollte dabei untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1. Zelllinien und Bakterien

Für die Experimente wurden die Zelllinien HTR8/SVneo, JEG-3 und BeWo mit inaktivierten Bakterien (*F. nucleatum* bzw. *E. coli*) stimuliert.

HTR8/SVneo sind menschliche Trophoblastzellen des ersten Trimesters, die mit Hilfe des SV 40 large T antigen [68] immortalisiert wurden. JEG-3 und BeWo sind Zelllinien aus menschlichen Chorionkarzinomen [69], [70]. Die Zelllinien wurden wie beschrieben kultiviert [71].

F. nucleatum-Kulturen wurden uns freundlicherweise von Elsa Baufeld (Friedrich-Loeffler-Institut, Universitätsmedizin Greifswald) zur Verfügung gestellt. Als obligate Anaerobier wurden *F. nucleatum* durch Sauerstoffexposition für mindestens 72 h abgetötet [72]. Die *E. coli* wurden zur Abtötung in Ethanol inkubiert. *F. nucleatum*- und *E. coli*-Suspensionen wurden hergestellt [71].

2.2. Untersuchung von Invasion und Migration

Zur Analyse des Invasionsverhaltens wurden HTR8/SVneo für 6 h mit *F. nucleatum* (Verhältnis Bakterium zu Trophoblastzelle 0,01; 0,1; 1; 10) oder Lipopolysaccharid (LPS) (10 ng/mL) stimuliert. Anschließend wurden aus den Zellen Sphäroide gebildet und diese in Matrigel (10 mg/mL) eingebettet. Unter dem Mikroskop wurden nach 0, 24 und 48 h Fotos aufgenommen und das Einwachsen von Zellausläufern in den Matrigel darauf mit ImageJ Software analysiert [71]. Die Aussaat der Zellen und die *F. nucleatum*-Stimulation wurde freundlicherweise von Jens Ehrhardt (Universitätsmedizin Greifswald) übernommen. Die weiteren Schritte des Experimentes inklusive der Auswertung wurden dankenswerterweise von Rebekka Einenkel (Universitätsmedizin Greifswald) durchgeführt.

Der Einfluss von *F. nucleatum* bzw. *E. coli* (Verhältnis Bakterium zu Trophoblastzelle 0,01; 0,1; 1; 10) auf die Migration von HTR8/SVneo und BeWo wurde mit *scratch assays* untersucht. Zum Zeitpunkt 0 h und 12 h (HTR8/SVneo) bzw. 30 h (BeWo) wurden Bilder mit einem *live cell imaging* Mikroskop gemacht. Die von Zellen befreite Fläche wurde mit ImageJ software und dem MRI Wound Healing Tool macro gemessen. Die Differenz der freien Fläche zwischen dem Startpunkt und den Endpunkten wurde berechnet [71]. Die *scratch assays* mit BeWo wurden freundlicherweise von Jens Ehrhardt durchgeführt.

2.3. Viabilität, Apoptoserate und Zellzyklusanalyse

Für die Analyse von Viabilität, Apoptoserate und Zellzyklus wurden HTR8/SVneo, JEG-3 und BeWo für 2, 24 oder 48 h mit *F. nucleatum* (Verhältnis Bakterium zu Trophoblastzelle 0,1; 1; 10) inkubiert. Die Datenerhebung erfolgte mit CellTiter-Blue® Cell Viability Assay, FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit II und Propidiumiodidfärbung mit anschließender Durchflusszytometrie [71], [73].

2.4. Zytokin- und Matrixmetalloproteinasensekretion

Die Sekretion der Zytokine CXCL1, Interleukin-6, -8, -1 β und Matrixmetalloproteinases 2 und 9 durch HTR8/SVneo, JEG-3 und BeWo wurde mit *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) untersucht. Die Zellen wurden mit *F. nucleatum* (Verhältnis Bakterium zu Trophoblastzelle 0,01; 0,1; 1) oder *E. coli* (Verhältnis Bakterium zu Trophoblastzelle 1) stimuliert. Die Überstände wurden nach 2 h; 4 h; 8 h; 24 h oder 48 h gesammelt. Die ELISA wurden wie beschrieben durchgeführt [71].

2.5. E-Cadherinexpression und Blockierung des Toll-like Rezeptor 4

Die E-Cadherin-Expression der Zelllinien HTR8/SVneo, JEG-3 und BeWo wurde mit einem *In-Cell Western Assay* bestimmt. Dieser auch als *In-Cell ELISA* bezeichnete assay dient dem Nachweis von Proteinen in fixierten und permeabilisierten Zellkulturen. Diese werden mit Primär-Antikörpern inkubiert, die spezifisch an das entsprechende Protein binden. Daran binden anschließend die Sekundär-Antikörper, welche Farbstoff gekoppelt sind. Durch verschiedene infrarote Farbstoff-Konjugate können so durch Messung bei 700 nm und 800 nm zwei unterschiedliche Zielproteine quantifiziert werden.

Die Zellen wurden nach der Aussaat für 3 h bei 37 °C inkubiert, um ausreichendes Anwachsen zu gewährleisten. Anschließend erfolgte die Fixierung mit Formaldehyd und die Permeabilisierung mit kaltem Methanol. Nach der Blockierung mit Odyssey Blocking Buffer wurde der E-Cadherin Primär-Antikörper hinzugegeben und über Nacht bei 5 °C inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe des Sekundär-Antikörpers mit DRAQ5. Die Platte wurde für 60 min bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. Die Messung erfolgte mit dem Li-Cor Odyssey *Infrared Imager* bei 700 nm und 800 nm. Die Aufnahmen wurden mit Image Studio ausgewertet. Für eine detaillierte Beschreibung siehe [71].

Um den Einfluss von Toll-like Rezeptor 4 (TLR4) auf die Induktion der Sekretion von Interleukin-6 (IL-6) zu untersuchen wurde ein Experiment mit TLR4-blockierendem Antikörper und anschließender Messung der IL-6-Sekretion mittels ELISA durchgeführt. Die Zellen wurden nach der Aussaat für 30 min bei 37 °C inkubiert. PAb-hTLR4 wurde in zwei verschiedenen Konzentrationen dazu gegeben. Nach einstündiger Inkubation wurden *F. nucleatum* (Verhältnis Bakterium zu Trophoblastzelle 1) dazu gegeben. Die Überstände wurden nach 48 h gesammelt und die ELISA wie beschrieben durchgeführt

[71]. Die Experimente mit TLR4-blockierendem Antikörper wurden dankenswerterweise von Jens Ehrhardt durchgeführt.

2.6. Untersuchung der Toll-like Rezeptor 4 und E-Cadherin Signalwege

Mittels *multiplex assay* und Immunfluoreszenz wurden die nachfolgenden Signalwege von TLR4 bzw. TLR4 und E-Cadherin untersucht. Für ersteres wurden HTR8/SVneo und BeWo für 48 h mit *F. nucleatum* inkubiert und anschließend der *multiplex assay* wie beschrieben durchgeführt [71]. Zur Immunfluoreszenz Messung wurden die Zellen in kollagen G beschichtete μ -Slides inkubiert und verschiedene Inhibitoren der Signalwege gefolgt von *F. nucleatum* zugegeben. Nach 1 h wurden NF- κ B und β -Catenin angefärbt und die Immunfluoreszenz gemessen [71]. Die Durchführung beider Experimente sowie deren Auswertung wurde freundlicherweise von Jens Ehrhardt und Damián Muzzio (Universitätsmedizin Greifswald) übernommen.

3. Ergebnisse

3.1. Geringe Mengen von *F. nucleatum* fördern die Invasion und beeinträchtigen die Migration nicht

Invasion und Migration sind wichtige Funktionen des Trophoblasten um eine physiologische Plazentation zu gewährleisten. Inwiefern *F. nucleatum* das Invasions- und Migrationsverhalten von HTR8/SVneo beeinflusst, wurde mit einem *invasion assay* und einem *scratch assay* untersucht.

Die Invasion wurde durch geringe Bakterienmengen signifikant verstärkt. Dabei stieg die Invasivität mit der Bakterienkonzentration bis zu einem Verhältnis von einem Bakterium pro Trophoblastzelle an.(Figure 2A) Die Migration wurde von *F. nucleatum* Konzentrationen bis ein Bakterium pro Zelle nicht signifikant beeinflusst. Nur bei einem Verhältnis von 10 Bakterien pro Zelle kam es zu einer Reduktion der Migration.(Figure 2C) Bei einer vergleichenden Behandlung von HTR8/SVneo mit *E. coli* blieb auch bei einem Verhältnis von 10 Bakterien pro Zelle die Migration unbeeinträchtigt.

Der *scratch assay* wurde ebenfalls mit BeWo durchgeführt. Die Migration der BeWo Zellen wurde dabei weder durch *E. coli* noch durch *F. nucleatum*-Stimulation signifikant beeinflusst.(Figure 2E)

3.2. Nur hohe *F. nucleatum*-Konzentrationen reduzieren die Viabilität und erhöhen die Apoptoserate von Trophoblasten

Um die Viabilität der Zelllinien nach Stimulation mit *F. nucleatum* zu untersuchen wurde die Stoffwechselaktivität über den Umsatz von Resazurin zu Resorufin bestimmt. In HTR8/SVneo blieb die Stoffwechselaktivität nach 2 h *F. nucleatum* Stimulation unbeeinflusst, sank jedoch bei hohen Konzentrationen nach 24 und 48 h ab. JEG-3 zeigten nach 2 h *F. nucleatum*-Stimulation ebenfalls keinen Unterschied zu unstimulierten Zellen. Nach 24 und 48 h führte hier nur die höchste Konzentration von *F. nucleatum* zu einer Reduktion der Viabilität. In BeWo war der Stoffwechselumsatz durch *F. nucleatum* nach 2 h sogar erhöht. Nach 24 h bestand jedoch kein Unterschied mehr zwischen den stimulierten und unstimulierten Zellen. Hohe Konzentrationen führten auch bei BeWo nach 48 h zu einer verringerten Viabilität.(Figure 1A)

Mit Durchflusszytometrie wurde die Apoptoserate von HTR8/SVneo, BeWo und JEG-3 bestimmt. Schon nach 2 h konnten durch *F. nucleatum*-Stimulation vermehrt apoptotische HTR8/SVneo Zellen gemessen werden. Auch nach 24 h trat dieser Effekt bei allen mit *F. nucleatum* stimulierten Zellen auf. Nach 48 h war die Apoptoserate nur noch bei höheren Konzentrationen signifikant erhöht. In den JEG-3 Zellen wurde die Apoptoserate durch Stimulation mit *F. nucleatum* nicht beeinflusst. Die Apoptoserate der BeWo wurde nach 2 und 24 h durch hohe Konzentrationen erhöht.(Figure 1B)

Die Zellzyklusanalyse ergab einen durch *F. nucleatum* erhöhten Anteil von HTR8/SVneo in der G2/M-Phase. Bei JEG-3 and BeWo war hingegen der Anteil in der G0/1-Phase erhöht.(Figure 3B)

Die Zelllinien unterschieden sich somit in ihrer Reaktion auf *F. nucleatum*. Als Gemeinsamkeit kann jedoch hervorgehoben werden, dass hohe Konzentrationen die Viabilität nach 48 h herabsetzen, wohingegen geringe Konzentrationen keine Verringerung der Viabilität bewirken. HTR8/SVneo reagierten in Bezug auf Apoptose empfindlicher auf *F. nucleatum*-Stimulation als BeWo und JEG-3. Bei letzteren trat durch *F. nucleatum* ein Wachstumsarrest auf, wohingegen der Zellumsatz bei HTR8/SVneo stieg.

3.3. Die Stimulation mit *F. nucleatum* induziert in HTR8/SVneo die Sekretion Invasions-fördernder Faktoren, jedoch nicht in BeWo

Viele Faktoren beeinflussen die Immunumgebung während der Plazentation. CXCL1 spielt eine wichtige Rolle bei Entzündungsprozessen, Gefäßneubildung, Tumorentstehung und Wundheilung [74]. IL-6 ist ein pleiotropes Zytokin, welches Proliferation, Differenzierung und Überleben von Zellen beeinflusst. Es ist an Entzündungsprozessen und der Regulation des Immunsystems beteiligt [75]. Interleukin-8 (IL-8) ist ebenfalls an Entzündungsreaktionen beteiligt indem es Immunzellen rekrutiert und aktiviert [76]. Matrixmetalloproteinasen (MMP) zersetzen Proteine der extrazellulären Matrix und tragen so zu Tumorwachstum und Invasion bei [77].

In den Überständen von HTR8/SVneo, nicht aber von JEG-3, konnten mit ELISA CXCL1, IL-6, IL-8, MMP-2 und -9 nachgewiesen werden. In BeWo-Überständen waren IL-6 und MMP-2 nachweisbar. Der Einfluss von *F. nucleatum* und *E. coli* auf die Sekretion dieser Faktoren wurde untersucht. Hohe Konzentrationen von *F. nucleatum* und *E. coli* zeigten bei HTR8/SVneo eine Erhöhung von CXCL1, IL-6, IL-8 und MMP-9, wobei diese bei *F. nucleatum*-Stimulation erst zu einem späteren Zeitpunkt auftrat. Die MMP-2 Sekretion durch HTR8/SVneo wurde nur durch hohe *F. nucleatum*-Konzentrationen erhöht. *E. coli* beeinflusste die Sekretion nicht.(Figure 4)

Im Gegensatz zu erhöhter Sekretion in HTR8/SVneo bewirkte *F. nucleatum* in BeWo eine Verringerung der Sekretion von IL-6 und MMP-2. *E. coli* hatte hingegen keinen Einfluss auf die Sekretion von IL-6 und MMP-2 durch BeWo.(Figure 4B) Die Zelllinien reagierten mit gegensätzlichem Verhalten bezogen auf die Sekretion von IL-6 und MMP-2 auf *F. nucleatum*.

3.4. Durch *F. nucleatum*-Stimulation ausgelöste IL-6-Sekretion wird durch Toll-like Rezeptor 4 Blockierung aufgehoben

Um die Rolle von TLR4 in der Induktion der IL-6 Sekretion von HTR8/SVneo zu untersuchen wurde ein Experiment mit TLR4 blockierendem Antikörper und anschließender Messung der IL-6 Sekretion mittels ELISA durchgeführt. Der Antikörper alleine beeinflusste die IL-6-Sekretion durch HTR8/SVneo nicht. Stimulation mit *F. nucleatum* erhöhte die IL-6-Sekretion, wie in den vorherigen Experimenten gezeigt, aber

die Behandlung mit TLR4-blockierendem Antikörper konnte die Sekretion signifikant verringern.(Figure 5C)

3.5. *F. nucleatum*-Stimulation aktiviert in HTR8/SVneo den Toll-like Rezeptor 4/NF- κ B Signalweg

Die auch bei Stimulation mit LPS auftretende Erhöhung der IL-6 Sekretion von HTR8/SVneo läuft über den Toll-like Rezeptor 4/NF- κ B-Signalweg [78]. Im *multiplex assay* konnte gezeigt werden, dass nach *F. nucleatum*-Stimulation von HTR8/SVneo die I κ B Kinase α vermehrt in phosphorylierter Form vorlag.(Figure 5D) Diese ist ein nachgeschalteter Faktor der NF- κ B-Signaltransduktionskette [79] und weist so die Aktivierung des Toll-like Rezeptor 4/NF- κ B-Signalweges durch *F. nucleatum*-Stimulation nach.

Zudem wurde mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen, dass durch *F. nucleatum* in HTR8/SVneo eine Translokation von NF- κ B in den Zellkern stattfindet. Diese ließ sich durch vorherige Zugabe von Inhibitoren der TLR4-Interaktion verhindern. In BeWo wurde die I κ B Kinase α durch Stimulation mit *F. nucleatum* hingegen nicht aktiviert. (Figure 6)

3.6. E-Cadherin wird von BeWo und JEG-3 stärker exprimiert als von HTR8/SVneo

F. nucleatum fördert über die Interaktion mit E-Cadherin von Kolonkarzinomzellen deren Proliferation [55]. Da eine ähnliche Interaktion auch bei Trophoblastzellen möglich wäre sind die Unterschiede der Trophoblastzelllinien in der E-Cadherin-Expression relevant. Um die basale E-Cadherin-Expression der verschiedenen Zelllinien vergleichen zu können wurde ein *In-Cell Western Assay* durchgeführt.

Das durch E-Cadherin erzeugte Signal wurde auf die durch Zellkernfärbung mit DRAQ5 gemessene Zellmenge normalisiert. Die so ermittelte relative E-Cadherin Expression von JEG-3 war 10fach höher als die von HTR8/SVneo, die von BeWo 9fach höher. (Figure 5A)

3.7. Hinweise für Unterschiede in der Aktivierung von β -Catenin durch *F. nucleatum* zwischen HTR8/SVneo und BeWo

Die Interaktion von E-Cadherin mit *F. nucleatum* aktiviert den Transkriptionsfaktor β -Catenin [51]. In der Immunfluoreszenz konnte mehr β -Catenin in BeWo als in HTR8/SVneo nachgewiesen werden. Die Stimulation mit *F. nucleatum* hatte in HTR8/SVneo keinen Einfluss auf die Translokation von β -Catenin in den Zellkern. In BeWo bewirkte sie dagegen eine leichte, aber nicht signifikante Translokation, welche durch Einsatz eines β -Catenin Inhibitors aufgehoben werden konnte.(Figure 6)

4. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung des Einflusses von geringen Mengen *F. nucleatum* auf die Invasions- und Migrationskapazität, Wachstum, Proliferation und Immunreaktion des Trophoblasten. In den Experimenten wurden verschiedene Trophoblastzelllinien mit *F. nucleatum* bzw. *E. coli* behandelt. Da durch sequenzierungsbasierte Methoden nicht klarzustellen ist ob es sich bei dem plazentaren Mikrobiom um lebende, infektiöse Bakterien oder nicht infektiöse bakterielle Überreste oder OMVs handelt [36], wurden die Bakterien für die Versuche inaktiviert, da keine bakterielle Infektion untersucht werden sollte.

4.1. Verbesserte Invasion durch *F. nucleatum*

In den Ergebnissen des *invasion assays* zeigte sich eine Erhöhung der Invasionskapazität durch *F. nucleatum*. Jovanović-Krivokuća *et al.* wiesen für mit *E. coli*-LPS stimulierte HTR8/SVneo auch eine verstärkte Migration nach [80], welche bei Stimulation mit *F. nucleatum* jedoch nicht auftrat. Interessanterweise berichten Yoshida *et al.* für mit *Lactobacillus crispatus* stimulierte HTR8/SVneo ebenfalls von keiner Veränderung der Migration, aber einer verstärkten Invasion [81]. Bakterielle Bestandteile können Invasion und Migration des Trophoblasten folglich positiv beeinflussen.

Besonders kleine Konzentrationen von *F. nucleatum* konnten die Invasivität steigern. An der feto-maternalen Schnittstelle könnte somit die Plazentation unterstützt werden. Negative Folgen für die Schwangerschaft, die durch eine zu geringe Invasion des Trophoblasten bedingt sind, wie beispielsweise die Präeklampsie [14] könnten so

verhindert werden. Hervorzuheben ist, dass der förderliche Effekt nur bei geringen *F. nucleatum*-Konzentrationen auftrat. Hohe Konzentrationen hingegen wirkten sich negativ auf die Migration aus. Nicht das Vorhandensein der Bakterien an sich, sondern die Konzentration scheint für die Auswirkungen auf die Funktion des Trophoblasten und damit auch für die Plazentation entscheidend zu sein.

Die Migration in das Endometrium wird dem Trophoblasten durch Matrixmetalloproteininasen ermöglicht, welche die extrazelluläre Matrix zersetzen [82]. Die Sekretion von MMP-2 beeinflusst dabei die Invasivität des Trophoblasten [83]. Durch Stimulation mit *E. coli* wurde die Sekretion von MMP-2 durch HTR8/SVneo und BeWo nicht verändert. Dagegen bewirkte die Stimulation mit *F. nucleatum* bei BeWo eine Erniedrigung der MMP-2-Sekretion. Bei HTR8/SVneo erhöhten hohe Konzentrationen *F. nucleatum* die Sekretion von MMP-2 und könnten so die Invasion begünstigen. *F. nucleatum* muss aufgrund der Ergebnisse über einen Mechanismus die MMP-2-Sekretion beeinflussen, der bei *E. coli* nicht vorhanden ist.

Die erhöhte MMP-2-Sekretion passt zu der bei HTR8/SVneo beobachteten vermehrten Invasion durch *F. nucleatum*. Auch die verbesserte Invasion durch *Lactobacillus crispatus* wird mit einer erhöhten MMP-2-Sekretion durch HTR8/SVneo in Zusammenhang gebracht [81]. Die gegensätzlichen Effekte von *F. nucleatum* auf die MMP-2-Sekretion von HTR8/SVneo und BeWo könnten mit der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) zusammenhängen. In der Differenzierung des Zytotrophoblasten wird bei der Ablösung extravillöser Trophoblasten vom Zellverband am Ende der Haftzotten von einer epithelial-mesenchymalen Umwandlung ausgegangen [84]. Dabei wird aus einer polarisierten Epithelzelle, die normal einer Basalmembran aufsitzt und mit dieser interagiert, eine Zelle mit mesenchymalem Phänotyp [85]. Diese kann nun migrieren, invasiv einwandern und hat eine erhöhte Apoptoseresistenz [86]. Die Zelle kann sich somit aus dem Zellverband lösen und ihren Ursprungsort verlassen. Die Zellen können sich zum Teil auch anschließend wieder in epitheliale Zellen differenzieren [85].

Bei der EMT wird die Sekretion von Matrixmetalloproteininasen erhöht [87]. Speziell die Matrixmetalloproteininasen 2, 3 und 9 werden verstärkt exprimiert [84]. *F. nucleatum* induziert bei tierischen Keratinozyten eine EMT [88]. In Plattenepithelkarzinomzelllinien mit epithelialem Phänotyp werden sowohl durch lebende als auch inaktivierte *F.*

nucleatum EMT-Gene hochreguliert und die Invasion gefördert [61]. Inaktivierte *E. coli* verändern die Expression von EMT-Genen dagegen nicht [61]. Dies passt zur erhöhten MMP-2-Sekretion von HTR8/SVneo durch *F. nucleatum* im Vergleich zur unveränderten Sekretion durch *E. coli*. Auch bei HTR8/SVneo könnten somit speziell durch *F. nucleatum* invasive, mesenchymale Funktionen unterstützt werden.

4.2. Geringe Bakterienmengen werden toleriert

HTR8/SVneo reagierte bezogen auf Wachstum und Apoptose empfindlicher als JEG-3 und BeWo auf die Stimulation mit *F. nucleatum*. In BeWo erhöhten nur große Bakterienmengen die Apoptoserate, weshalb hier von einer Abhängigkeit von der Bakterienmenge auszugehen ist. Auch vermehrte Apoptose wirkte dabei nicht grundsätzlich negativ auf das Migrationspotential, da trotz erhöhter Apoptoserate die Migration von BeWo nicht und die von HTR8/SVneo teilweise nicht beeinträchtigt wurden. Die Apoptoserate durch *F. nucleatum*-Stimulation blieb in JEG-3 unbeeinflusst. JEG-3 ist damit am resistentesten gegen negative Auswirkungen von *F. nucleatum* auf das Zellüberleben. In Experimenten mit dieser Zelllinie zeigten bereits Equils *et al.* unter direkter LPS-Stimulation keine Apoptoseinduktion [89]. Gleichermaßen stellten Abrahams *et al.* für primäre Trophoblastzellen aus dem 1. Trimester fest [90].

Wie primäre Trophoblastzellen auf die Stimulation mit geringen Mengen inaktivierten *F. nucleatum* reagieren würden, kann nur spekuliert werden. Die Ergebnisse aus den eben aufgeführten Experimenten und denen von Abrahams *et al.* lassen aber die Vermutung zu, dass *F. nucleatum* keine negativen Auswirkungen auf das Zellüberleben primärer Trophoblastzellen haben könnte.

4.3. Übertragbarkeit auf Primärzellen

Um zu ermitteln ob die Ergebnisse der Experimente auf primäre Zellen übertragbar sein könnten, muss auch der Ursprung der verwendeten Zelllinien und die damit verbundenen Unterschiede betrachtet werden. BeWo und JEG-3 sind Chorionkarzinomzelllinien [69], [70], HTR8/SVneo hingegen ist aus immortalisierten Primärzellen entstanden [68]. Für JEG-3 wurden humane Tumorzellen in Hamster und später in die Kultur in Kulturmedium überführt. Nach einer Selektion einzelner Klone wurden diese Zelllinien erneut in Hamster implantiert. Anschließend erfolgte wieder eine

Selektion, bei welcher die JEG-3 Zelllinie entstand [69]. Die BeWo Zelllinie entstand ebenfalls aus Chorionkarzinomzellen, die einer Metastase entnommen und zunächst in Hamstern kultiviert wurden. In verschiedenen Experimenten setzte sich eine Zelllinie mit Ursprung in einer einzelnen Tumorkolonie durch, welche in ihren Eigenschaften dem undifferenzierten Zytotrophoblasten entspricht [70].

HTR8/SVneo dagegen entstand aus Trophoblastzellen im ersten Trimester, die aus Gewebe von Schwangerschaftsabbrüchen gewonnen wurden. Die Zellen wurden isoliert, selektiert und kultiviert. Mit Elektroporation wurde ein Plasmid eingebracht, welches die Gene des “simian virus large T antigen” trug. Die Zellen bei denen der Gentransfer erfolgreich war, trugen nun die Fähigkeit der unbegrenzten Proliferation [68]. Sie ähneln weiterhin stark den elterlichen nicht transfektierten Zellen, welche allerdings im Kontrast zu den transfektierten Zellen nach 12 Passagen die Teilung einstellen [68]. Da HTR8/SVneo aus Primärzellen entstanden sind, könnte bei ihnen in Experimenten im Vergleich zu Chorionkarzinomzelllinien eine größere Übereinstimmung mit primären Trophoblastzellen vermutet werden.

Neben dem Ursprung der Zellen ist auch die Genexpression ein wichtiges Kriterium. Suman *et al.* zeigen für HTR8/SVneo verglichen mit JEG-3 in der Genexpression bei vielen potenziell invasiven Molekülen eine stärkere Expression. Auch *in vitro* kann in Experimenten eine höhere Invasivität gezeigt werden. HTR8/SVneo entspricht damit eher dem extravillösen Trophoblasten [91]. Verglichen mit Primärzellen zeigen aber sowohl Chorionkarzinomzelllinien als auch durch Transfektion immortalisierte Zelllinien ein verändertes Genexpressionsprofil [92].

Mit bioinformatischer RNA Analyse untersuchten Bilban *et al.* verschiedene Trophoblastzelllinien und Proben von Zytotrophblast und extravillösem Trophoblast auf die Expression von 14 000 RNAs. Die mit “large T antigen” transfizierten Zelllinien HTR8/SVneo und SGHPL-5 bilden dabei eine Gruppe, die sich von den Chorionkarzinomzellen BeWo, JEG-3 und ACH-3P abgrenzt. Beide Gruppen zeigen jedoch eine ähnliche Distanz zum RNA-Expressionsmuster von primären extravillösen Trophoblastzellen. Es lassen sich insgesamt die drei Gruppierungen Primärzellen, Karzinomzellen und SV40-transfizierte Zellen darstellen. Daraus wird geschlossen, dass durch die Tumorentstehung bzw. Transfektion mit “large T antigen” eine deutliche Veränderung der Genexpression auftritt. Mit der Transfektion von extravillösen

Trophoblastzellen geht so auch die Induktion eines mesenchymalen Genotypes einher [92].

Von einer EMT wird jedoch auch in der Differenzierung des Zytotrophoblasten bei der Ablösung extravillöser Trophoblasten vom Zellverband ausgegangen [84]. Vergleichbar zu Zellveränderungen während der embryonalen Entwicklung, der Wundheilung und auch der Metastasenbildung von Tumoren werden die epithelialen Zytotrophoblastzellen dabei zu invasiven, mesenchymalen extravillösen Trophoblastzellen [85]. Die Induktion mesenchymaler Eigenschaften durch die Transfektion von extravillösen Trophoblastzellen stellt somit möglicherweise einen Vorteil dieser Zelllinien dar. Die Analyse von Genen, welche typisch für extravillöser Trophoblastzellen sind, erbringt jedoch keine Zelllinie mit besonderer Nähe zu extravillösen Trophoblasten in Abgrenzung zu Zytotrophoblasten [92].

HTR8/SVneo, BeWo und JEG-3 sind alle häufig verwendete Zelllinien um die Invasion von extravillösen Trophoblasten zu untersuchen [93]. Im direkten Vergleich stimmen "large T antigen" transfizierte extravillöse Trophoblastzellen mit primären Zellen (extravillösen Trophoblasten und Zytotrophoblasten) weniger in der Genexpression überein als Karzinomzelllinien [92]. Daraus ziehen Bilban *et al.* den Schluss, dass Chorionkarzinomzelllinien für Experimente bezüglich Motilität und Invasion bevorzugt genutzt werden könnten [92]. Interessant wäre deshalb eine Wiederholung des Invasionsexperimentes mit BeWo oder JEG-3. Ob jedoch beispielsweise auch relevante genregulatorische Mechanismen in den Chorionkarzinomzelllinien erhalten geblieben sind, sollte vor einer abschließenden Beurteilung noch erforscht werden.

Die Möglichkeit einer Veränderung der Genexpression durch Kultivierung auf extrazellulärer Matrix, wodurch diese den Primärzellen ähnlicher werden könnte, sollte nach Bilban *et al.* ebenfalls bedacht werden. Analog dazu wird auch auf die Möglichkeit der Beeinflussung der Genexpression der Primärzellen durch die vor der Analyse erfolgte Kultivierung hingewiesen [92]. Novakovic *et al.* untersuchten die Methylierungsprofile verschiedener Trophoblastzelllinien verglichen mit Zytotrophoblasten und extravillösen Trophoblasten des ersten Trimesters. Alle Zelllinien zeigen eine höhere Methylierungsrate als die Primärzellen. BeWo und JEG-3 bilden auch hier eine Gruppierung mit anderen Chorionkarzinomzelllinien. HTR8/SVneo zeigt

im Methylierungsprofil mehr Nähe zu soliden Tumoren als zu Chorionkarzinomzelllinien oder Primärzellen [94].

Zusammenfassend grenzen sich die Zelllinien alle von den Primärzellen ab und stellen nur ein Modell des Trophoblasten dar. Durch gezielte Auswahl von möglichst mehr als einer Trophoblastzelllinie für die entsprechenden Untersuchungen können jedoch wesentliche Daten gesammelt werden, welche nachfolgend mit Primärzellen bestätigt werden sollten [93]. Wie empfindlich primäre Trophoblastzellen auf eine Stimulation mit *F. nucleatum* reagieren würden lässt sich folglich nicht sicher vorhersagen und sollte noch experimentell untersucht werden. Durch die Verwendung von sowohl Chorionkarzinomzelllinien als auch immortalisierten Zellen lässt sich jedoch ein möglichst breites Spektrum an möglichen Auswirkungen zeigen.

4.4. Die mögliche Rolle von E-Cadherin

Wie bereits erwähnt wird *F. nucleatum* auch mit der Entstehung von kolorektalen Karzinomen in Zusammenhang gebracht. Einen genauen Interaktionsmechanismus haben Rubinstein *et al.* [55] untersucht. Sie konnten eine Interaktion über das Protein Adhesin A (Genname: FadA) auf der Zelloberfläche von *F. nucleatum*, welches ein E-Cadherin Ligand ist, nachweisen. *F. nucleatum* stimuliert darüber die Proliferation von Kolonkarzinomzellen, welche E-Cadherin exprimieren. Adhesin A bindet an das E-Cadherin auf den Karzinomzellen. Es vermittelt darüber die Bindung und die Invasion des Bakteriums in die Zelle. E-Cadherin spielt deshalb eine wichtige Rolle bei dem durch *F. nucleatum* induzierten Wachstumsvorteil für Kolonkarzinome [55].

Eine Interaktion über diesen Mechanismus wäre auch mit den Trophoblastzellen, die E-Cadherin exprimieren, möglich. Im direkten Vergleich mit *In-Cell Western assay* konnte bei JEG-3 und BeWo eine ähnlich hohe E-Cadherinexpression gezeigt werden. HTR8/SVneo dagegen exprimierte kaum E-Cadherin. Dies bestätigt die Western Blot Ergebnisse von Abou-Kheir *et al.* [95].

E-Cadherin kommt in der Plazenta vor allem in den Haftzotten vor und wird bei der extravillösen Differenzierung herunterreguliert [96]. Die sich vermehrenden Zytotrophoblastzellen in den Haftzotten, sowie die nicht-proliferierenden Zytotrophoblastzellen am distalen Ende der Zotten sind E-Cadherin positiv [97]. Der Syncytiotrophoblast, welcher den intervillösen Raum umgibt, ist dagegen E-Cadherin

negativ [98]. Bei extravillösen Trophoblastzellen, welche interstitiell als einzelne Zellen auftreten, ist E-Cadherin an der Zelloberfläche diskontinuierlich exprimiert, wodurch E-Cadherin-freie Membranabschnitte entstehen [97]. Im Gegensatz dazu wird durchgängig E-Cadherin exprimiert, sofern die extravillösen Trophoblastzellen in Gruppen angeordnet sind, was auch auf gruppierte endovaskuläre extravillöse Trophoblastzellen zutrifft [97]. E-Cadherin könnte folglich für eine bessere Migration und Invasion herunterreguliert werden. Nach Abschluss der Migration und erneuter Bildung von Zellverbänden würde es wieder vermehrt gebildet [97], [98].

Im Rahmen der EMT kommt es bei extravillösen Trophoblastzellen zu einem Verlust an E-cadherin, der mit einer erhöhten Invasivität verbunden ist [84]. Die geringe E-Cadherinexpression von HTR8/SVneo deutet so auf eine Ähnlichkeit mit dem invasiven extravillösen Trophoblasten hin, bei dem eine EMT stattgefunden hat. Die hohe E-Cadherinexpression von BeWo und JEG-3 ähnelt dagegen mehr dem wenig invasiven Trophoblasten vor einer EMT bzw. nach einer Rücktransition.

4.5. Wie *F. nucleatum* die Immunantwort verändert

F. nucleatum kann bei kolorektalen Tumoren die Progression fördern indem verstärkt Immunzellen rekrutiert werden, welche den Tumor infiltrieren [56]. Um die Immunantwort des Trophoblasten auf *F. nucleatum* betrachten zu können, wurde die Zytokinproduktion der Zelllinien mittels ELISA untersucht. Damit zwischen einer speziellen Reaktion auf *F. nucleatum* und einer unspezifischen auf gram-negative Bakterien allgemein differenziert werden kann, wurden die Trophoblastzellen auch mit *E. coli* stimuliert. In HTR8/SVneo wurde durch beide Bakterien die Zytokinsekretion (CXCL1, IL-6, IL-8) erhöht, nicht jedoch in BeWo. Hier blieb die IL-6 Sekretion bei Stimulation mit *E. coli* unverändert, *F. nucleatum* dagegen reduzierte die Sekretion. Diese gegensätzlichen Reaktionen lassen vermuten, dass verschiedene Signalwege genutzt werden.

Auch die Stimulation mit LPS beeinflusst die IL-6 Sekretion von BeWo nicht [99]. Koh et al. fanden heraus, dass der NF-κB Signalweg, der normalerweise durch Bindung von LPS an den TLR4 ausgelöst wird, bei BeWo durch LPS nicht aktiviert wird [100]. Dieser bewirkt jedoch die Aktivierung der Expression von IL-6 [78]. Dies könnte der Grund dafür sein, dass keines der Bakterien die IL-6-Sekretion durch BeWo erhöhte. Ein

Signalweg, der über *F. nucleatum* Stimulation in BeWo eine verminderte Sekretion von IL-6 auslöst, ist nicht bekannt. Es kann spekuliert werden, dass dies durch die Interaktion von *F. nucleatum* und E-Cadherin moduliert wird. Bei HTR8/SVneo wäre der Effekt aufgrund der geringen E-Cadherinexpression und des gegenläufigen Effekts durch die Aktivierung des NF-κB Signalweges über LPS nicht sichtbar.

Ob die Erhöhung der IL-6 Sekretion in HTR8/SVneo durch *F. nucleatum*-Stimulation TLR4 vermittelt ist, wurde deshalb durch Untersuchung der Aktivierung des Toll-like Rezeptor 4/NF-κB-Signalweges und Blockierung des Rezeptors überprüft. Es ist bekannt, dass LPS an TLR4 bindet und über den NF-κB Signalweg die IL-6-Produktion aktiviert [78]. Im Tierversuch mit schwangeren *F. nucleatum*-infizierten Mäusen ist TLR4 ebenfalls an der Entzündungsreaktion beteiligt [101]. Auch in Zellen von kolorektalen Karzinomen wird durch *F. nucleatum* TLR4 vermittelt NF-κB aktiviert [63]. Es zeigte sich durch *F. nucleatum* auch in HTR8/SVneo eine Aktivierung der Signalkaskade des Toll-like Rezeptor 4/NF-κB-Signalweges mit Translokation von NF-κB in den Zellkern. Letztere trat bei Blockierung des TLR4 nicht auf. Dies spricht für eine Interaktion von LPS auf *F. nucleatum* mit den Trophoblastzellen, welche den Signalweg aktiviert.

Die durch *F. nucleatum* induzierte IL-6-Sekretion konnte ebenfalls mittels TLR4 Blockierung gesenkt werden. Mit TLR4 blockierendem Antikörper inkubierte und *F. nucleatum* stimulierte HTR8/SVneo Zellen sekretierten verglichen mit der direkt mit *F. nucleatum* stimulierten Kontrolle deutlich weniger IL-6. Die Induktion der IL-6 Sekretion von HTR8/SVneo durch *F. nucleatum* Stimulation ist folglich TLR4 vermittelt. Dies bietet auch eine Erklärung für die fehlende Induktion der IL-6 Sekretion in BeWo nach bakterieller Stimulation.

Eine von der Menge an bakteriellen Bestandteilen abhängige Veränderung der Zytokinsekretion weisen Fest *et al.* für Makrophagen nach, die mit Trophoblasten kultiviert wurden. Makrophagen, die ohne vorherigen Kontakt zu Trophoblasten mit LPS stimuliert werden, erhöhen ihre Zytokinsekretion. Werden sie jedoch zuvor mit Trophoblasten kultiviert, führen geringe LPS-Konzentrationen verglichen zur nicht LPS-stimulierten Kontrolle zu einer Verringerung der Zytokinsekretion. Hohe Konzentrationen hingegen verändern die Zytokinsekretion der Makrophagen nicht [26]. Der Kontakt mit einer Bakterienkomponente löst folglich nicht zwangsläufig eine Entzündungsreaktion aus, sondern moduliert auch abhängig von der humanen Zellkommunikation die

Immunantwort. An der feto-maternalen Schnittstelle könnten kleine Bakterienkonzentrationen folglich einen positiven Einfluss auf das Immungleichgewicht haben.

4.6. Limitationen

Um die komplexen Vorgänge im menschlichen Körper untersuchen zu können, ist die Eingrenzung auf bestimmte Komponenten und Variablen notwendig. Die Zellkultur bietet dafür gute Voraussetzungen, da eine festgelegte Zellart unter standardisierten Kulturbedingungen erforscht werden kann. Die Variation von Einflussfaktoren kann begrenzt werden, wodurch reproduzierbare Ergebnisse erbracht werden können. In der Grundlagenforschung werden statt Primärzellen häufig Zelllinien verwendet. Sie bieten einen nahezu unbegrenzten Vorrat an Zellmaterial und etablierte Kulturbedingungen, wodurch die Ergebnisse gut reproduzierbar sind [102]. Auch Versuche verschiedener Labore sind bei Verwendung derselben Zelllinie gut vergleichbar.

Die Zelllinien sollten in ihren Funktionen den Ursprungszellen so nah wie möglich sein. Genmanipulationen können jedoch diese Funktionen verändern, weshalb Zelllinien beispielsweise in ihrem Verhalten auf bestimmte Stimulantien von Primärzellen abweichen können und somit andere Reaktionen zeigen [102]. Für die beschriebenen Versuche wurden Trophoblastzelllinien genutzt. Diese sind langlebiger als Primärzellen, unterscheiden sich jedoch wie bereits erwähnt durch ein verändertes Genprofil von diesen [92]. Trophoblastzelllinien werden aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit von frischem Primärgewebe jedoch für die meisten funktionalen Analysen genutzt [93]. Um einen möglichst umfassenden Einblick in die Einflüsse von *F. nucleatum* auf die Funktionen des Trophoblasten zu erhalten wurden drei verschiedene Zelllinien verwendet.

Da der Fokus der Arbeit auf der immortalisierten Zelllinie HTR8/SVneo lag, wurden bestimmte Experimente nur mit dieser Zelllinie durchgeführt. Eine Vervollständigung dieser Experimente mit den Zelllinien BeWo oder JEG-3 könnte weitere Erkenntnisse bringen. Wie bereits erwähnt, ist besonders eine Wiederholung des Invasionsexperimentes mit BeWo und JEG-3 empfehlenswert. Auch der mögliche Interaktionsmechanismus von E-Cadherin mit *F. nucleatum* ist noch ungenügend verstanden und sollte weiter untersucht werden.

Das Vorkommen von Bakterien in gesunden Plazenten ist noch Gegenstand aktueller Diskussionen [39]. Ob die nachgewiesene bakterielle DNA von lebenden Bakterien, Überresten von Bakterien oder OMVs stammt kann nur spekuliert werden [36]. In den Versuchen wurde daher mit inaktivierten Bakterien gearbeitet, da das Modell keine Infektion nachstellen sollte, sondern möglichst physiologische Bedingungen.

4.7. Ausblick

Wie Walker *et al.* zusammenfassen, haben Tierversuche gezeigt, dass eine vorgeburtliche Übertragung von Mikroorganismen auf den Fetus möglich ist und die physiologischen Vorgänge bei schwangeren Frauen darauf hinweisen, dass dies auch bei Menschen wahrscheinlich ist. Bei schwangeren Frauen treten Veränderungen auf, welche die Translokation von Bakterien nach intrauterin begünstigen. Auch der Nachweis von Bakterien im Mekonium von Neugeborenen deutet auf die Möglichkeit einer vertikalen Bakterienübertragung *in utero* hin [43]. Die Beeinflussung der Funktion des Trophoblasten durch Bakterien sollte deshalb weiter erforscht werden. Die Ermittlung der genauen Interaktionsprozesse zwischen *F. nucleatum* und Trophoblastzellen ist notwendig um beispielsweise für bestimmte Zwecke optimierte *F. nucleatum* bzw. deren Bestandteile, wie die nicht infektiösen OMVs, einsetzen zu können. Um eine pathologische Immunreaktion zu verhindern, müssten Interaktionsprozesse wie beispielsweise von LPS mit TLR4 herunterreguliert werden. Gleichzeitig könnten invasionsfördernde Bestandteile vermehrt exprimiert werden. In der Reproduktionsmedizin könnten speziell auf die Förderung der Invasion modifizierte *F. nucleatum* intravenös appliziert werden und über hämatogene Transmission in die Plazenta gelangen. Dort könnte die Verbesserung der Trophoblastenfunktion die Gefäßmodulierung unterstützt und so eine Präekklampsie verhindert werden. Auch bereits während der Nidation könnte durch eine verbesserte Invasion und positive Modulation der Immunumgebung die Erfolgsrate für die Schwangerschaftsentstehung steigen. Das gezielte Einbringen von *F. nucleatum*, OMVs oder spezifischen Bakterienbestandteilen in den Uterus könnte somit fertilitätssteigernde Maßnahmen unterstützen. Bei *In-Vitro*-Fertilisationen wäre eine Vorbehandlung der Embryonen vor dem Embryotransfer möglich. Eine *in vitro* Stimulation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes, welche zusammen mit dem Embryo in den

Uterus transferiert werden, mit humanem Choriongonadotropin kann die Erfolgsrate bei *In-Vitro*-Fertilisation erhöhen [103]. So könnten die Embryonen selbst vor dem Transfer mit Bakterienbestandteilen stimuliert werden, die eine Steigerung des Invasionspotentials bewirken.

Weitere Forschungsansätze sind Experimente mit Primärzellen, welche den Einfluss von *F. nucleatum* mit und ohne TLR4 Blockierung untersuchen oder auch Tierversuche, beispielsweise mit Mäusen mit fehlender TLR4-Aktivität. Doch *F. nucleatum* ist nur eines von vielen in der Plazenta nachgewiesenen Bakterien [35], [45]–[49]. Auch Ergebnisse zu anderen Bakterienstämmen wirken vielversprechend [81].

Neue wissenschaftliche Entdeckungen in Bezug auf die Interaktion von Trophoblasten und *F. nucleatum* könnten zudem für die Tumorforschung relevant sein, da *F. nucleatum* in kolorektalen, Mamma-, Pankreas- und Plattenepithelkarzinomen nachweisbar ist [54], [60], [61]. Am meisten ist bisher über die Interaktionen mit kolorektalen Karzinomen bekannt, wo *F. nucleatum* Invasion und Wachstum begünstigt [59]. Daher könnten Erkenntnisse zu *F. nucleatum* primär für die Darmkrebsprävention und -behandlung genutzt werden. Aber auch beim Mammakarzinom könnte durch weitere Ergebnisse die Behandlung verbessert werden [63]. Die Verhinderung einer inadäquaten Besiedelung mit *F. nucleatum* könnte als präventive Maßnahme gegen Karzinome wirken. Durch das Einbringen genetisch veränderter *F. nucleatum*, bei denen die Signalwege für Invasivitäts- und Wachstumssteigerung nicht aktiviert werden können, könnten pathologisch wirkende *F. nucleatum* verdrängt werden und eine langsamere Tumorprogression bewirken. Auch eine Veränderung der Immunumgebung durch bakterielle Bestandteile könnte die Aggressivität von Tumoren beeinflussen.

Somit bieten die Ergebnisse zur Interaktion von *F. nucleatum* mit dem Trophoblasten mögliche Ansatzpunkte für die Tumorbehandlung und Reproduktionsmedizin.

5. Zusammenfassung

Mit dieser Arbeit sollten die Auswirkungen von karmensalen Bakterien auf die fr eue Schwangerschaft untersucht werden. In der Plazenta wird ein physiologisches Mikrobiom beschrieben, zu welchem auch das gram-negative anaerobe Bakterium *Fusobacterium nucleatum* gehört. Getestet wurde mit *in vitro* Experimenten ob eine niedrige Bakterienkonzentration *F. nucleatum* toleriert wird, ohne eine schädliche Immunantwort auszulösen oder den Trophoblasten in seiner Funktion einzuschr enken. Als Modell wurden die virustransfizierte Trophoblastzelllinie HTR8/SVneo sowie die Chorionkarzinomzelllinien JEG-3 und BeWo genutzt, die mit *F. nucleatum* und *E. coli* behandelt wurden. Die Bakterien wurden inaktiviert um nicht-infektiöse Bedingungen zu imitieren. *Invasion assay, scratch assay, cell viability assay, apoptosis detection, cell cycle analysis, ELISA, in-cell western assay, multiplex assay* und Immunfluoreszenz wurden genutzt.

Die Invasivität von HTR8/SVneo konnte durch Stimulation mit geringen Mengen *F. nucleatum* gesteigert werden. Die Migration von HTR8/SVneo und BeWo wurde durch kleine Mengen *F. nucleatum* nicht beeinträchtigt. Eine hohe Konzentration reduzierte die Migration von HTR8/SVneo, nicht jedoch von BeWo. Hohe Konzentrationen *F. nucleatum* reduzierten die Viabilität in HTR8/SVneo, BeWo und JEG-3. Sie erh ohten auch die Apoptoserate in HTR8/SVneo und BeWo. *F. nucleatum* induzierte in HTR8/SVneo die Sekretion invasionsf ordernder Faktoren. In BeWo dagegen sank die Produktion durch *F. nucleatum*-Stimulation. BeWo und JEG-3 exprimieren E-Cadherin sehr viel stärker als HTR8/SVneo.

Aus den Experimenten ergibt sich, dass eine niedrige Konzentration von Bakterien oder bakteriellen Bestandteilen in der fetomaternalen Einheit vorhanden sein könnte, ohne eine schädliche Immunantwort auszulösen. Sie könnten die Funktion des Trophoblasten sogar positiv beeinflussen indem pro-inflammatorische Zytokine induziert werden und die Invasivität positiv beeinflusst wird.

6. Literaturverzeichnis

- [1] C. Wippermann, "Ungewollte Kinderlosigkeit 2020," *Bundesministerium für Familie, Senioren, Frauen und Jugend, Referat Öffentlichkeitsarbeit, MKL Druck GmbH & Co. KG*, September 2020, 1. Auflage. 1-173.
- [2] C. Wippermann, "Kinderlose Frauen und Männer," *Bundesministerium für Familie, Senioren, Frauen und Jugend, Referat Öffentlichkeitsarbeit, Bonifatius GmbH*, August 2014, 1. Auflage. 1-189.
- [3] "Diagnostik and therapy before assisted reproductive treatments. Guideline of the DGGG, OEGGG and SGGG" (S2K-Level, AWMF Registry No 015/085, 02/2019). <http://www.awmf.org/leitlinien/detail/II/015-085.html>.
- [4] "Mehr Geburten nach künstlicher Befruchtung," *Deutsches Arzteblatt International*, vol. 114, no. 33–34, p. A2438, 2017.
- [5] M. Von Wolff and T. Haaf, "In vitro fertilization technology and child health: Risks, mechanisms and possible consequences," *Deutsches Arzteblatt International*, vol. 117, no. 1–2, pp. 23–30, 2020, doi: 10.3238/ARZTEBL.2020.0023.
- [6] F. Schöni-Affolter, C. Dubuis-Grieder and E. Strauch, embryology.ch/de/ [abgerufen am 02.11.2020].
- [7] E. Dimitriadis, E. Menkhorst, L. A. Salamonsen, and P. Paiva, "Review: LIF and IL11 in trophoblast-endometrial interactions during the establishment of pregnancy," *Placenta*, vol. 31, no. SUPPL., pp. S99–S104, 2010, doi: 10.1016/j.placenta.2009.12.027.
- [8] G. Latendresse and S. Founds, "The Fascinating and Complex Role of the Placenta in Pregnancy and Fetal Well-being," *Journal of Midwifery and Women's Health*, vol. 60, no. 4, pp. 360–370, 2015, doi: 10.1111/jmwh.12344.
- [9] H. Schneider, L. Raio and M. Knöfler, "Präimplantation, Implantation und Plazentation: Bedeutung für den Schwangerschaftsverlauf." K.-T. M. Schneider. *Die Geburtshilfe*. Springer, Berlin, Heidelberg, 2006. 4-15.
- [10] G. J. Burton, A. W. Woods, E. Jauniaux, and J. C. P. Kingdom, "Rheological and Physiological Consequences of Conversion of the Maternal Spiral Arteries for Uteroplacental Blood Flow during Human Pregnancy," *Placenta*, vol. 30, no. 6, pp. 473–482, 2009, doi: 10.1016/j.placenta.2009.02.009.
- [11] M. Zygmunt, F. Herr, K. Münstedt, U. Lang, and O. D. Liang, "Angiogenesis and vasculogenesis in pregnancy," *European Journal of Obstetrics and Gynecology*

and Reproductive Biology, vol. 110, no. SUPPL., pp. 10–18, 2003, doi: 10.1016/S0301-2115(03)00168-4.

- [12] F. Lyall, J. N. Bulmer, E. Duffie, F. Cousins, A. Theriault, and S. C. Robson, “Human trophoblast invasion and spiral artery transformation: The role of PECAM-1 in normal pregnancy, preeclampsia, and fetal growth restriction,” *American Journal of Pathology*, vol. 158, no. 5, pp. 1713–1721, 2001, doi: 10.1016/S0002-9440(10)64127-2.
- [13] “Hypertensive Pregnancy Disorders: Diagnosis and Therapy . Guideline of the German Society of Gynecology and Obstetrics” (S2k -Level , AWMF-Registry No. 015/018, March 2019). <http://www.awmf.org/leitlinien/detail/II/015-018.html>.
- [14] American College of Obstetricians and Gynecologists and Task Force on Hypertension in Pregnancy, “Hypertension in pregnancy. Report of the American College of Obstetricians and Gynecologists’ Task Force on Hypertension in Pregnancy.,” *Obstetrics and gynecology*, vol. 122, no. 5, pp. 1122–31, Nov. 2013, doi: 10.1097/01.AOG.0000437382.03963.88.
- [15] W. Rath, A. Faridi, and J. W. Dudenhausen, “HELLP syndrome,” *Journal of Perinatal Medicine*, vol. 28, no. 4, pp. 249–260, 2000, doi: 10.1515/JPM.2000.033.
- [16] R. M. Ward and J. C. Beachy, “Neonatal complications following preterm birth,” *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, vol. 110, pp. 8–16, Apr. 2003, doi: 10.1016/S1470-0328(03)00012-0.
- [17] E. Abalos, C. Cuesta, A. L. Grosso, D. Chou, and L. Say, “Global and regional estimates of preeclampsia and eclampsia: A systematic review,” *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*, vol. 170, no. 1, pp. 1–7, 2013, doi: 10.1016/j.ejogrb.2013.05.005.
- [18] L. Duley, “The Global Impact of Pre-eclampsia and Eclampsia,” *Seminars in Perinatology*, vol. 33, no. 3, pp. 130–137, 2009, doi: 10.1053/j.semperi.2009.02.010.
- [19] C. V. Ananth and A. M. Vintzileos, “Maternal-fetal conditions necessitating a medical intervention resulting in preterm birth,” *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, vol. 195, no. 6, pp. 1557–1563, 2006, doi: 10.1016/j.ajog.2006.05.021.
- [20] H. Schneider and M. Baumann, “Präeklampsie, Pathogenese und Vorhersage,” *Gynakologe*, vol. 46, no. 3, pp. 193–198, 2013, doi: 10.1007/s00129-013-3140-z.
- [21] S. H. Gage, M. R. Munafò, and G. Davey Smith, “Causal Inference in Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD) Research,” *Annual*

Review of Psychology, vol. 67, no. 1, pp. 567–585, 2016, doi: 10.1146/annurev-psych-122414-033352.

- [22] A. Munoz-Suano, A. B. Hamilton, and A. G. Betz, “Gimme shelter: the immune system during pregnancy.,” *Immunological reviews*, vol. 241, no. 1, pp. 20–38, May 2011, doi: 10.1111/j.1600-065X.2011.01002.x.
- [23] G. Mor and J. Y. Kwon, “Trophoblast-microbiome interaction: A new paradigm on immune regulation,” *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, vol. 213, no. 4, pp. S131–S137, 2015, doi: 10.1016/j.ajog.2015.06.039.
- [24] O. Huhn, X. Zhao, L. Esposito, A. Moffett, F. Colucci, and A. M. Sharkey, “How Do Uterine Natural Killer and Innate Lymphoid Cells Contribute to Successful Pregnancy?,” *Frontiers in Immunology*, vol. 12, no. June, pp. 1–20, 2021, doi: 10.3389/fimmu.2021.607669.
- [25] J. N. Bulmer, P. J. Williams, and G. E. Lash, “Immune cells in the placental bed,” *International Journal of Developmental Biology*, vol. 54, no. 2–3, pp. 281–294, 2010, doi: 10.1387/ijdb.082763jb.
- [26] S. Fest, P. B. Aldo, V. M. Abrahams, I. Visintin, A. Alvero, R. Chen, S. L. Chavez, R. Romero, and G. Mor, “Trophoblast-macrophage interactions: A regulatory network for the protection of pregnancy,” *American Journal of Reproductive Immunology*, vol. 57, no. 1, pp. 55–66, 2007, doi: 10.1111/j.1600-0897.2006.00446.x.
- [27] C. Ferretti, L. Bruni, V. Dangles-Marie, A. P. Pecking, and D. Bellet, “Molecular circuits shared by placental and cancer cells, and their implications in the proliferative, invasive and migratory capacities of trophoblasts,” *Human Reproduction Update*, vol. 13, no. 2, pp. 121–141, 2007, doi: 10.1093/humupd/dml048.
- [28] S. G. Holtan, D. J. Creedon, P. Haluska, and S. N. Markovic, “Cancer and pregnancy: Parallels in growth, invasion, and immune modulation and implications for cancer therapeutic agents,” *Mayo Clinic Proceedings*, vol. 84, no. 11, pp. 985–1000, 2009, doi: 10.4065/84.11.985.
- [29] R. Romero, C. M. Salafia, A. P. Athanassiadis, S. Hanaoka, M. Mazor, W. Sepulveda, and M. B. Bracken, “The relationship between acute inflammatory lesions of the preterm placenta and amniotic fluid microbiology,” *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, vol. 166, no. 5, pp. 1382–1388, 1992, doi: 10.1016/0002-9378(92)91609-E.

- [30] L. F. Gonçalves, T. Chaiworapongsa, and R. Romero, "Intrauterine infection and prematurity," *Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews*, vol. 8, no. 1, pp. 3–13, 2002, doi: 10.1002/mrdd.10008.
- [31] R. F. Lamont, "The role of infection in preterm labour and birth," *Hospital Medicine*, vol. 64, no. 11, pp. 644–647, 2003, doi: 10.12968/hosp.2003.64.11.2343.
- [32] T. M. Wassenaar and P. Panigrahi, "Is a foetus developing in a sterile environment?," *Letters in Applied Microbiology*, vol. 59, no. 6, pp. 572–579, 2014, doi: 10.1111/lam.12334.
- [33] F. Bäckhed, R. E. Ley, J. L. Sonnenburg, D. A. Peterson, and J. I. Gordon, "Host-bacterial mutualism in the human intestine," *Science*, vol. 307, no. 5717, pp. 1915–1920, 2005, doi: 10.1126/science.1104816.
- [34] D. Gevers, R. Knight, J. F. Petrosino, K. Huang, A. L. McGuire, B. W. Birren, K. E. Nelson, O. White, B. A. Methé, and C. Huttenhower, "The Human Microbiome Project: A Community Resource for the Healthy Human Microbiome," *PLoS Biology*, vol. 10, no. 8, pp. 6–10, 2012, doi: 10.1371/journal.pbio.1001377.
- [35] K. Aagaard, J. Ma, K. M. Antony, R. Ganu, J. Petrosino, and J. Versalovic, "The placenta harbors a unique microbiome.," *Science translational medicine*, vol. 6, no. 237, p. 237ra65, May 2014, doi: 10.1126/scitranslmed.3008599.
- [36] R. Einenkel, M. Zygmunt, and D. O. Muzzio, "Microorganisms in the healthy upper reproductive tract: from denial to beneficial assignments for reproductive biology," *Reproductive Biology*, vol. 19, no. 2, pp. 113–118, 2019, doi: 10.1016/j.repbio.2019.04.001.
- [37] L. F. Gomez-Arango, H. L. Barrett, H. D. McIntyre, L. K. Callaway, M. Morrison, and M. D. Nitert, "Contributions of the maternal oral and gut microbiome to placental microbial colonization in overweight and obese pregnant women," *Scientific Reports*, vol. 7, no. 1, pp. 1–10, 2017, doi: 10.1038/s41598-017-03066-4.
- [38] X. Tao, J. M. Franasiak, Y. Zhan, R. T. Scott, J. Rajchel, J. Bedard, R. Newby, R. T. Scott, N. R. Treff, and T. Chu, "Characterizing the endometrial microbiome by analyzing the ultra-low bacteria from embryo transfer catheter tips in IVF cycles: Next generation sequencing (NGS) analysis of the 16S ribosomal gene," *Human Microbiome Journal*, vol. 3, pp. 15–21, 2017, doi: 10.1016/j.humic.2017.01.004.
- [39] D. D. Briana, V. Papaevangelou, and A. Malamitsi-Puchner, "The jury is still out on the existence of a placental microbiome," *Acta Paediatrica, International*

Journal of Paediatrics, vol. 110, no. 11, pp. 2958–2963, 2021, doi: 10.1111/apa.16048.

- [40] Y. Fardini, P. Chung, R. Dumm, N. Joshi, and Y. W. Han, “Transmission of diverse oral bacteria to murine placenta: Evidence for the oral microbiome as a potential source of intrauterine infection,” *Infection and Immunity*, vol. 78, no. 4, pp. 1789–1796, 2010, doi: 10.1128/IAI.01395-09.
- [41] Y. W. Han, R. W. Redline, M. Li, L. Yin, G. B. Hill, and T. S. McCormick, “*Fusobacterium nucleatum* Induces Premature and Term Stillbirths in Pregnant Mice: Implication of Oral Bacteria in Preterm Birth,” *Infection and Immunity*, vol. 72, no. 4, pp. 2272–2279, Apr. 2004, doi: 10.1128/IAI.72.4.2272-2279.2004.
- [42] A. Gil, R. Rueda, S. E. Ozanne, E. M. van der Beek, C. van Loo-Bouwman, M. Schoemaker, V. Marinello, K. Venema, C. Stanton, B. Schelkle, M. Flourakis, and C. A. Edwards, “Is there evidence for bacterial transfer via the placenta and any role in the colonization of the infant gut?—a systematic review,” *Critical Reviews in Microbiology*, vol. 0, no. 0, pp. 1–15, 2020, doi: 10.1080/1040841X.2020.1800587.
- [43] R. W. Walker, J. C. Clemente, I. Peter, and R. J. F. Loos, “The prenatal gut microbiome: are we colonized with bacteria in utero?,” *Pediatric Obesity*, vol. 12, no. August, pp. 3–17, 2017, doi: 10.1111/ijpo.12217.
- [44] A. Singh and M. Mittal, “Neonatal microbiome—a brief review,” *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*, vol. 33, no. 22, pp. 3841–3848, 2020, doi: 10.1080/14767058.2019.1583738.
- [45] R. J. Cahill, S. Tan, G. Dougan, P. O’Gaora, D. Pickard, N. Kennea, M. H. F. Sullivan, R. G. Feldman, and A. D. Edwards, “Universal DNA primers amplify bacterial DNA from human fetal membranes and link *Fusobacterium nucleatum* with prolonged preterm membrane rupture,” *Molecular Human Reproduction*, vol. 11, no. 10, pp. 761–766, 2005, doi: 10.1093/molehr/gah234.
- [46] R. M. Doyle, K. Harris, S. Kamiza, U. Harjunmaa, U. Ashorn, M. Nkhoma, K. G. Dewey, K. Maleta, P. Ashorn, and N. Klein, “Bacterial communities found in placental tissues are associated with severe chorioamnionitis and adverse birth outcomes,” *PLoS ONE*, vol. 12, no. 7, pp. 1–23, 2017, doi: 10.1371/journal.pone.0180167.
- [47] H. E. Jones, K. A. Harris, M. Azizia, L. Bank, B. Carpenter, J. C. Hartley, N. Klein, and D. Peebles, “Differing prevalence and diversity of bacterial species in fetal membranes from very preterm and term labor,” *PLoS ONE*, vol. 4, no. 12, 2009, doi: 10.1371/journal.pone.0008205.

- [48] D. A. Montenegro, L. F. Borda, Y. Neuta, L. A. Gómez, D. M. Castillo, D. Loyo, and G. I. Lafaurie, "Oral and uro-vaginal intra-amniotic infection in women with preterm delivery: A case-control study," *Journal of investigative and clinical dentistry*, vol. 10, no. 2, p. e12396, 2019, doi: 10.1111/jicd.12396.
- [49] A. L. Prince, J. Ma, P. S. Kannan, M. Alvarez, T. Gisslen, R. A. Harris, E. L. Sweeney, C. L. Knox, D. S. Lambers, A. H. Jobe, C. A. Chougnet, S. G. Kallapur, and K. M. Aagaard, "The placental membrane microbiome is altered among subjects with spontaneous preterm birth with and without chorioamnionitis," *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, vol. 214, no. 5, pp. 627.e1-627.e16, 2016, doi: 10.1016/j.ajog.2016.01.193.
- [50] A. I. Bolstad, H. B. Jensen, and V. Bakken, "Taxonomy , biology , and periodontal aspects of *Fusobacterium nucleatum* . These include : Taxonomy , Biology , and Periodontal Aspects of *Fusobacterium nucleatum*," *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 9, no. 1, pp. 55–71, 1996.
- [51] Y. Fardini, X. Wang, S. Témoin, S. Nithianantham, D. Lee, M. Shoham, and Y. W. Han, "Fusobacterium nucleatum adhesin FadA binds vascular endothelial cadherin and alters endothelial integrity," *Molecular Microbiology*, vol. 82, no. 6, pp. 1468–1480, 2011, doi: 10.1111/j.1365-2958.2011.07905.x.
- [52] S. Stockham, J. E. Stamford, C. T. Roberts, T. R. Fitzsimmons, C. Marchant, P. M. Bartold, and P. S. Zilm, "Abnormal pregnancy outcomes in mice using an induced periodontitis model and the haematogenous migration of *Fusobacterium nucleatum* sub-species to the murine placenta," *PLoS ONE*, vol. 10, no. 3, pp. 1–16, 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0120050.
- [53] Y. W. Han, "Fusobacterium nucleatum: A commensal-turned pathogen," *Current Opinion in Microbiology*, vol. 23, pp. 141–147, 2015, doi: 10.1016/j.mib.2014.11.013.
- [54] M. Castellarin, R. L. Warren, J. D. Freeman, L. Dreolini, M. Krzywinski, J. Strauss, R. Barnes, P. Watson, E. Allen-Vercoe, R. A. Moore, and R. A. Holt, "Fusobacterium nucleatum infection is prevalent in human colorectal carcinoma," *Genome Research*, vol. 22, no. 2, pp. 299–306, Feb. 2012, doi: 10.1101/gr.126516.111.
- [55] M. R. Rubinstein, X. Wang, W. Liu, Y. Hao, G. Cai, and Y. W. Han, "Fusobacterium nucleatum Promotes Colorectal Carcinogenesis by Modulating E-Cadherin/β-Catenin Signaling via its FadA Adhesin," *Cell Host and Microbe*, vol. 14, no. 2, pp. 195–206, 2013, doi: 10.1016/j.chom.2013.07.012.
- [56] A. D. Kostic, E. Chun, L. Robertson, J. N. Glickman, C. A. Gallini, M. Michaud, T. E. Clancy, D. C. Chung, P. Lochhead, G. L. Hold, E. M. El-Omar, D. Brenner, C.

- S. Fuchs, M. Meyerson, and W. S. Garrett, “*Fusobacterium nucleatum* Potentiates Intestinal Tumorigenesis and Modulates the Tumor-Immune Microenvironment,” *Cell Host and Microbe*, vol. 14, no. 2, pp. 207–215, 2013, doi: 10.1016/j.chom.2013.07.007.
- [57] T. Tahara, E. Yamamoto, H. Suzuki, R. Maruyama, W. Chung, J. Garriga, J. Jelinek, H. O. Yamano, T. Sugai, B. An, I. Shureiqi, M. Toyota, Y. Kondo, M. R. H. Estecio, and J. P. J. Issa, “*Fusobacterium* in colonic flora and molecular features of colorectal carcinoma,” *Cancer Research*, vol. 74, no. 5, pp. 1311–1318, 2014, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-1865.
- [58] K. Mima, Y. Sukawa, R. Nishihara, Z. R. Qian, M. Yamauchi, K. Inamura, S. A. Kim, A. Masuda, J. A. Nowak, K. Noshio, A. D. Kostic, M. Giannakis, H. Watanabe, S. Bullman, D. A. Milner, C. C. Harris, E. Giovannucci, L- A. Garraway, G. J. Freeman, G. Dranoff, A. T. Chan, W. S. Garrett, C. Huttenhower, C. A. Fuchs, S. Ogino, “*Fusobacterium nucleatum* and T cells in colorectal carcinoma,” *JAMA Oncology*, vol. 1, no. 5, pp. 653–661, 2015, doi: 10.1001/jamaoncol.2015.1377.
- [59] Y. Yang, W. Weng, J. Peng, L. Hong, L. Yang, Y. Toiyama, R. Gao, M. Liu, M. Yin, C. Pan, H. Li, B. Guo, Q. Zhu, Q. Wei, M. Moyer, P. Wang, S. Cai, A. Goel, H. Qin, Y. Ma, “*Fusobacterium nucleatum* Increases Proliferation of Colorectal Cancer Cells and Tumor Development in Mice by Activating Toll-Like Receptor 4 Signaling to Nuclear Factor-κB, and Up-regulating Expression of MicroRNA-21,” *Gastroenterology*, vol. 152, no. 4, pp. 851-866.e24, Mar. 2017, doi: 10.1053/j.gastro.2016.11.018.
- [60] D. Nejman, I. Livyatan, G. Fuks, N. Gavert, Y. Zwang, L. T. Geller, A. Rotter-Maskowitz, R. Weiser, G. Mallel, E. Gigi, A. Meltser, G. M. Douglas, I. Kamer, V. Gopalakrishnan, T. Dadosh, S. Levin-Zaidman, S. Avnet, T. Atlan, Z. A. Cooper, R. Arora, A. P. Cogdill, M. A. W. Khan, G. Ologun, Y. Bussi, A. Weinberger, M. Lotan-Pompan, O. Golani, G. Perry, M. Rokah, K. Bahar-Shany, E. A. Rozeman, C. U. Blank, A. Ronai, R. Shaoul, A. Amit, T. Dorfman, R. Kremer, Z. R. Cohen, S. Harnof, T. Siegal, E. Yehuda-Shnaidman, E. N. Gal-Yam, H. Shapira, N. Baldini, M. G. I. Langille, A. Ben-Nun, B. Kaufman, A. Nissan, T. Golan, M. Dadiani, K. Levanon, J. Bar, S. K. Yust, I. Barshack, D. S. Peepoer, D. J. Raz, E. Segal, J. A. Wargo, J. Sandbank, N. Shental, R. Straussman, “The human tumor microbiome is composed of tumor type-specific intracellular bacteria,” *Science*, vol. 368, no. 6494, pp. 973–980, 2020, doi: 10.1126/science.aay9189.
- [61] W. Shao, N. Fujiwara, Y. Mouri, S. Kisoda, K. Yoshida, K. Yoshida, H. Yumoto, K. Ozaki, N. Ishimaru, and Y. Kudo, “Conversion from epithelial to partial-EMT phenotype by *Fusobacterium nucleatum* infection promotes invasion of oral

cancer cells," *Scientific Reports*, vol. 11, no. 1, pp. 1–14, 2021, doi: 10.1038/s41598-021-94384-1.

- [62] C. Neuzillet, M. Marchais, S. Vacher, M. Hilmi, A. Schnitzler, D. Meseure, R. Leclere, C. Lecerf, C. Dubot, E. Jeannot, J. Klijjanienko, O. Mariani, V. Calugaru, C. Hoffmann, M. Lesnik, N. Badois, E. Borcoman, E. Piaggio, M. Kamal, C. Le Tourneau, I. Bieche, "Prognostic value of intratumoral *Fusobacterium nucleatum* and association with immune-related gene expression in oral squamous cell carcinoma patients," *Scientific Reports*, vol. 11, no. 1, pp. 1–13, 2021, doi: 10.1038/s41598-021-86816-9.
- [63] M. Van der Merwe, G. Van Niekerk, A. Botha, and A. M. Engelbrecht, "The onco-immunological implications of *Fusobacterium nucleatum* in breast cancer," *Immunology Letters*, vol. 232, no. January, pp. 60–66, 2021, doi: 10.1016/j.imlet.2021.02.007.
- [64] A. Mantovani, M. A. Cassatella, C. Costantini, and S. Jaillon, "Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity," *Nature Reviews Immunology*, vol. 11, no. 8, pp. 519–531, 2011, doi: 10.1038/nri3024.
- [65] N. Hashemi Goradel, S. Heidarzadeh, S. Jahangiri, B. Farhood, K. Mortezaee, N. Khanlarkhani, and B. Negahdari, "Fusobacterium nucleatum and colorectal cancer: A mechanistic overview," *Journal of Cellular Physiology*, vol. 234, no. 3, pp. 2337–2344, 2019, doi: 10.1002/jcp.27250.
- [66] R. T. Mendes, D. Nguyen, D. Stephens, F. Pamuk, D. Fernandes, T. E. Van Dyke, and A. Kantarci, "Endothelial cell response to *Fusobacterium nucleatum*," *Infection and Immunity*, vol. 84, no. 7, pp. 2141–2148, 2016, doi: 10.1128/IAI.01305-15.
- [67] G. Reid, P. Brigidi, J. P. Burton, N. Contractor, S. Duncan, E. Fargier, C. Hill, S. Lebeer, R. Martín, A. J. McBain, G. Mor, C. O'Neill, J. M. Rodríguez, J. Swann, S. van Hemert, and J. Ansell, "Microbes Central to Human Reproduction," *American Journal of Reproductive Immunology*, vol. 73, no. 1, pp. 1–11, 2015, doi: 10.1111/aji.12319.
- [68] C. H. Graham, T. S. Hawley, R. G. Hawley, J. R. Macdougall, R. S. Kerbel, N. Khoo, and P. K. Lala, "Establishment and characterization of first trimester human trophoblast cells with extended lifespan," *Experimental Cell Research*, vol. 206, no. 2, pp. 204–211, Jun. 1993, doi: 10.1006/excr.1993.1139.
- [69] P. O. Kohler and W. E. Bridson, "Isolation of hormone-producing clonal lines of human choriocarcinoma," *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, vol. 32, no. 5, pp. 683–687, 1971, doi: 10.1210/jcem-32-5-683.

- [70] R. A. Pattiello and G. O. Gey, "The Establishment of a Cell Line of Human Hormone-synthesizing Trophoblastic Cells in Vitro," *Cancer Research*, vol. 28, no. 7, pp. 1231–1236, 1968.
- [71] M. Heusler, R. Einenkel, J. Ehrhardt, D. O. Muzzio, and M. Zygmunt, "Low Abundance Fusobacterium Nucleatum Supports Early Pregnancy Development – An In Vitro Study," *Frontiers in Immunology*, vol. 12, no. August, pp. 1–16, 2021, doi: 10.3389/fimmu.2021.698045.
- [72] M. Brundin, D. Figdor, G. Sundqvist, and U. Sjögren, "Preservation of Fusobacterium nucleatum and Peptostreptococcus anaerobius DNA after loss of cell viability," *International Endodontic Journal*, vol. 48, no. 1, pp. 37–45, 2015, doi: 10.1111/iej.12273.
- [73] C. Riccardi and I. Nicoletti, "Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry," *Nature Protocols*, vol. 1, no. 3, pp. 1458–1461, 2006, doi: 10.1038/nprot.2006.238.
- [74] Z. Zhang, Y. Chen, Y. Jiang, Y. Luo, H. Zhang, and Y. Zhan, "Prognostic and clinicopathological significance of CXCL1 in cancers: a systematic review and meta-analysis," *Cancer Biology and Therapy*, vol. 20, no. 11, pp. 1380–1388, 2019, doi: 10.1080/15384047.2019.1647056.
- [75] D. Kamimura, K. Ishihara, and T. Hirano, "IL-6 signal transduction and its physiological roles: the signal orchestration model.,," *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology*, vol. 149, pp. 1–38, 2003, doi: 10.1007/s10254-003-0012-2.
- [76] D. G. Remick, "Interleukin-8," *Critical Care Medicine*, vol. 33, no. 12 SUPPL., pp. 466–467, 2005, doi: 10.1097/01.CCM.0000186783.34908.18.
- [77] P. D. Brown and R. Giavazzi, "Matrix metalloproteinase inhibition: A review of anti-tumour activity: Matrix metalloproteinase inhibition: A review of anti-tumour activity," *Annals of Oncology*, vol. 6, no. 10, pp. 967–974, 1995, doi: 10.1093/oxfordjournals.annonc.a059091.
- [78] T. A. Libermann and D. Baltimore, "Activation of interleukin-6 gene expression through the NF-kappa B transcription factor.,," *Molecular and Cellular Biology*, vol. 10, no. 5, pp. 2327–2334, 1990, doi: 10.1128/mcb.10.5.2327.
- [79] M. Hinz and C. Scheidereit, "The IκB kinase complex in NF-κB regulation and beyond," *EMBO Reports*, vol. 15, no. 1, pp. 46–61, 2014, doi: 10.1002/embr.201337983.
- [80] M. Jovanović-Krivokuća, I. Stefanoska, T. A. Rabi, A. Vilotić, M. Petronijević, S. Vrzić-Petronijević, L. Radojčić, and L. Vićovac, "MIF is among the proinflammatory

cytokines increased by LPS in the human trophoblast line," *Archives of Biological Sciences*, vol. 68, no. 4, pp. 715–722, 2016, doi: 10.2298/ABS151123012J.

- [81] T. Yoshida, K. Takada, S. Komine-aizawa, Y. Kamei, O. Ishihara, and S. Hayakawa, "Lactobacillus crispatus promotes invasion of the HTR-8 / SVneo trophoblast cell line," *Placenta*, vol. 111, no. October 2020, pp. 76–81, 2021, doi: 10.1016/j.placenta.2021.06.006.
- [82] C. L. Librach, S. L. Feigenbaum, K. E. Bass, T. Y. Cui, N. Verastas, Y. Sadovsky, J. P. Quigley, D. L. French, and S. J. Fisher, "Interleukin-1 beta regulates human cytотrophoblast metalloproteinase activity and invasion in vitro.,," *The Journal of biological chemistry*, vol. 269, no. 25, pp. 17125–31, Jun. 1994, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8006017>
- [83] A. Onogi, K. Naruse, T. Sado, T. Tsunemi, H. Shigetomi, T. Noguchi, Y. Yamada, M. Akasaki, H. Oi, and H. Kobayashi, "Hypoxia inhibits invasion of extravillous trophoblast cells through reduction of matrix metalloproteinase (MMP)-2 activation in the early first trimester of human pregnancy," *Placenta*, vol. 32, no. 9, pp. 665–670, 2011, doi: 10.1016/j.placenta.2011.06.023.
- [84] S. Dasilva-Arnold, J. L. James, A. Al-Khan, S. Zamudio, and N. P. Illsley, "Differentiation of first trimester cytотrophoblast to extravillous trophoblast involves an epithelial-mesenchymal transition," *Placenta*, vol. 36, no. 12, pp. 1412–1418, 2015, doi: 10.1016/j.placenta.2015.10.013.
- [85] R. Kalluri and R. A. Weinberg, "The basics of epithelial-mesenchymal transition," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 119, no. 6, pp. 1420–1428, Jun. 2009, doi: 10.1172/JCI39104.
- [86] R. Kalluri and E. G. Neilson, "Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 112, no. 12, pp. 1776–1784, 2003, doi: 10.1172/JCI200320530.
- [87] S. J. Fisher, T. Cui, L. Zhang, L. Hartman, K. Grahl, Z. Guo-Yang, J. Tarpey, and C. H. Damsky, "Adhesive and degradative properties of human placental cytотrophoblast cells in vitro," *Journal of Cell Biology*, vol. 109, no. 2, pp. 891–902, 1989, doi: 10.1083/jcb.109.2.891.
- [88] A. A. Abdulkareem, R. M. Shelton, G. Landini, P. R. Cooper, and M. R. Milward, "Potential role of periodontal pathogens in compromising epithelial barrier function by inducing epithelial-mesenchymal transition," *Journal of Periodontal Research*, vol. 53, no. 4, pp. 565–574, 2018, doi: 10.1111/jre.12546.
- [89] O. Equils, D. Lu, M. Gatter, S. S. Witkin, C. Bertolotto, M. Arditi, J. a McGregor, C. F. Simmons, and C. J. Hobel, "Chlamydia heat shock protein 60 induces

- trophoblast apoptosis through TLR4.,” *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, vol. 177, no. 2, pp. 1257–63, 2006, doi: 10.4049/jimmunol.177.2.1257.
- [90] V. M. Abrahams, P. Bole-Aldo, Y. M. Kim, S. L. Straszewski-Chavez, T. Chaiworapongsa, R. Romero, and G. Mor, “Divergent Trophoblast Responses to Bacterial Products Mediated by TLRs,” *The Journal of Immunology*, vol. 173, no. 7, pp. 4286–4296, 2004, doi: 10.4049/jimmunol.173.7.4286.
- [91] P. Suman, G. Godbole, R. Thakur, D. M. Morales-Prieto, D. N. Modi, U. R. Markert, and S. K. Gupta, “AP-1 transcription factors, mucin-type molecules and mmp5 regulate the IL-11 mediated invasiveness of JEG-3 and HTR-8/svneo trophoblastic cells,” *PLoS ONE*, vol. 7, no. 1, pp. 1–12, 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0029745.
- [92] M. Bilban, S. Tauber, P. Haslinger, J. Pollheimer, L. Saleh, H. Pehamberger, O. Wagner, and M. Knöfler, “Trophoblast invasion: Assessment of cellular models using gene expression signatures,” *Placenta*, vol. 31, no. 11, pp. 989–996, 2010, doi: 10.1016/j.placenta.2010.08.011.
- [93] N. J. Hannan, P. Paiva, E. Dimitriadis, and L. A. Salamonsen, “Models for study of human embryo implantation: choice of cell lines?,” *Biology of reproduction*, vol. 82, no. 2, pp. 235–245, 2010, doi: 10.1095/biolreprod.109.077800.
- [94] B. Novakovic, L. Gordon, N. C. Wong, A. Moffett, U. Manuelpillai, J. M. Craig, A. Sharkey, and R. Saffery, “Wide-ranging DNA methylation differences of primary trophoblast cell populations and derived cell lines: Implications and opportunities for understanding trophoblast function,” *Molecular Human Reproduction*, vol. 17, no. 6, pp. 344–353, 2011, doi: 10.1093/molehr/gar005.
- [95] W. Abou-Kheir, J. Barakat, O. Hadadeh, and G. Daoud, “HTR-8/SVneo cell line contains a mixed population of cells,” *Placenta*, vol. 50, pp. 1–7, 2017, doi: 10.1016/j.placenta.2016.12.007.
- [96] Y. Zhou, S. J. Fisher, M. Janatpour, O. Genbacev, E. Dejana, M. Wheelock, and C. H. Damsky, “Human cytotrophoblasts adopt a vascular phenotype as they differentiate: A strategy for successful endovascular invasion?,” *Journal of Clinical Investigation*, vol. 99, no. 9, pp. 2139–2151, 1997, doi: 10.1172/JCI119387.
- [97] C. Floridon, “Localization of E-cadherin in villous, extravillous and vascular trophoblasts during intrauterine, ectopic and molar pregnancy,” *Molecular Human Reproduction*, vol. 6, no. 10, pp. 943–950, Oct. 2000, doi: 10.1093/molehr/6.10.943.
- [98] C. Coutifaris, L. C. Kao, H. M. Sehdev, U. Chin, G. O. Babalola, O. W. Blaschuk, and J. F. Strauss, “E-cadherin expression during the differentiation of human

trophoblasts.,” *Development (Cambridge, England)*, vol. 113, no. 3, pp. 767–77, Nov. 1991, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1821848>

- [99] K. Fujisawa, K. Nasu, K. Arima, T. Sugano, H. Narahara, and I. Miyakawa, “Production of interleukin (IL)-6 and IL-8 by a choriocarcinoma cell line, BeWo,” *Placenta*, vol. 21, no. 4, pp. 354–360, 2000, doi: 10.1053/plac.1999.0494.
- [100] Y. Q. Koh, H. W. Chan, M. D. Nitert, K. Vaswani, M. D. Mitchell, and G. E. Rice, “Differential response to lipopolysaccharide by JEG-3 and BeWo human choriocarcinoma cell lines,” *European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology*, vol. 175, no. 1, pp. 129–133, 2014, doi: 10.1016/j.ejogrb.2013.12.032.
- [101] H. Liu, R. W. Redline, and Y. W. Han, “Fusobacterium nucleatum Induces Fetal Death in Mice via Stimulation of TLR4-Mediated Placental Inflammatory Response ,” *The Journal of Immunology*, vol. 179, no. 4, pp. 2501–2508, 2007, doi: 10.4049/jimmunol.179.4.2501.
- [102] G. Kaur and J. M. Dufour, “Cell lines,” *Spermatogenesis*, vol. 2, no. 1, pp. 1–5, Jan. 2012, doi: 10.4161/spmg.19885.
- [103] N. Yu, B. Zhang, M. Xu, S. Wang, R. Liu, J. Wu, J. Yang, and L. Feng, “Intrauterine administration of autologous peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) activated by HCG improves the implantation and pregnancy rates in patients with repeated implantation failure: a prospective randomized study,” *American Journal of Reproductive Immunology*, vol. 76, no. 3, pp. 212–216, 2016, doi: 10.1111/aji.12542.



Low Abundance *Fusobacterium nucleatum* Supports Early Pregnancy Development – An *In Vitro* Study

Martha Heusler, Rebekka Einenkel, Jens Ehrhardt, Damián Oscar Muzzio *†
and Marek Zygmunt †

Department of Obstetrics and Gynecology, University of Greifswald, Greifswald, Germany

OPEN ACCESS

Edited by:

Sandra Maria Blois,
University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Germany

Reviewed by:

Sanjay Basak,
National Institute of Nutrition (ICMR), India
Gabrielle Rizzuto,
University of California, San Francisco, United States

*Correspondence:

Damián Oscar Muzzio
Damian.Muzzio@med.uni-greifswald.de

†These authors have contributed equally to this work and share last authorship

Specialty section:

This article was submitted to
Immunological Tolerance and Regulation,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 20 April 2021

Accepted: 13 August 2021

Published: 31 August 2021

Citation:

Heusler M, Einenkel R, Ehrhardt J, Muzzio DO and Zygmunt M (2021)
Low Abundance *Fusobacterium nucleatum* Supports Early Pregnancy Development – An *In Vitro* Study.
Front. Immunol. 12:698045.
doi: 10.3389/fimmu.2021.698045

Pregnancy success depends greatly on a balanced immune homeostasis. The detection of bacterial components in the upper reproductive tract in non-pregnant and pregnant women raised questions on its possible beneficial role in reproductive health. The local conditions that allow the presence of bacteria to harmonize with the establishment of pregnancy are still unknown. Among the described bacterial species in endometrial and placental samples, *Fusobacterium nucleatum* was found. It has been observed that *F. nucleatum* can induce tumorigenesis in colon carcinoma, a process that shares several features with embryo implantation. We propose that low concentrations of *F. nucleatum* may improve trophoblast function without exerting destructive responses. Inactivated *F. nucleatum* and *E. coli* were incubated with the trophoblastic cell lines HTR8/SVneo, BeWo, and JEG-3. Viability, proliferation, migratory capacity, invasiveness and the secretion of chemokines, other cytokines and matrix metalloproteinases were assessed. The presence of *F. nucleatum* significantly induced HTR8/SVneo invasion, accompanied by the secretion of soluble mediators (CXCL1, IL-6 and IL-8) and metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9). However, as concentrations of *F. nucleatum* increased, these did not improve invasiveness, hindered migration, reduced cell viability and induced alterations in the cell cycle. Part of the *F. nucleatum* effects on cytokine release were reverted with the addition of a TLR4 blocking antibody. Other effects correlated with the level of expression of E-cadherin on the different cell lines tested. Low amounts of *F. nucleatum* promote invasion of HTR8/SVneo cells and induce the secretion of important mediators for pregnancy establishment. Some effects were independent of LPS and correlated with the expression of E-cadherin on trophoblasts.

Keywords: microbiome, pregnancy, trophoblast, *Fusobacterium nucleatum*, HTR8/SVneo, BeWo, JEG-3

INTRODUCTION

It is estimated that a healthy adult hosts a number of bacteria comparable in magnitude with the number of own human cells. Commonly known, skin, gut and vagina are densely colonized body sites. The colon, the site where most bacteria reside, is estimated to contain around 3.8×10^{13} bacteria (1). The gut microbiota has established symbiotic relationships with the host bearing

mutualistic advantages for both, bacteria and the host. The human body, thereby, profits from pathogen defense, provision of metabolites and immunological challenges mediating enteric homeostasis. Alterations in its composition, instead, may cause several health problems (2).

The gut microbiome has its origin early in life and its development depends on several factors. The colonization and thus the composition is affected by the mode of birth (3), genetic factors, nutrition and the intake of antibiotics (4–6). In recent years, the hypothesis that the infant gut is colonized *in utero* has gained strength upon reports describing microbial communities in meconium from neonates delivered at full term by C-sections (7–10). The maternal origin of the *in utero* colonization is still under discussion, but maternal gut, uterine and oral microflora have been proposed as source as well (11). This assessment defies the consensus that has been assumed over 100 years that the healthy womb is sterile (12).

During pregnancy, immune homeostasis is crucial for pregnancy maintenance (13). Local and systemic immune adaptations facilitate the implantation and later the accommodation of the growing fetus (14–17). These adaptations include the promotion of uterine vascular remodeling and the induction of immune tolerance (18–24). Both maternal lymphocytes and fetal derived cells including trophoblast establish a complex interaction to balance the inflammatory environment providing protection against pathogens and the necessary cytokine milieu that allows local structural modifications during placentation (17, 25, 26).

Reports supporting the idea of the sterile womb were based on data obtained from culture-based methods. However, considering that only 1 % of the bacteria are cultivable, new methodologic approaches have been applied to revisit the sterile uterine model (27). A number of studies reported the presence of bacteria in healthy uterine cavity, placenta, umbilical cord and amniotic fluid (8, 28–31). Despite that, low bacterial loads were reported which are hardly differentiated from contaminations especially in the placenta (32–35). Furthermore, the mere detection of bacterial genetic material does not imply the presence of living bacteria. In this concern, more research is needed to clarify the impact of bacteria or bacterial products on pregnancy. Nevertheless, it has been speculated that they may play a role in priming fetal immune system or maternal inflammatory processes at the beginning of pregnancy (36, 37).

F. nucleatum a non-motile, non-spore-forming, gram-negative bacteria that belongs to the genus *Fusobacterium* of the family *Bacteroidaceae* (38) was found in healthy term placenta (28). It has been described as an opportunistic bacterium of the human oral cavity and one of the most frequent species causative of periodontitis. Moreover, *F. nucleatum* was found in several organs, and its presence in the colon has been linked to the promotion of carcinogenesis (39, 40).

Many studies have been performed to determine the mechanisms by which *F. nucleatum* is able to modify the tumor niche. The bacterium possesses several virulence factors that suppress immune cells, promote extracellular matrix (ECM) modifications, modify blood vessel formation and induce cell

growth (39, 41–48). Thereby, binding of *Fusobacterium* Adhesin A (FadA) to E-cadherin activates β-catenin signalling and promotes direct cancer cell proliferation. The immune suppressive capacity of *F. nucleatum* was demonstrated more than 30 years ago (49). The same authors identified later the *Fusobacterium* immunosuppressive protein (FIP) and its subunit FipA are responsible for the immunosuppressive capacity of *F. nucleatum* (50, 51). Recently, the protein Fap2 was shown to inhibit NK cells via TIGIT (T Cell Immunoreceptor With Ig And ITIM Domains), facilitating tumor evasion of the immune system (45). Moreover, *F. nucleatum* can also affect humoral response and monocyte activity (52–54).

Tumor developmental mechanisms show analogies to early pregnancy processes. These include the activation of pathways that promote cell motility. For example, the reduction of the expression of adhesion molecules as E-cadherin facilitates the loss of cell-cell interactions and the epithelial-mesenchymal transition (55, 56). Analogous to trophoblast invasion, tumor growth is also accompanied by modifications of the ECM (57) where matrix metalloproteinases (MMPs) play a fundamental role. It has been observed that *F. nucleatum* promotes tumorigenesis by increasing the release of MMPs. Indeed, *F. nucleatum* stimulates secretion of several MMPs from epithelial cells and macrophages (42, 43, 58) and acquires MMP-9 activity after binding of pro-MMP-9 (41). The FadA target protein, E-cadherin, is also expressed on trophoblasts in a time and location dependent manner during placental development (59–61). Expressed prominently on cytotrophoblasts in anchoring cell columns and villous trophoblasts, its expression is inversely proportional to the cell migratory capacity, being lower in extravillous trophoblasts (EVT). It has been observed that E-cadherin expression also is reduced from first to third trimester of pregnancy. While alterations in the expression of E-cadherin are associated with aberrant placentation (60), the impact of E-cadherin in cancer progression seems to depend on the cancer entity (62).

An infection can affect pregnancy not only by its virulence characteristics, but also by shifting the above mentioned inflammatory equilibrium (63). It has been proposed that placental inflammation is predominantly caused by maternal activation of TLRs (64). As shown in clinical trials, targeting bacterial infection does not warrant prevention of pregnancy complications (65). Hence, understanding immune functions at the fetomaternal interface is highly relevant. Recent studies unveiled the presence of low bacterial abundance in locations previously thought to be sterile [including endometrium, fallopian tubes (66–68) and placenta (28, 29)]. The fact that bacteria or bacterial components may be present at the fetomaternal interface challenges our understanding of local immune homeostasis.

We speculate that the presence of small numbers of *F. nucleatum* in the fetomaternal unit may influence trophoblast invasive capacity, by promoting ECM modifications and a tolerogenic surrounding micro-environment. In this work, we evaluate the effect of non-infective low concentrations of *F. nucleatum* on trophoblast biology.

MATERIAL AND METHODS

Cell Lines and Culture

HTR8/SVneo cells (LGC Standards, Wesel, Germany), a human first trimester extravillous trophoblast immortalized cell line, were cultured in RPMI 1640 (PAN-Biotech, Aidenbach, Germany) supplemented with 10% FBS (PAN-Biotech, Aidenbach, Germany) and 1% penicillin/streptomycin (PAN-Biotech, Aidenbach, Germany).

JEG-3 (LGC Standards, Wesel, Germany) and BeWo (LGC Standards, Wesel, Germany), both human chorioncarcinoma cell lines with similar phenotype to cytotrophoblasts, were cultured in DMEM/F12 (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Germany) supplemented with 10% FBS and 1% penicillin/streptomycin. All cells were cultured at 37°C and 5% CO₂ under humidified conditions.

Preparation of Inactivated Bacteria for Stimulation

F. nucleatum

F. nucleatum culture was kindly provided by Elsa Baufeld (Friedrich-Loeffler-Institut, University Medicine Greifswald) after growth on BD Columbia Agar with 5% Sheep Blood (BD, Franklin Lakes, USA) under anaerobic conditions in BD GasPak (EZ pouch system BD, Franklin Lakes, USA). As obligate anaerobes, bacteria were killed by exposure to oxygen for at least 72 h keeping their structure unaltered (69). Inactivated bacteria were scraped off with sterile inoculating loops and washed in phosphate buffered saline (PBS; PAN-Biotech, Aidenbach, Germany). After centrifugation for 30 min at 4°C and 12 000 × g supernatant was discarded and the pellet was resuspended in PBS.

For stimulation, inactivated bacteria were used in a serial 10-fold dilution to cover a range of MOI (multiplicity of infection) between 10 and 1 000 times lower than MOI commonly used for *in vitro* infections (45, 70–72).

E. coli

E. coli was cultured in LB medium (Lennox; Carl Roth, Karlsruhe, Germany) overnight. The suspension was centrifuged for 30 min at 4°C and 12 000 × g. The pellet was resuspended in 96% ethanol (Carl Roth, Karlsruhe, Germany) and incubated for 5 min to inactivate the bacteria, keeping their structure unaltered. Afterwards the suspension was washed and resuspended in PBS. As done with *F. nucleatum*, only inactivated bacteria were used in the experiments.

Bacterial concentration was calculated measuring the optical density assessed by the IMPLEN Nanophotometer as performed by Tuttle and colleagues (73).

Invasion Assay

4 × 10⁵ HTR8/SVneo cells were treated with inactivated *F. nucleatum* (bacteria:cell ratio of 1:100 = 0.01, 1:10 = 0.1, 1:1 = 1, 10:1 = 10) or 10 ng/mL LPS for 6 h. Conditioned media (CM) was collected and spheroids were consequently created in 5% methyl cellulose in U-well plates overnight. Spheroids were embedded in matrigel (10 mg/mL; Corning, New York, USA).

After polymerization at 37°C for 2 h the collated CM was added. The growth of cell branching structures (“Sprouting”) was observed and documented at the light microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany). The area formed by connected sprout tips was measured at 0 h, 24 h and 48 h and analyzed with ImageJ.

Cell Migration

Cell migration of HTR-8/SVneo and BeWo was assessed in a scratch assay. 2 × 10⁵ trophoblast cells were cultured in a 24-well plate. Confluent cell monolayer was scratched with a pipette tip. Medium was aspirated and cells were rinsed with warm (37°C) PBS twice. Afterwards control media or stimulation media (positive control EGF (Biomol, Hamburg, Germany) 40 ng/mL; inactivated *F. nucleatum/E. coli* 2 × 10³; 2 × 10⁴; 2 × 10⁵; 2 × 10⁶) were added. The cell-free area was measured at 0 h and 12 h (HTR8/SVneo) or 30 h (BeWo) (Zeiss, software: ZEN 2012 SP2) with ImageJ software and MRI Wound Healing Tool macro.

Cell Viability

Cell viability of HTR8/SVneo, JEG-3 and BeWo was determined after stimulation with inactivated *F. nucleatum* using the CellTiter-Blue® Cell Viability Assay (Promega, Mannheim, Germany). The assay is based on the capacity of living cells to convert resazurin (a redox dye) into resorufin (a fluorescent product). 5 × 10³ cells per well were cultured in a 96-well plate. After 30 min incubation, *F. nucleatum* suspensions were added (0; 500; 5 × 10³; 5 × 10⁴). After 2, 24 or 48 h incubation 20 μL CellTiter-Blue® was added and incubated for 1 h at 37°C. Fluorescence was measured with BMG FLUOstar OPTIMA Microplate Reader.

In-Cell Western Assay

E-cadherin expression was determined by In-Cell Western Assay. 2 × 10⁴ cells per well were cultured in a 96-well plate and incubated for 3 h at 37°C to assure adequate attachment. Cells were fixed with 3.7% formaldehyde (Carl Roth, Karlsruhe, Germany) in PBS for 20 min at room temperature. Subsequently, cells were permeabilized by adding cold methanol (Carl Roth, Karlsruhe, Germany) and shaken on ice for 20 min. Cells were then washed with PBS and blocked with Odyssey Blocking Buffer (LI-COR Biotechnology, Bad Homburg, Germany) for 90 min at room temperature. The cells were then incubated with primary antibody (E-Cadherin (24E10) Rabbit mAb, Cell Signaling Technology, Leiden, Netherlands) diluted in Odyssey Blocking Buffer at 4°C overnight. Cells were washed with washing buffer [PBS; 0.1% Tween 20 (Carl Roth, Karlsruhe, Germany)] and incubated with secondary antibody (IRDye® 800CW Goat anti-Rabbit IgG (H + L), LI-COR Biotechnology, Bad Homburg, Germany) and DRAQ5 (Cell Signaling Technology, Leiden, Netherlands), as a normalization control for cell number, diluted in antibody buffer (Odyssey Blocking Buffer; 0.2% Tween 20) for 60 min at room temperature. The cells were washed with washing buffer. The plate was measured with Li-Cor Odyssey Infrared Imager and analysed with Image Studio (LI-COR Biotechnology, Bad Homburg, Germany).

Apoptosis Rate and Cell Cycle Analysis

Apoptosis rate was determined using the FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit II (BD Biosciences, Heidelberg, Germany) according to manufacturer's instructions. Cell cycle analysis was performed with propidium iodide (PI; Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Germany) flow cytometric assay (74). For both experiments cells were cultured in a 48-well plate. After 30 min incubation, inactivated *F. nucleatum* were added (0; 3×10^3 ; 3×10^4 ; 3×10^5). After 2, 24 or 48 h incubation the cells were detached and stained. Measurement was done using a BD FACSCanto Flow Cytometer. Data was analysed with FlowJo software.

For cell cycle analysis, cells were stained with 50 µg/ml PI in hypotonic lysis buffer [0.1% Trinatriumcitrat-2-hydrate (Carl Roth, Karlsruhe, Germany); 0.1% Triton-X-100 (Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Germany)]. The measurement followed immediately applying a BD FACSCanto Flow Cytometer. The FlowJo cell cycle analysis tool with univariate pragmatic model by Watson (75) was used to differentiate between G0/1; S; G2/M phases.

Determination of Cytokine- and Matrix Metalloproteinases Secretion

The secretion of cytokines including chemokines (IL-6, IL-8, CXCL1; IL-1 β) and matrix metalloproteinases (MMP-2, MMP-9) was determined by ELISA (human IL-6; CXCL8/IL-8; CXCL1/GRO- α ; IL-1 β ; MMP-2; MMP-9 DuoSet ELISA, R&D, Abingdon, United Kingdom). 1×10^5 cells per well were cultured in a 24-well plate and incubated for 30 min at 37°C. The cells were then treated with 0; 10^3 ; 10^4 or 10^5 inactivated *F. nucleatum* or 10^5 inactivated *E. coli*. Supernatants were collected after 2 h; 4 h; 8 h; 24 h or 48 h and centrifuged for 10 min at 4°C and 13 000 $\times g$ to remove dead cells and bacteria and stored at -80°C. The ELISAs were performed according to manufacturer's protocol. BMG FLUOstar OPTIMA Microplate Reader was used to assess colour changes and calculate the concentrations.

TLR4 Blocking

5×10^4 HTR8/SVneo cells per well were cultured in a 48-well plate and incubated for 30 min at 37°C. PAb-hTLR4 (TLR4 blocking antibody; InvivoGen, Toulouse, France) was added. After 1 h incubation the cells were stimulated with 5×10^4 inactivated *F. nucleatum*. Supernatants were collected after 48 h and stored at -80°C.

Multiplex Assay

5×10^4 HTR8/SVneo or 10^5 BeWo cells per well were cultured in a 48-well plate. After 1 h incubation the cells were stimulated with inactivated 5×10^4 *F. nucleatum*. After 48 h, the supernatant was discarded, and the cells were lysed following the protocol provided by the analyzing kit manufacturer. Proteins (3.7 – 12.2 µg per well as assessed by BCA assay) were analyzed using the NF-κB Signaling 6-plex Magnetic Bead Kit (Merck-Millipore, Massachusetts, USA) and measured in a Bio-Plex 200 System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA). Data was expressed as fluorescence intensity normalized to the protein amount per well (IF/µg).

Immunofluorescence

8×10^3 cells per well were seeded in 160 µg/mL collagen G coated µ-Slides (Ibidi, Munich, Germany) and incubated overnight at 37°C in their corresponding media. The following day, TLR4 (PAb-hTLR4 (5 µg/mL), VIPER (5 µM; TLR4 Inhibitor Peptide Set, Novus Biologicals, Wiesbaden Nordenstadt, Germany) and Pitstop 2 (50 µM; Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Germany) were added to the corresponding wells 1 h before treatment with inactivated *F. nucleatum* in a 1:1 proportion. After 1 h stimulation, culture media was discarded and cells were fixed with 4 % paraformaldehyde. Immune staining was performed with Phospho-NF-κB p65 (Ser536) (clone 93H1; 1:200) Rabbit mAb or β-Catenin (clone L54E2; 1:200) Mouse mAb (CellSignalling Technology, Frankfurt, Germany) overnight. The staining with secondary antibodies was performed for 2 h at RT in the dark with Goat anti-Mouse IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 594 (ThermoFisher Scientific, Schwerte, Germany) and Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488 (ThermoFisher Scientific, Schwerte, Germany), both in a concentration of 1:500. Slides were stained with 1 µg/mL Hoechst 33258 and analyzed on a Zeiss Axiom microscope at 60×. The exposure time was set constant for each cell line across experiments (green channel: 840 ms; red channel: 400 ms; blue channel: 17 ms). The quantification of fluorescence signal was performed with ZEN 2012 Blue Edition.

Statistics

Experiments were performed independently in replicates as described in the figure legends. Data were analyzed by GraphPad Prism 5 and 8. Data were assumed normally distributed. For the effect of bacterial treatment on trophoblast biology concerning invasion, migration, viability, apoptosis, cell cycle and cytokine expression Repeated Measures ANOVA with Dunnett's multiple comparison post test or Šídák's multiple comparison test was performed. Significant differences were indicated with asterisks * $p_{adj} < 0.05$; ** $p_{adj} < 0.01$; and *** $p_{adj} < 0.001$.

RESULTS

High Concentrations of Inactivated *F. nucleatum* Reduce Trophoblast Viability

During the remodelling of spiral arteries, trophoblast invasion is associated with a constant turnover including cycles of apoptosis and cell growth (76). We assessed cell viability in trophoblasts treated with *F. nucleatum* (Figure 1A). No effect on HTR8/SVneo viability was observed at 2 h. Compared to unstimulated control, the viability of HTR8/SVneo cells was significantly reduced after 24 and 48 h after stimulation with *F. nucleatum* concentrations of 1 bacterium per cell and 10 bacteria per cell.

Similar to HTR8/SVneo, JEG-3 viability was significantly reduced after 24 h and 48 h but only by a concentration of 10 bacteria per cell at 24 h and 48 h. In contrast to HTR8/SVneo and

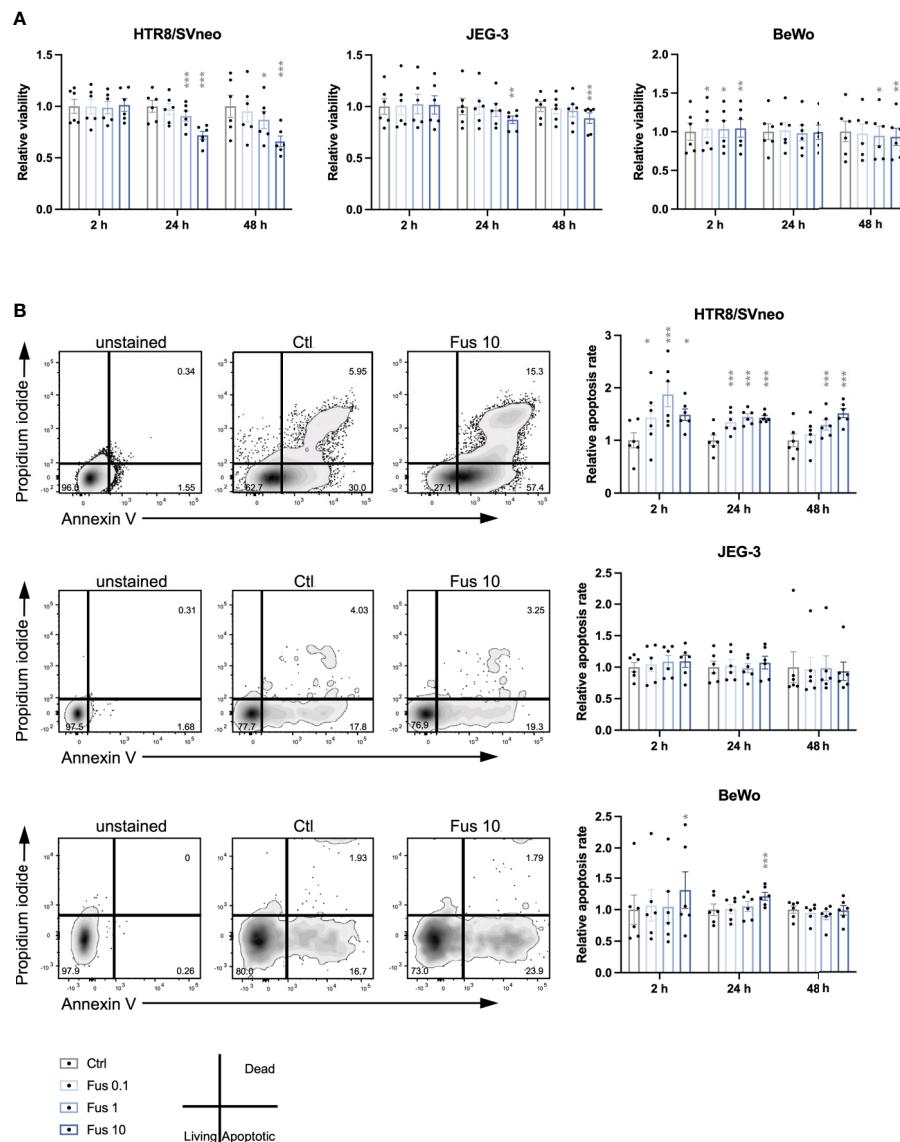


FIGURE 1 | Reduced viability and increased apoptosis rate of HTR8/SVneo cells was seen in response to high concentrations of inactivated *F. nucleatum*. Bar graphs represent viability of trophoblast cell lines after stimulation with *F. nucleatum* normalized to respective controls (**A**). Representative plots for the analysis of apoptosis rate of HTR8/SVneo, JEG-3 and BeWo cells by flow cytometry (**B** left). Bar graphs show apoptosis rate of trophoblast cell lines after stimulation with *F. nucleatum* normalized to respective controls (**B** right). Normalized data represent the quotient of each value to the mean of untreated controls. Data are presented as mean \pm SEM. * $p_{adj} < 0.05$; ** $p_{adj} < 0.01$; *** $p_{adj} < 0.001$ as analysed by Repeated Measures ANOVA with Dunnett's multiple comparison post test, comparing each treatment against the corresponding control. Experiments were performed 6 times in sextuplicate (**A**) or in triplicates (**B**). Each point represents the mean value of the replicates for each experiment. Ctl, control; Fus, ratio of *F. nucleatum* to cell number.

JEG-3, BeWo cells showed a different pattern in their viability after treatment with *F. nucleatum*. While all *F. nucleatum* concentrations increased viability after 2 h, concentrations of 1 and 10 bacteria per cell had a negative effect on viability after 48 h.

Overall, we observed that the viability of the cell lines varied in response to treatment with inactivated *F. nucleatum*. High concentrations of inactivated *F. nucleatum* decreased viability of HTR8/SVneo and BeWo cells after 24 and 48 h treatment.

In contrast, a short stimulation with bacteria (2 h) enhanced cell viability in BeWo cells.

Higher *F. nucleatum* Concentrations Increase Apoptosis Rate in HTR8/SVneo and BeWo

Considering the effects of *F. nucleatum* treatment on trophoblast viability, the apoptosis rate was consequently assessed (**Figure 1B**). In HTR8/SVneo, a significant increase of the

frequency of apoptotic cells by all *F. nucleatum* concentrations was visible after 2 h and 24 h. After 48 h, the apoptosis rate was increased by *F. nucleatum* concentrations of 1 bacterium per cell and 10 bacteria per cell but not by concentrations of 0.1 bacterium per cell.

In contrast to HTR8/SVneo, the apoptotic rate of both choriocarcinoma cell lines was less affected by inactivated *F. nucleatum*. While apoptosis in JEG-3 cells was not influenced by the treatment, BeWo cells increased apoptosis rate by *F. nucleatum* concentrations of 10 bacteria per cell at 2 h and 24 h.

In terms of induction of apoptosis, HTR8/SVneo cells showed an increased susceptibility to *F. nucleatum* compared to BeWo and especially JEG-3 cells.

Lower Concentration of *F. nucleatum* Supports Trophoblast Invasion

To test our hypothesis that low concentrations of *F. nucleatum* may improve trophoblast invasiveness, an invasion assay using trophoblast spheroids embedded in matrigel was performed (**Figures 2A, B**). After treatment with *F. nucleatum*, the sprouting area formed by connecting sprout tips was assessed after 48 h and normalized to the initial spheroid area at 0 h.

HTR8/SVneo cells tended to increase invasion depth (area formed by the connection of the outer sprout tips) with rising bacterial concentration. Compared to the control, this increase was significant for 0.1, up to 1 bacteria per cell but decreased to control level with higher bacterial concentration (10 bacteria per cell).

Lower Bacterial Amounts Do Not Affect Trophoblast Migration

Invasion is a complex mechanism of matrix degeneration and cellular motility. In order to determine the mechanisms by which *F. nucleatum* promoted trophoblast invasiveness, we studied effects of bacteria treatment on cell migration. In contrast to the effects observed in invasiveness, no significant effects were observed for the treatment with low concentrations of bacteria up to a ratio of one bacterium per cell. However, treatment with *F. nucleatum* at a ratio of 10 bacteria per cell lead to a significant decrease in the migratory capacity of HTR8/SVneo (**Figures 2C, D**).

E. coli treatment did not significantly influence migration of HTR8/SVneo. On BeWo cells, neither *E. coli* (data not shown) nor *F. nucleatum* stimulation had any significant effect on cell migration (**Figure 2C**).

As the re-growth of the scratched area depends not only on cell viability but also proliferation, we moved forward to assess this in trophoblasts treated with *F. nucleatum*.

***F. nucleatum* Induces Growth Arrest in JEG-3 and BeWo but Turnover in HTR8/SVneo**

To test the biological effect of *F. nucleatum* on trophoblast proliferation behaviour, we investigated the cell cycle phases with DNA staining and flow cytometry (**Figure 3**).

In the HTR8/SVneo cell line, *F. nucleatum* induced an increment of the proportion of cells in the G2/M phase at

ratios 1 and 10 bacteria per cell. After 24 h, this was accompanied by a decrease of cells in S phase. The effects of 0.1 bacteria per cell were observed only after 48 h. Here, an increment of the G0/G1 phase and a decrease of S phase was induced after treatment.

In contrast to HTR8/SVneo cells, JEG-3 cells reacted to the treatment with *F. nucleatum* through a reduction of the G2/M phase after 2 h (at ratios 1 and 10) and 24 h (all concentrations). These changes were accompanied by an increment of the G0/G1 phase and, after 24 h, a reduction of the S phase. After 48 h, only significant changes in the G0/G1 phase (an increment) could be observed at ratios 1 and 10.

Similar to JEG-3 cells, *F. nucleatum* treatment led to a reduction of the G2/M phase (after 2 h at ratios 1 and 10, after 24 h at a ratio of 0.1) and an accumulation of cells in the G0/G1 phase (after 2 h at ratios 1 and 10, after 24 h for all ratios) in BeWo cells. Ratios of 10 bacteria per cell also reduced the S phase after 24 h and 48 h.

Overall, we observed that *F. nucleatum* treatment led to an increased proportion of cells in G2/M of HTR8/SVneo, but to an accumulation of cells in G0/G1 of JEG-3 and BeWo.

***F. nucleatum* Treatment Induces Secretion of Pro-Invasive Mediators in HTR8/SVneo but Not in BeWo**

Certain pro-inflammatory cytokines, acting paracrinally or autocrinally, promote invasion of trophoblasts. Furthermore, trophoblasts secrete matrix metalloproteinases (MMPs) facilitating the invasion of trophoblasts. We analyzed the effect of *F. nucleatum* treatment on the secretion of pro-inflammatory cytokines and MMPs in trophoblasts cell lines.

CXCL1, IL-8 and MMP-9 were only detectable in the supernatants of HTR8/SVneo, but not in BeWo nor JEG-3 supernatants (**Figure 4A**). The chemokine CXCL1 was induced after 24 h and 48 h of treatment with *F. nucleatum* at a ratio of 1 bacterium per HTR8/SVneo cell. Similarly, after 24 h an induction of IL-8 and MMP-9 secretion could be detected at a ratio of 1 bacterium per HTR8/SVneo cell. In contrast, *E. coli* stimulation induced the secretion of CXCL1, IL-8 and MMP-9 in all time points analyzed.

IL-6 and MMP-2 were detectable in the supernatants of both HTR8/SVneo and BeWo (**Figure 4B**).

The secretion of IL-6 by HTR8/SVneo was increased by *F. nucleatum* as well as *E. coli* stimulation in all time points. In contrast, the treatment of BeWo cells with *F. nucleatum* led to a decreased IL-6 secretion, while no effect of *E. coli* treatment could be observed. Similarly, *F. nucleatum* stimulation induced MMP-2 secretion from HTR8/SVneo, but decreased it in BeWo cells. No significant effect was observed after treatment with *E. coli* in both cell lines.

IL-1 β concentration was below the detection threshold of 250 pg/mL in all trophoblast cell supernatants.

Similar to the previous results, HTR8/SVneo showed a stronger reaction as compared to BeWo. High bacterial concentrations led to a stronger secretory response in HTR8/SVneo (CXCL1, IL-6, IL-8, MMP-2 & -9). However, in BeWo

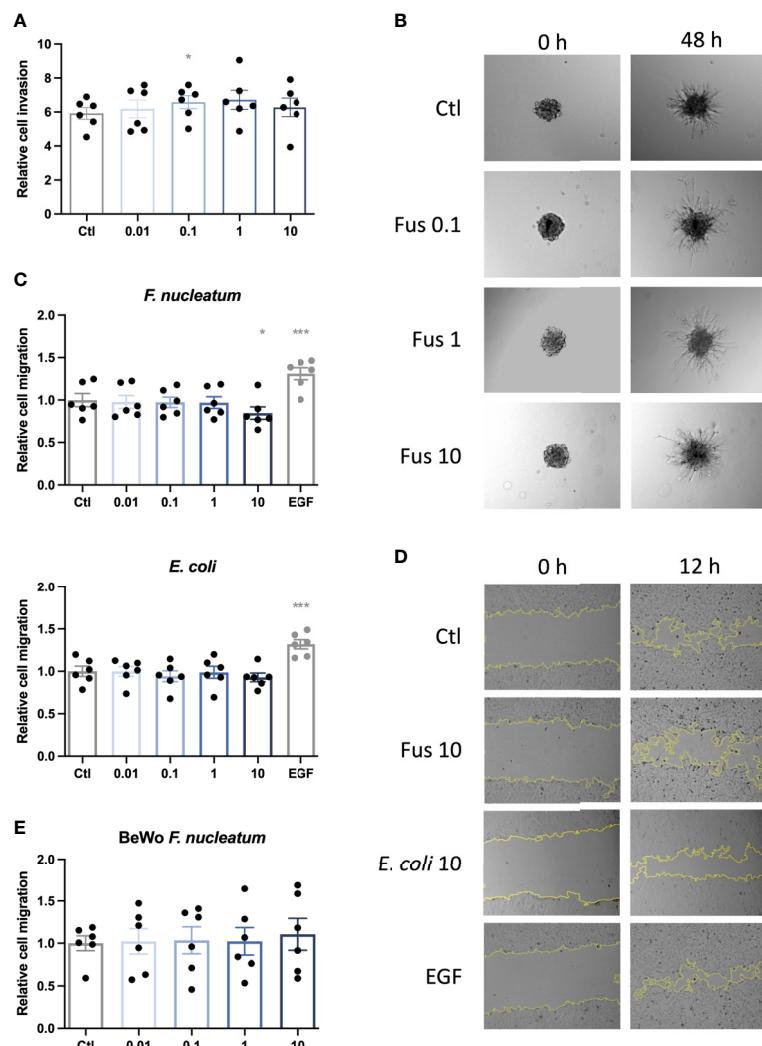


FIGURE 2 | Low concentrations of inactivated *F. nucleatum* promote HTR8/SVneo invasion; high concentration of inactivated *F. nucleatum* impairs migration of HTR8/SVneo cells. HTR8/SVneo cells were stimulated with *F. nucleatum* for 6 h using indicated bacteria:trophoblast ratios. After culture in methyl cellulose-containing medium, spheroids were embedded in matrigel and observed to analyse invasive behaviour (**A, B**). Bar graph shows relative sprouting expansion after 48 h normalized to spheroid size at 0 h (**A**). Data are presented as mean \pm SEM and were analysed by Repeated Measures ANOVA with Dunnett's multiple comparison post test, comparing each treatment against the corresponding control. * $p_{adj} < 0.05$. Representative microscopic images are shown (**B**). Experiments were performed 6 times. Scratch assay was performed to assess the migratory behaviour of bacteria-treated trophoblasts (**C–E**). EGF was used as positive control. Inactivated bacteria were added in different ratios (0.01; 0.1; 1; 10 bacteria per trophoblast cell). Bar graphs represent relative area recovered by HTR8/Svneo treated with either *F. nucleatum* (above) or *E. coli* (below) after 12 h (**C**) or BeWo treated with *F. nucleatum* after 30 h (**E**) normalized to unstimulated control. Data are presented as mean \pm SEM. * $p_{adj} < 0.05$; *** $p_{adj} < 0.001$ as analysed by Repeated Measures ANOVA with Dunnett's multiple comparison post test, comparing each treatment against the corresponding control. Experiment was performed 6 times in quadruplicate (**C**) or triplicate (**E**). Each point represents the mean value of the replicates for each experiment. Representative microphotographs of HTR8/SVneo taken with a 10 \times objective taken after 0 and 12 h of the scratch (**D**). EGF, epidermal growth factor; Ctl, control.

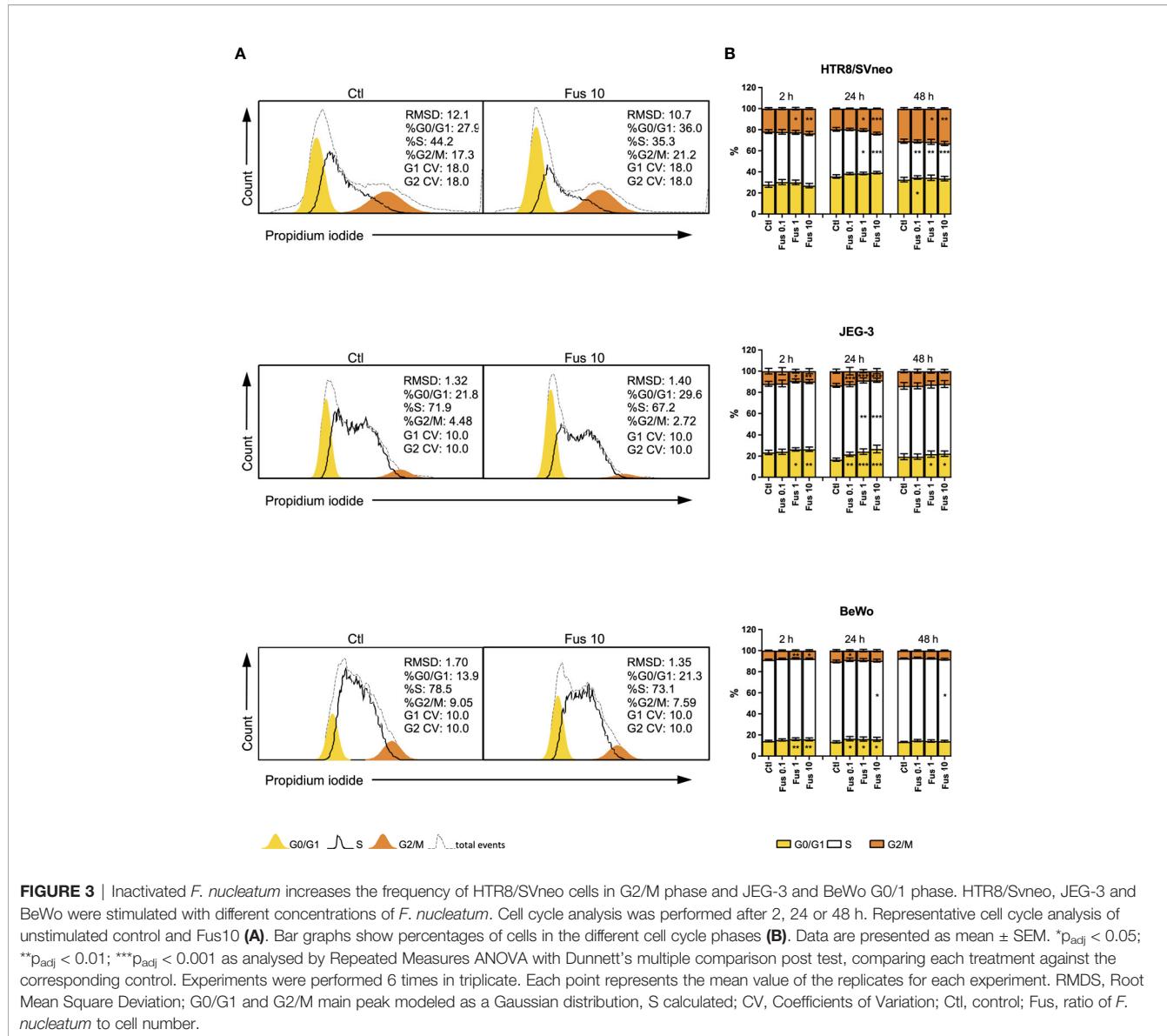
cells responded with a decreased release of the investigated factors (IL-6, MMP-2) even with the low bacterial concentration.

NF- κ B Mediates TLR4 Dependent *F. nucleatum* Actions on HTR8/SVneo Cells

The differences in the response to bacteria between HTR8/SVneo and both, JEG-3 and BeWo cell lines, suggested that there may be differences in the ability to sense *F. nucleatum*.

Since the interaction between *F. nucleatum* protein FadA and epithelial cells results from the interaction with E-cadherin (44), the basal expression of E-cadherin on the cell lines was assessed (**Figures 5A, B**). The relative E-cadherin signal (normalized as a ratio to HTR8/SVneo signal) was ~10 times higher in BeWo and JEG-3 than in HTR8/SVneo.

Besides the interaction with E-cadherin, gram-negative bacteria can be sensed by their LPS via TRL4 signalling and cause a pro-



inflammatory reaction as observed in HTR8/SVneo. Interestingly, it has been observed that BeWo respond less sensitively to LPS stimulation than other trophoblast cells lines as JEG-3 and do not follow classical NF- κ B pathway activation (77). In order to determine the impact of TLR4-dependent signalling, we performed the experiments in the presence and absence of a TLR4-blocking antibody (**Figure 5C**). The presence of the antibody led to a significant dose-dependent reduction of *F. nucleatum*-induced IL-6 secretion in HTR8/SVneo. Furthermore, *F. nucleatum* induced the activation of the NF- κ B pathway, leading to increased phosphorylation of the IKK α kinase (IKK α) in HTR8/SVneo while no activation of IKK α was detected in BeWo cells (**Figure 5D**).

To gain further insights into the signaling pathways triggered by *F. nucleatum* following TLR4 and E-cadherin activation, NF- κ B and β -catenin were analyzed microscopically in the presence of inactivated *F. nucleatum* and inhibitors of TLR4 and E-

cadherin pathways. Untreated HTR8/SVneo and BeWo cells showed cytoplasmic expression of NF- κ B. After 1 h treatment, NF- κ B was detected predominately close to and within the nucleus of HTR8/SVneo cells (**Figure 6**, top). The addition of TLR4-blocking antibody or the inhibitor TLR4-VIPER prior to bacterial treatment reverted this activation.

The transcription factor β -catenin mediates E-cadherin signals triggered by the binding of the *F. nucleatum* FadA adhesin molecule. BeWo cells displayed higher levels of β -catenin expression than HTR8/SVneo cells. Nuclear localization of β -catenin was found in a low number of cells BeWo, slightly more frequently after treatment with *F. nucleatum*. The use of the β -catenin inhibitor Pitstop 2 led to a slightly less, but not significant reduction of β -catenin signal after *F. nucleatum* treatment.

This data confirms that *F. nucleatum* triggers TLR4/NF- κ B pathway activation and suggests that E-cadherin/ β -catenin

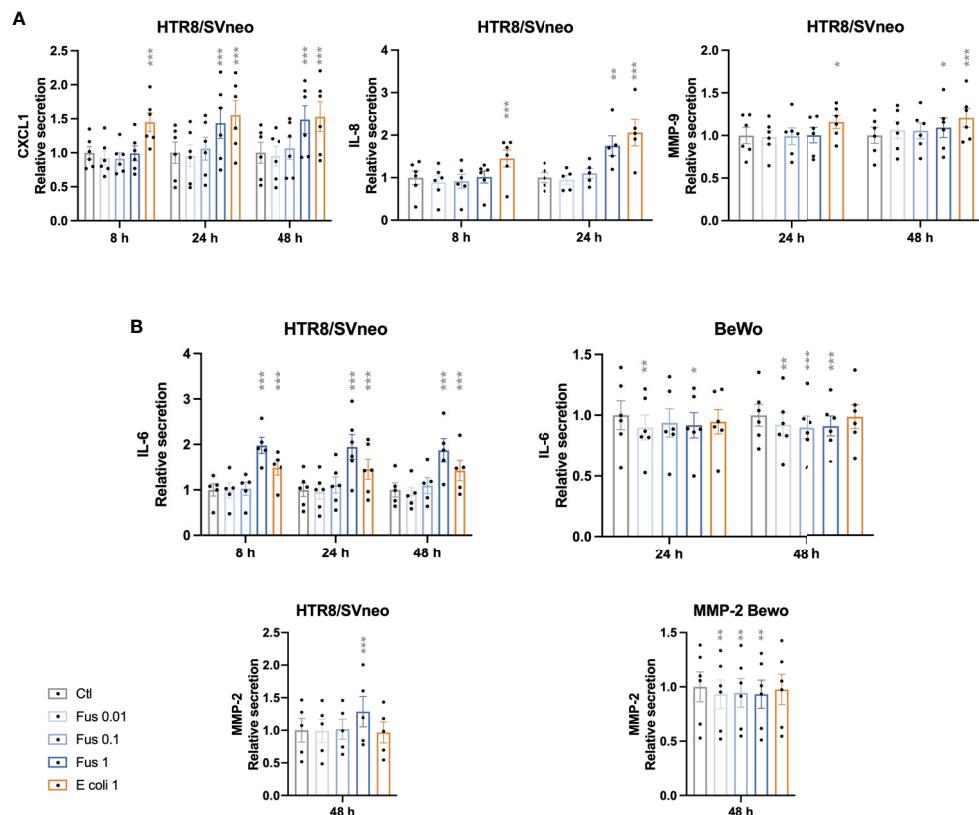


FIGURE 4 | Inactivated *F. nucleatum* and *E. coli* augment secretion of pro-inflammatory cytokines and MMPs by HTR8/SVneo cells. Bar graphs represent secretion of cytokines and matrix metalloproteinases (MMP) by trophoblast cell lines after stimulation with *F. nucleatum* normalized to respective unstimulated controls (A, B). Data are presented as mean \pm SEM. $*p_{adj} < 0.05$; $**p_{adj} < 0.01$; $***p_{adj} < 0.001$ as analysed by Repeated Measures ANOVA with Dunnett's multiple comparison post test, comparing each treatment against the corresponding control. Experiments were performed 5 (IL-8, MMP-2 and IL-6 in HTR8/SVneo) or 6 (CXCL1, MMP-9 and IL-6 in BeWo) times in duplicate. Each point represents the mean value of the replicates for each experiment. Ctl: control; Fus: ratio of *F. nucleatum* to cell number (if no number given ratio is 1); E. coli 1: ratio of *E. coli* to cell number = 1.

pathway is likely more predominant in BeWo than in HTR8/SVneo cells.

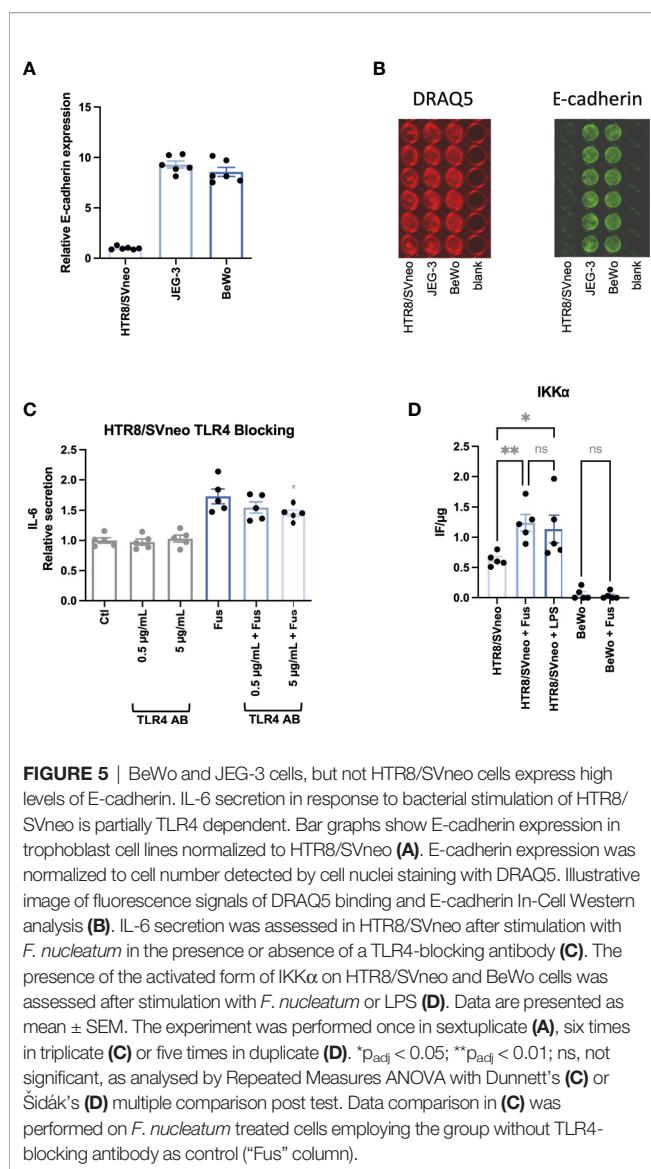
DISCUSSION

Although several studies support the idea that bacterial communities are present in the upper reproductive tract, their physiological impact remains still speculative. In this work, we have tested the hypothesis that the presence of low amounts of *F. nucleatum* can modulate trophoblast function without eliciting a major destructive inflammatory response.

It has been postulated that bacteria may exert a modulatory effect on trophoblast function through interactions between bacterial LPS and TLR4 expressed on the cell surface (36, 78). Both *E. coli* and *F. nucleatum* are gram-negative bacteria, thus they can induce LPS-mediated responses. Indeed, several studies addressed LPS-mediated effects of *F. nucleatum* in tumorigenesis and placental pathology (79–83). It is likely that the induction of pro-inflammatory responses we observed were LPS-mediated as well. However, certain responses differed between the treatments

with *F. nucleatum* and *E. coli* (release of cytokines including chemokines).

As comparable amounts of bacteria have been used, discrepancies between both responses may be caused by other bacterial components than LPS. *F. nucleatum* has several virulence factors and is known to possess immunomodulatory properties, including a number of cell-surface components called adhesins (45, 49–51, 84). The adhesin FadA, for example, binds E-cadherin and activates NF- κ B downstream (44). In the context of colorectal cancer, *F. nucleatum* is associated with the promotion of tumorigenesis and the modulation of the tumoral immune environment (44, 85, 86). At the same time, *F. nucleatum* has the ability to induce modifications of the extracellular matrix and promote tumor invasion (39, 41, 42, 58). In the fetomaternal interface, these processes are part of physiological adaptations that permit trophoblast invasion of uterine spiral arteries. Trophoblasts undergo phenotypical changes during placentation and in the course of pregnancy. This includes adaptations in changes of the expression of TLR4 and E-cadherin influencing presumably interactions with LPS and FadA, on the surface of *F. nucleatum*.



In our experiments, trophoblast cell lines responded differently to the same bacterial stimulation. In terms of antigen recognition, BeWo responds poorly to LPS stimulation and lacks LPS-mediated activation of the NF- κ B pathway (77). We observed that HTR8/SVneo responded to *F. nucleatum* stimulation in a more sensitive way than BeWo and JEG-3. In contrast to BeWo and JEG-3, HTR8/SVneo E-cadherin expression levels were lower. This supports the idea that *F. nucleatum* shapes the responses of JEG-3 and BeWo by FadA-E-cadherin interaction. JEG-3 cells, which express both functional TLR4 and high E-cadherin levels, showed a mild or an intermediate reaction to bacterial stimulation. Cytokines in the supernatant of bacteria-treated JEG-3 were under the limit of detection.

The use of trophoblast cell lines with different TLR4 function and E-cadherin expression allowed us to evaluate two scenarios, one in which TLR4-LPS interaction would predominate over

E-cadherin-FadA interactions (HTR8/SVneo), and a second one where E-cadherin is highly expressed and TLR4 is less functional (BeWo) (77). We speculate that the differences observed in the interaction between *F. nucleatum* and HTR8/SVneo, JEG-3 and BeWo cells depend on the balance between the relative expression of E-cadherin and the induction of TLR4-mediated signals. A deeper analysis of the activation of the signalling pathway depicted that, similar to LPS, *F. nucleatum* induced activation of the I κ B kinase α (IKK α), a downstream mediator of TLR4 activation pathway. Concomitantly, the treatment led to a nuclear translocation of NF- κ B. Furthermore, the use of a neutralizing antibody against TLR4 resulted in reduced cytokine production after treatment with *F. nucleatum*.

In the BeWo cell line, no activation of the TLR4 pathway could be detected by multiplex analysis. However, nuclear translocation of NF- κ B could be observed microscopically after 1 h treatment. In BeWo, the elevated expression of E-cadherin and β -catenin suggests a higher involvement of the E-cadherin/ β -catenin complex in the *F. nucleatum*-mediated effects on BeWo cells than in HTR8/SVneo cells. Further research is needed to determine precisely the molecular components involved in the interaction between *F. nucleatum* on BeWo.

Besides cell-line specific responses, we observed that presumably LPS-mediated actions (those observed in HTR8/SVneo and that were similar to the stimulation with *E. coli*) were only significant after reaching relatively high concentrations of bacteria. On the other hand, LPS-independent effects, as we observed in BeWo cells, were also evident with low concentrations of fusobacteria. *F. nucleatum* is a bacterium with proven placental tropism (87–90) and *F. nucleatum* infections have been associated with intra-amniotic infection and the induction of preterm birth (91–93). The involvement of *F. nucleatum* in early pregnancy disorders needs to be further investigated. First trimester infections are associated to placenta development problems (94–97). In the context of malaria, *Plasmodium*-infection affects the placental vascular development, as seen by a reduced transport capacity, syncytiotrophoblast knotting, thickening of the basal membrane, decreased trophoblast invasion and inflammatory disorders (disruption of the cytokine milieu and immune cell recruiting) (98). Our data suggests that uncontrolled infections with *F. nucleatum* in early pregnancy might impact placental development as well.

However, the presence of bacteria does not necessarily indicate an infection. It has been observed that trophoblasts can modulate the response of immune cells to LPS, leading to contradictory effects between low and high dose stimulations (99). This has been discussed as a possible mechanism to prevent excessive pro-inflammatory reactions leading to fetal damage. The benefit of weak LPS stimulation to restore fertility has been observed in animal models. Cows with purulent vaginal discharge treated with a low dose of LPS showed improved pregnancy rate as compared to treatment with high LPS concentrations (100, 101). Although, eutherian mammal placentation varies in their invasive and opposing nature between fetus and maternal tissue (humans: hemochorial, ruminants: syncytiotrophoblastic), it is driven by mild

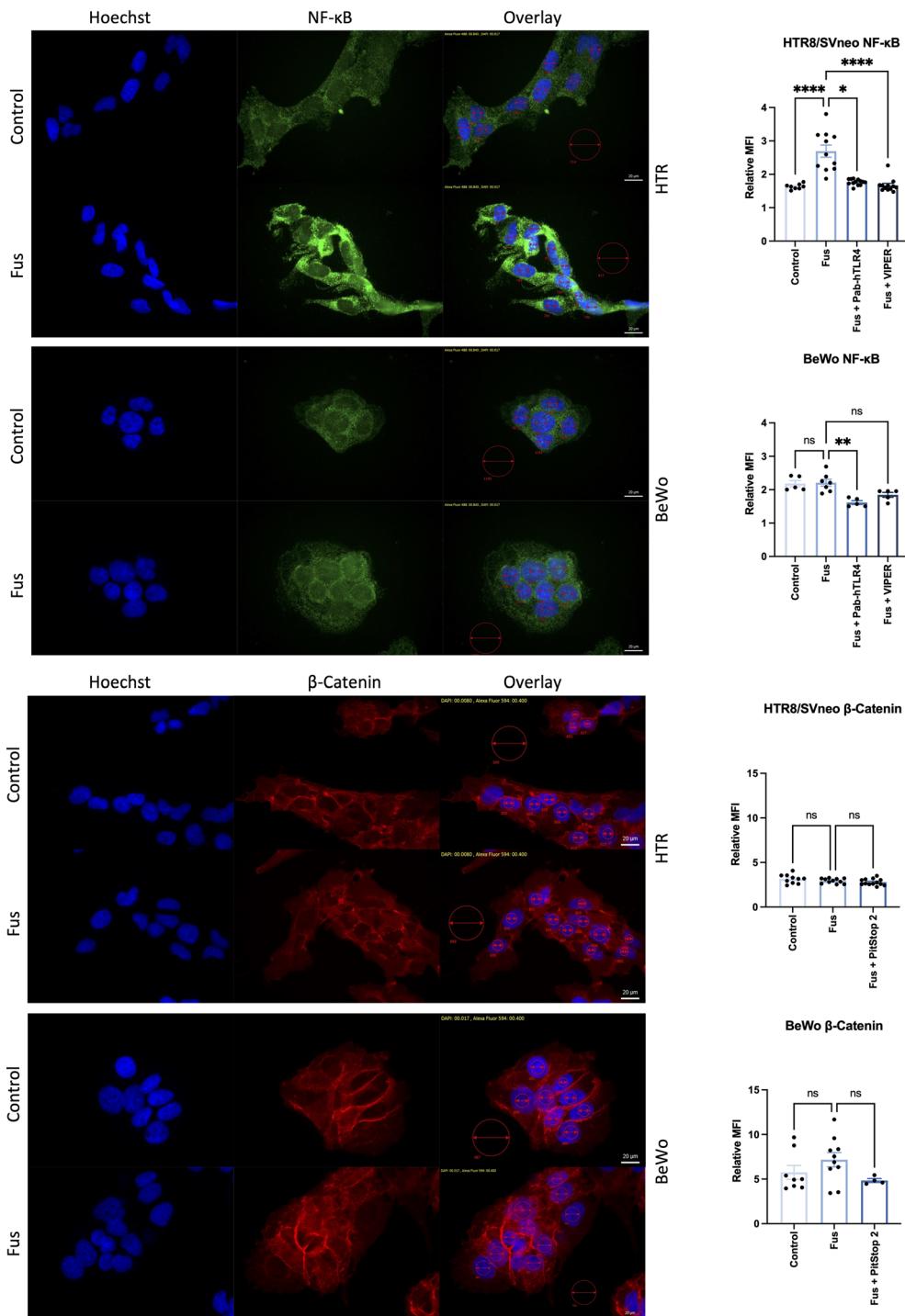


FIGURE 6 | Inactivated *F. nucleatum* induces NF-κB and β-catenin nuclear translocation. Immunofluorescence of NF-κB (top; green) and β-catenin (bottom; red) of untreated or inactivated *F. nucleatum*-treated (1 h, MOI = 1) HTR8/SVneo and BeWo cells. Some wells were previously treated with a neutralizing antibody against TLR4 (PAb-hTLR4; 5 µg/mL), the viral inhibitory peptide of TLR4 (VIPER; 5 µM) or Pitstop 2 (known to interfere with E-cadherin/β-catenin signaling) 1 h before bacteria treatment. Nuclei were stained with Hoechst 33258 (blue). Pictures were taken at 60× and the mean fluorescence intensity (MFI) of each channel were quantified in the nuclei (small red circles). All pictures were taken using the same exposure time (green channel: 840 ms; red channel: 400 ms; blue channel: 17 ms). Data (left) depict the MFI (mean ± SEM) of either NF-κB or β-catenin normalized to background (big red circle) for each picture shown. Data comparison was performed by ANOVA Kruskall-Wallis test with Dunn's multiple comparison test using *F. nucleatum* treated cells as control ("Fus" column). * $p_{adj} < 0.05$; ** $p_{adj} < 0.01$; *** $p_{adj} < 0.0001$; ns, not significant.

immunological activation, which is limited as exuberant activation would cause rejection. The studies describing mechanisms suppressing excessive pro-inflammatory responses at the fetomaternal interface suggest that the presence of bacteria in low concentrations or bacterial products can be well tolerated. Furthermore, it has been speculated that a weak, non-destructive activation of immune cells may actually be favorable in early pregnancy events as well (36, 37).

In order to evaluate possible mechanisms in which low, non-infective concentrations of bacteria may promote early pregnancy events, we studied the *F. nucleatum*-trophoblast interactions *in vitro*. In our experimental setup, we evaluated the role of increasing concentrations of *F. nucleatum* in a range which lies between 10 and 1 000 times lower than MOIs used in infection based *in vitro* experiments. Using this range, we aimed to detect the concentrations where the positive effects of *F. nucleatum* on trophoblast function overcome destructive excessive inflammatory responses. The analysis of the invasiveness of HTR8/SVneo depicts this concept perfectly, where a maximum effect can be observed around Fus0.1-1, while lower or higher concentrations seem to be less effective. Unfortunately, due to the fast migratory kinetics of HTR8/SVneo cells, it was not possible to perform the scratch assay at the same time point as the invasion assay. 12 h might be a precipitated time point to evidence positive effects of lower *F. nucleatum* concentrations on cell migration.

It can be speculated that the lower the concentration of *F. nucleatum* is, the weaker its effect on the release of soluble mediators that promote trophoblast invasiveness shall be (see schematic overview, Figure 7). In contrast, as the concentration of *F. nucleatum* increases, the excessive inflammatory effects on trophoblast may negatively affect their function. Indeed, the highest *F. nucleatum* concentration significantly dampened trophoblast migration, which also brought trophoblast invasion down to control levels.

The analysis of cell survival and the apoptosis rate after *F. nucleatum* treatment suggests that the negative effects on migration observed might be related to the reduced viability or an altered cell cycle after treatment. These negative effects of *F. nucleatum* increased with the concentration and were more evident in the HTR8/SVneo cell line.

After evidencing the effects that might negatively impact on trophoblast function, we focused on the factors that may improve it, especially under treatment with low concentrations of *F. nucleatum*. A factor by which bacteria could promote placentaion is by induction of MMPs which facilitate trophoblast invasion. MMPs dysregulation is associated to pregnancy problems (102). Deficient MMP expression may lead to hypertensive disorder and preeclampsia. Excessive MMP release, however, can lead to dysfunctional placentaion. In this concern, we observed that *F. nucleatum* could modulate MMP secretion.

We have also explored the capacity of bacteria to affect the release of immune mediators that may affect directly or indirectly functional aspects of trophoblast biology. Trophoblasts release immune mediators that: 1) recruit and modulate the function of several leukocytes populations (decidual NK cells, macrophages, etc) and 2) collaborate with crucial steps of placentation (103,

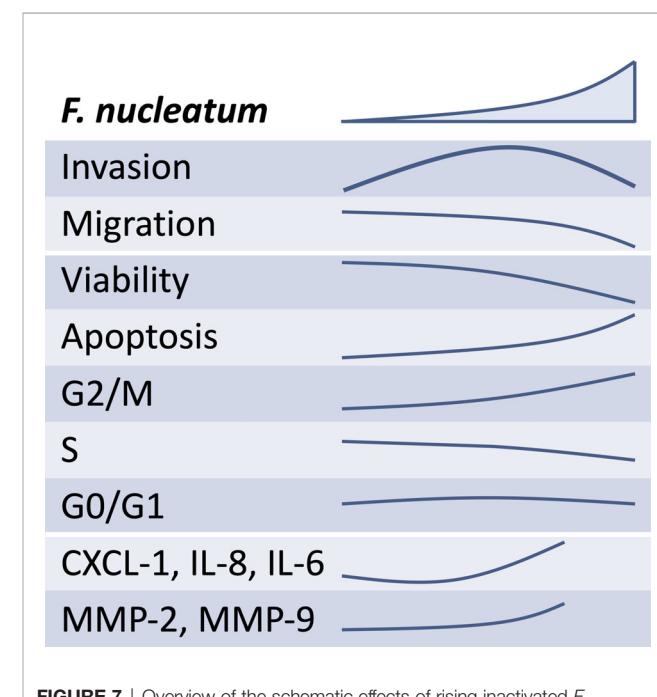


FIGURE 7 | Overview of the schematic effects of rising inactivated *F. nucleatum* concentrations on HTR8/SVneo. Main results of HTR8/SVneo trophoblastic cells in response to *in vitro* stimulation with *F. nucleatum* are summarized. *F. nucleatum* induced HTR8/SVneo invasion, secretion of soluble mediators (CXCL1, IL-6 and IL-8) and metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9). As concentrations of *F. nucleatum* increased, these did not improve invasiveness, hindered migration, reduced cell viability and induced alterations in the cell cycle.

104). As the treatment with *F. nucleatum* affected some of these cytokines, we speculate that these may later influence leukocyte recruitment and function and indirectly trophoblast function. In this scenario, chemokines induced by *F. nucleatum* may act synergistically with the arrival of leukocytes that are known to be important players of placental development, as macrophages and NK cells.

The fact that the cytokine secretion in HTR8/SVneo was induced both in response to *F. nucleatum* and *E. coli* treatment led us to a hypothesis that this effect was mediated by LPS. Furthermore, there was no induction of cytokine secretion by BeWo cells, which have a less sensitive TLR4-pathway. Finally, we showed that blocking or inhibition of TLR4 reduced the NF- κ B activation and cytokine secretion in *F. nucleatum*-treated HTR8/SVneo cells. We postulated that these interactions might be subjected to spatiotemporal conditions in the course of pregnancy, since trophoblast undergoes local and temporal changes in the expression of both TLR4 and E-cadherin. During first trimester, TLR4 is expressed by villous cytotrophoblast (CTB) and extravillous trophoblast cells (EVT), but not by syncytiotrophoblasts (105, 106). At term, TLR4 is expressed predominantly by syncytiotrophoblasts (105, 107). This pattern is thought to protect the first trimester fetus from deleterious pro-inflammatory responses caused by bacteria. On the other hand, E-cadherin is expressed in CTB but it is downregulated as EVTs acquire a more invasive phenotype.

In this scenario, *F. nucleatum* might interact with EVT secreting MMPs and inducing invasion through the decidual extracellular matrix, pro-inflammatory cytokines (including chemokines) to recruit and interact with decidual leukocytes. The presence of low concentrations of *F. nucleatum* could support the function of EVT. CTB, on the contrary, are in closer contact to the growing fetus. An excessive pro-inflammatory environment generated by activation of CTB could threaten fetal health.

The presence of bacteria in the placenta has been reported by histological techniques and later further investigated by molecular-based methods (29, 108, 109). Furthermore, as these studies are based on the detection of DNA, it cannot be clearly distinguished between bacteria and their products. In our experiments, however, we used inactivated cells. This means that bacterial components that reach target cells may induce similar responses. Furthermore, several gram-negative bacteria including *F. nucleatum* are characterized by the production and release of outer membrane vesicles (OMV). OMV play different roles (including bacterial communication, the modulation of virulence and immune response). As they are small enough to penetrate mucosal barriers, a remote modulatory mechanism of trophoblast function by *F. nucleatum* cannot be ruled out.

Based on our data, we suggest that the presence of low-concentration of commensal bacteria or bacterial products do not represent a threat to early pregnancy *per se*. Although the used concentrations only approached *in vivo* amounts, low bacterial concentrations may mildly stimulate trophoblast cells and support their invasive character. As the upper reproductive tract microbiome may deliver clues to possible, but yet unknown physiological regulation of trophoblast function, we encourage further research to elucidate their constructive role during early pregnancy. Precisely during the review process of this manuscript, a new study showing that *Lactobacillus crispatus* can promote HTR-8/SVneo invasion supports this idea and reinforces the need for deeper research on this field (110).

REFERENCES

1. Sender R, Fuchs S, Milo R. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biol* (2016) 14(8):e1002533. doi: 10.1371/journal.pbio.1002533
2. Clemente JC, Ursell LK, Parfrey LW, Knight R. The Impact of the Gut Microbiota on Human Health: An Integrative View. *Cell* (2012) 148(6):1258–70. doi: 10.1016/j.cell.2012.01.035
3. Martin R, Makino H, Cetinyurek Yavuz A, Ben-Amor K, Roelofs M, Ishikawa E, et al. Early-Life Events, Including Mode of Delivery and Type of Feeding, Siblings and Gender, Shape the Developing Gut Microbiota. *PLoS One* (2016) 11(6):e0158498. doi: 10.1371/journal.pone.0158498
4. Madan JC, Hoen AG, Lundgren SN, Farzan SF, Cottingham KL, Morrison HG, et al. Association of Cesarean Delivery and Formula Supplementation With the Intestinal Microbiome of 6-Week-Old Infants. *JAMA Pediatr* (2016) 170(3):212–9. doi: 10.1001/jamapediatrics.2015.3732
5. Mbakwa CA, Scheres L, Penders J, Mommers M, Thijs C, Arts IC. Early Life Antibiotic Exposure and Weight Development in Children. *J Pediatr* (2016) 176:105–13 e2. doi: 10.1016/j.jpeds.2016.06.015
6. Goodrich JK, Waters JL, Poole AC, Sutter JL, Koren O, Blekhman R, et al. Human Genetics Shape the Gut Microbiome. *Cell* (2014) 159(4):789–99. doi: 10.1016/j.cell.2014.09.053
7. Shi YC, Guo H, Chen J, Sun G, Ren RR, Guo MZ, et al. Initial Meconium Microbiome in Chinese Neonates Delivered Naturally or by Cesarean Section. *Sci Rep* (2018) 8(1):3255. doi: 10.1038/s41598-018-21657-7
8. Collado MC, Rautava S, Aakkila J, Isolauri E, Salminen S. Human Gut Colonisation May Be Initiated In Utero by Distinct Microbial Communities in the Placenta and Amniotic Fluid. *Sci Rep* (2016) 6:23129. doi: 10.1038/srep23129
9. Younge N, McCann JR, Ballard J, Plunkett C, Akhtar S, Araujo-Perez F, et al. Fetal Exposure to the Maternal Microbiota in Humans and Mice. *JCI Insight* (2019) 4(19):e127806. doi: 10.1172/jci.insight.127806
10. Stinson LF, Boyce MC, Payne MS, Keelan JA. The Not-So-Sterile Womb: Evidence That the Human Fetus Is Exposed to Bacteria Prior to Birth. *Front Microbiol* (2019) 10:1124. doi: 10.3389/fmicb.2019.01124
11. Walker RW, Clemente JC, Peter I, Loos RJF. The Prenatal Gut Microbiome: Are We Colonized With Bacteria *In Utero*? *Pediatr Obes* (2017) 12 Suppl 1:3–17. doi: 10.1111/jopo.12217
12. Baker JM, Chase DM, Herbst-Kralovetz MM. Uterine Microbiota: Residents, Tourists, or Invaders? *Front Immunol* (2018) 9:208. doi: 10.3389/fimmu.2018.00208
13. PrabhuDas M, Bonney E, Caron K, Dey S, Erlebacher A, Fazleabas A, et al. Immune Mechanisms at the Maternal-Fetal Interface: Perspectives and Challenges. *Nat Immunol* (2015) 16(4):328–34. doi: 10.1038/ni.3131

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

MH and RE performed experiments, analysed data, and contributed to the elaboration of the manuscript. JE performed experiments. MZ contributed with reagents, the design of experiments, and the writing of the manuscript. DM conceived and designed the experiments, analysed data, wrote the paper, and supervised the work. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

This study was supported by intramural funding from Greifswald University. We also acknowledge the support of the Research Network Molecular Medicine (Forschungsverbund Molekulare Medizin, FVMM, FOVB-2021-10).

ACKNOWLEDGMENTS

We kindly thank Elsa Baufeld from the Friedrich-Loeffler Institute of Medical Microbiology, University of Greifswald, for her support providing the strains of *F. nucleatum*. We also thank Maria Sztachelska for her valuable support with the immunostainings. The authors also acknowledge the Gerhard Domagk programme of the University Medicine Greifswald for its support to MH and the Landesgraduiertenförderung MV supporting RE.

14. Fröhlich C, Ehrhardt J, Krüger D, Trojnarska D, Zygmunt M, Muzzio DO. Pregnancy Status Alters IL-21-Mediated Effects on Murine B Lymphocytes. *Reproduction* (2020) 159(3):351–9. doi: 10.1530/REP-19-0407
15. Einenkel R, Packhäuser KRH, Ehrhardt J, Tüngler A, Zygmunt M, Muzzio DO. CD83 Is Locally Regulated and Differentially Expressed in Disturbed Murine Pregnancy. *Reproduction* (2019) 158(4):323–33. doi: 10.1530/REP-19-0171
16. Muzzio DO, Soldati R, Ehrhardt J, Utpatel K, Evert M, Zenclussen AC, et al. B Cell Development Undergoes Profound Modifications and Adaptations During Pregnancy in Mice. *Biol Reprod* (2014) 91(5):115. doi: 10.1093/biolreprod.114.12236
17. Robertson SA, Moldenhauer LM. Immunological Determinants of Implantation Success. *Int J Dev Biol* (2014) 58(2–4):205–17. doi: 10.1387/ijdb.140096sr
18. Jensen F, Muzzio D, Soldati R, Fest S, Zenclussen AC. Regulatory B10 Cells Restore Pregnancy Tolerance in a Mouse Model. *Biol Reprod* (2013) 89(4):90. doi: 10.1095/biolreprod.113.110791
19. Muzzio D, Zygmunt M, Jensen F. The Role of Pregnancy-Associated Hormones in the Development and Function of Regulatory B Cells. *Front Endocrinol (Lausanne)* (2014) 5:39. doi: 10.3389/fendo.2014.00039
20. Muzzio DO, Ziegler KB, Ehrhardt J, Zygmunt M, Jensen F. Marginal Zone B Cells Emerge as a Critical Component of Pregnancy Well-Being. *Reproduction* (2016) 151(1):29–37. doi: 10.1530/REP-15-0274
21. Packhäuser KRH, Roman-Sosa G, Ehrhardt J, Krüger D, Zygmunt M, Muzzio DO. A Kinetic Study of CD83 Reveals an Upregulation and Higher Production of Scd83 in Lymphocytes From Pregnant Mice. *Front Immunol* (2017) 8:486. doi: 10.3389/fimmu.2017.00486
22. Einenkel R, Ehrhardt J, Hartmann K, Kruger D, Muzzio DO, Zygmunt M. Hormonally Controlled ILC Antigen Presentation Potential Is Reduced During Pregnancy. *Reproduction* (2020) 160(1):155–69. doi: 10.1530/REP-19-0554
23. Zygmunt M, Herr F, Münstedt K, Lang U, Liang OD. Angiogenesis and Vasculogenesis in Pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* (2003) 110 Suppl 1:S10–8. doi: 10.1016/s0301-2115(03)00168-4
24. Lima PD, Zhang J, Dunk C, Lye SJ, Croy BA. Leukocyte Driven-Decidual Angiogenesis in Early Pregnancy. *Cell Mol Immunol* (2014) 11(6):522–37. doi: 10.1038/cmi.2014.63
25. Erlebacher A. Immunology of the Maternal-Fetal Interface. *Annu Rev Immunol* (2013) 31:387–411. doi: 10.1146/annurev-immunol-032712-100003
26. Mor G, Cardenas I. The Immune System in Pregnancy: A Unique Complexity. *Am J Reprod Immunol* (2010) 63(6):425–33. doi: 10.1111/j.1600-0897.2010.00836.x
27. Cicinelli E, De Ziegler D, Nicoletti R, Tinelli R, Saliani N, Resta L, et al. Poor Reliability of Vaginal and Endocervical Cultures for Evaluating Microbiology of Endometrial Cavity in Women With Chronic Endometritis. *Gynecol Obstet Invest* (2009) 68(2):108–15. doi: 10.1159/000223819
28. Aagaard K, Ma J, Antony KM, Ganu R, Petrosino J, Versalovic J. The Placenta Harbors a Unique Microbiome. *Sci Transl Med* (2014) 6(237):237ra65. doi: 10.1126/scitranslmed.3008599
29. Stout MJ, Conlon B, Landeau M, Lee I, Bower C, Zhao Q, et al. Identification of Intracellular Bacteria in the Basal Plate of the Human Placenta in Term and Preterm Gestations. *Am J Obstet Gynecol* (2013) 208(3):226 e1–7. doi: 10.1016/j.ajog.2013.01.018
30. Parnell LA, Briggs CM, Cao B, Delannoy-Bruno O, Schrieffer AE, Mysorekar IU. Microbial Communities in Placentas From Term Normal Pregnancy Exhibit Spatially Variable Profiles. *Sci Rep* (2017) 7(1):11200. doi: 10.1038/s41598-017-11514-4
31. Jimenez E, Fernandez L, Marin ML, Martin R, Odriozola JM, Nueno-Palop C, et al. Isolation of Commensal Bacteria From Umbilical Cord Blood of Healthy Neonates Born by Cesarean Section. *Curr Microbiol* (2005) 51(4):270–4. doi: 10.1007/s00284-005-0020-3
32. Lauder AP, Roche AM, Sherrill-Mix S, Bailey A, Laughlin AL, Bittinger K, et al. Comparison of Placenta Samples With Contamination Controls Does Not Provide Evidence for a Distinct Placenta Microbiota. *Microbiome* (2016) 4(1):29. doi: 10.1186/s40168-016-0172-3
33. de Goffau MC, Lager S, Sovio U, Gaccioli F, Cook E, Peacock SJ, et al. Human Placenta Has No Microbiome But Can Contain Potential Pathogens. *Nature* (2019) 572(7769):329–34. doi: 10.1038/s41586-019-1451-5
34. Kuperman AA, Zimmerman A, Hamadia S, Ziv O, Gurevich V, Fichtman B, et al. Deep Microbial Analysis of Multiple Placentas Shows No Evidence for a Placental Microbiome. *BJOG* (2020) 127(2):159–69. doi: 10.1111/1471-0528.15896
35. Theis KR, Romero R, Winters AD, Greenberg JM, Gomez-Lopez N, Alhousseini A, et al. Does the Human Placenta Delivered at Term Have a Microbiota? Results of Cultivation, Quantitative Real-Time PCR, 16s rRNA Gene Sequencing, and Metagenomics. *Am J Obstet Gynecol* (2019) 220(3):267.e1–39. doi: 10.1016/j.ajog.2018.10.018
36. Mor G, Kwon JY. Trophoblast-Microbiome Interaction: A New Paradigm on Immune Regulation. *Am J Obstet Gynecol* (2015) 213(4 Suppl):S131–7. doi: 10.1016/j.ajog.2015.06.039
37. Einenkel R, Zygmunt M, Muzzio DO. Microorganisms in the Healthy Upper Reproductive Tract: From Denial to Beneficial Assignments for Reproductive Biology. *Reprod Biol* (2019) 19(2):113–8. doi: 10.1016/j.repbio.2019.04.001
38. Bolstad AI, Jensen HB, Bakken V. Taxonomy, Biology, and Periodontal Aspects of Fusobacterium Nucleatum. *Clin Microbiol Rev* (1996) 9(1):55–71. doi: 10.1128/CMR.9.1.55
39. Kostic AD, Chun E, Robertson L, Glickman JN, Gallini CA, Michaud M, et al. Fusobacterium Nucleatum Potentiates Intestinal Tumorigenesis and Modulates the Tumor-Immune Microenvironment. *Cell Host Microbe* (2013) 14(2):207–15. doi: 10.1016/j.chom.2013.07.007
40. Castellarin M, Warren RL, Freeman JD, Dreolini L, Krzywinski M, Strauss J, et al. Fusobacterium Nucleatum Infection Is Prevalent in Human Colorectal Carcinoma. *Genome Res* (2012) 22(2):299–306. doi: 10.1101/gr.126516.111
41. Gendron R, Plamondon P, Grenier D. Binding of Pro-Matrix Metalloproteinase 9 by Fusobacterium Nucleatum Subsp. Nucleatum as a Mechanism to Promote the Invasion of a Reconstituted Basement Membrane. *Infect Immun* (2004) 72(10):6160–3. doi: 10.1128/IAI.72.10.6160-6163.2004
42. Uitto VJ, Baillie D, Wu Q, Gendron R, Grenier D, Puttniss EE, et al. Fusobacterium Nucleatum Increases Collagenase 3 Production and Migration of Epithelial Cells. *Infect Immun* (2005) 73(2):1171–9. doi: 10.1128/IAI.73.2.1171-1179.2005
43. Gursoy UK, Kononen E, Uitto VJ. Stimulation of Epithelial Cell Matrix Metalloproteinase (MMP-2, -9, -13) and Interleukin-8 Secretion by Fusobacteria. *Oral Microbiol Immunol* (2008) 23(5):432–4. doi: 10.1111/j.1399-302X.2008.00453.x
44. Rubinstein MR, Wang X, Liu W, Hao Y, Cai G, Han YW. Fusobacterium Nucleatum Promotes Colorectal Carcinogenesis by Modulating E-Cadherin/Beta-Catenin Signaling via its FadA Adhesin. *Cell Host Microbe* (2013) 14(2):195–206. doi: 10.1016/j.chom.2013.07.012
45. Gur C, Ibrahim Y, Isaacson B, Yamin R, Abed J, Gamliel M, et al. Binding of the Fap2 Protein of Fusobacterium Nucleatum to Human Inhibitory Receptor TIGIT Protects Tumors From Immune Cell Attack. *Immunity* (2015) 42(2):344–55. doi: 10.1016/j.immuni.2015.01.010
46. Abed J, Engard JE, Zamir G, Faroja M, Almogy G, Grenov A, et al. Fap2 Mediates Fusobacterium Nucleatum Colorectal Adenocarcinoma Enrichment by Binding to Tumor-Expressed Gal-GalNAc. *Cell Host Microbe* (2016) 20(2):215–25. doi: 10.1016/j.chom.2016.07.006
47. Bashir A, Miskeen AY, Bhat A, Fazili KM, Ganai BA. Fusobacterium Nucleatum: An Emerging Bug in Colorectal Tumorigenesis. *Eur J Cancer Prev* (2015) 24(5):373–85. doi: 10.1097/CEJ.0000000000000116
48. Noshio K, Sukawa Y, Adachi Y, Ito M, Mitsuhashi K, Kurihara H, et al. Association of Fusobacterium Nucleatum With Immunity and Molecular Alterations in Colorectal Cancer. *World J Gastroenterol* (2016) 22(2):557–66. doi: 10.3748/wjg.v22.i2.557
49. Shenker BJ, DiRienzo JM. Suppression of Human Peripheral Blood Lymphocytes by Fusobacterium Nucleatum. *J Immunol* (1984) 132(5):2357–62.
50. Shenker BJ, Datar S. Fusobacterium Nucleatum Inhibits Human T-Cell Activation by Arresting Cells in the Mid-G1 Phase of the Cell Cycle. *Infect Immun* (1995) 63(12):4830–6. doi: 10.1128/iai.63.12.4830-4836.1995

51. Demuth DR, Savary R, Golub E, Shenker BJ. Identification and Analysis of Fipa, a Fusobacterium Nucleatum Immunosuppressive Factor Gene. *Infect Immun* (1996) 64(4):1335–41. doi: 10.1128/iai.64.4.1335-1341.1996
52. Mangan DF, Won T, Lopatin DE. Monocyte Suppression of Fusobacterium Nucleatum-Induced Human Polyclonal B-Lymphocyte Activation. *Infect Immun* (1984) 46(2):332–9. doi: 10.1128/iai.46.2.332-339.1984
53. Grenier D, Grignon L. Response of Human Macrophage-Like Cells to Stimulation by Fusobacterium Nucleatum Ssp. Nucleatum Lipopolysaccharide. *Oral Microbiol Immunol* (2006) 21(3):190–6. doi: 10.1111/j.1399-302X.2006.00278.x
54. Ghosh SK, Gupta S, Jiang B, Weinberg A. Fusobacterium Nucleatum and Human Beta-Defensins Modulate the Release of Antimicrobial Chemokine CCL20/Macrophage Inflammatory Protein 3alpha. *Infect Immun* (2011) 79(11):4578–87. doi: 10.1128/IAI.05586-11
55. Birchmeier W, Hulskens J, Behrens J. E-Cadherin as an Invasion Suppressor. *Ciba Found Symp* (1995) 189:124–36. doi: 10.1002/9780470514719.ch10
56. Wong SHM, Fang CM, Chuah LH, Leong CO, Ngai SC. E-Cadherin: Its Dysregulation in Carcinogenesis and Clinical Implications. *Crit Rev Oncol Hematol* (2018) 121:11–22. doi: 10.1016/j.critrevonc.2017.11.010
57. Holtan SG, Creedon DJ, Haluska P, Markovic SN. Cancer and Pregnancy: Parallels in Growth, Invasion, and Immune Modulation and Implications for Cancer Therapeutic Agents. *Mayo Clin Proc* (2009) 84(11):985–1000. doi: 10.1016/S0025-6196(11)60669-1
58. Mahtout H, Chandad F, Rojo JM, Grenier D. Fusobacterium Nucleatum Binding to Complement Regulatory Protein CD46 Modulates the Expression and Secretion of Cytokines and Matrix Metalloproteinases by Oral Epithelial Cells. *J Periodontol* (2011) 82(2):311–9. doi: 10.1902/jop.2010.100458
59. Floridon C, Nielsen O, Holund B, Sunde L, Westergaard JG, Thomsen SG, et al. Localization of E-Cadherin in Villous, Extravillous and Vascular Trophoblasts During Intrauterine, Ectopic and Molar Pregnancy. *Mol Hum Reprod* (2000) 6(10):943–50. doi: 10.1093/molehr/6.10.943
60. Kokkinos MI, Murthi P, Wafai R, Thompson EW, Newgreen DF. Cadherins in the Human Placenta—Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) and Placental Development. *Placenta* (2010) 31(9):747–55. doi: 10.1016/j.placenta.2010.06.017
61. Pollheimer J, Loregger T, Sonderegger S, Saleh L, Bauer S, Bilban M, et al. Activation of the Canonical Wingless/T-Cell Factor Signaling Pathway Promotes Invasive Differentiation of Human Trophoblast. *Am J Pathol* (2006) 168(4):1134–47. doi: 10.2353/ajpath.2006.050686
62. Petrova YI, Schecterson L, Gumbiner BM. Roles for E-Cadherin Cell Surface Regulation in Cancer. *Mol Biol Cell* (2016) 27(21):3233–44. doi: 10.1091/mbc.E16-01-0058
63. Romero R, Dey SK, Fisher SJ. Preterm Labor: One Syndrome, Many Causes. *Science* (2014) 345(6198):760–5. doi: 10.1126/science.1251816
64. Garcia-So J, Zhang X, Yang X, Rubinstein MR, Mao Y, Kitajewski J, et al. Omega-3 Fatty Acids Suppress Fusobacterium Nucleatum-Induced Placental Inflammation Originating From Maternal Endothelial Cells. *JCI Insight* (2019) 4(3):e125436. doi: 10.1172/jci.insight.125436
65. Bowes WA. The Role of Antibiotics in the Prevention of Preterm Birth. *F1000 Med Rep* (2009) 1:22. doi: 10.3410/M1-22
66. Pelzer ES, Willner D, Buttini M, Hafner LM, Theodoropoulos C, Huygens F. The Fallopian Tube Microbiome: Implications for Reproductive Health. *Oncotarget* (2018) 9(30):21541–51. doi: 10.18632/oncotarget.25059
67. Zhou B, Sun C, Huang J, Xia M, Guo E, Li N, et al. The Biodiversity Composition of Microbiome in Ovarian Carcinoma Patients. *Sci Rep* (2019) 9(1):1691. doi: 10.1038/s41598-018-38031-2
68. Yu B, Liu C, Fredricks D, Swisher E. Microbiome Profiling of Fallopian Tubes. *Gynecol Oncol* (2020) 156(3):e26. doi: 10.1016/j.ygyno.2019.11.085
69. Brundin M, Figgdr D, Sundqvist G, Sjogren U. Preservation of Fusobacterium Nucleatum and Peptostreptococcus Anaerobius DNA After Loss of Cell Viability. *Int Endod J* (2015) 48(1):37–45. doi: 10.1111/iej.12273
70. Tang B, Wang K, Jia YP, Zhu P, Fang Y, Zhang ZJ, et al. Fusobacterium Nucleatum-Induced Impairment of Autophagic Flux Enhances the Expression of Proinflammatory Cytokines via ROS in Caco-2 Cells. *Plos One* (2016) 11(11):e0165701. doi: 10.1371/journal.pone.0165701
71. Sayed IM, Chakraborty A, Abd El-Hafeez AA, Sharma A, Sahan AZ, Huang WJM, et al. The DNA Glycosylase NEIL2 Suppresses Fusobacterium-Infection-Induced Inflammation and DNA Damage in Colonic Epithelial Cells. *Cells* (2020) 9(9):1980. doi: 10.3390/cells9091980
72. Kang W, Ji X, Zhang X, Tang D, Feng Q. Persistent Exposure to Fusobacterium Nucleatum Triggers Chemokine/Cytokine Release and Inhibits the Proliferation and Osteogenic Differentiation Capabilities of Human Gingiva-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Front Cell Infect Microbiol* (2019) 9:429. doi: 10.3389/fcimb.2019.00429
73. Tuttle RS, Mangan DF. Interaction of Fusobacterium Nucleatum 191 With Human Peripheral Blood Lymphocytes. *J Periodontal Res* (1990) 25(6):364–71. doi: 10.1111/j.1600-0765.1990.tb00929.x
74. Riccardi C, Nicoletti I. Analysis of Apoptosis by Propidium Iodide Staining and Flow Cytometry. *Nat Protoc* (2006) 1(3):1458–61. doi: 10.1038/nprot.2006.238
75. Watson JV, Chambers SH, Smith PJ. A Pragmatic Approach to the Analysis of DNA Histograms With a Definable G1 Peak. *Cytometry* (1987) 8(1):1–8. doi: 10.1002/cyto.990080101
76. Mor G, Abrahams VM. Potential Role of Macrophages as Immunoregulators of Pregnancy. *Reprod Biol Endocrinol* (2003) 1:119. doi: 10.1186/1477-7827-1-119
77. Koh YQ, Chan HW, Nitert MD, Vaswani K, Mitchell MD, Rice GE. Differential Response to Lipopolysaccharides by JEG-3 and BeWo Human Choriocarcinoma Cell Lines. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* (2014) 175:129–33. doi: 10.1016/j.ejogrb.2013.12.032
78. Cardenas J, Mor G, Aldo P, Lang SM, Stabach P, Sharp A, et al. Placental Viral Infection Sensitizes to Endotoxin-Induced Pre-Term Labor: A Double Hit Hypothesis. *Am J Reprod Immunol* (2011) 65(2):110–7. doi: 10.1111/j.1600-0897.2010.00908.x
79. Hongqi L, Raymond WR, Yiping WH. Fusobacterium Nucleatum Induces Fetal Death in Mice via Stimulation of TLR4-Mediated Placental Inflammatory Response. *J Immunol* (2007) 179(4):2501–8. doi: 10.4049/jimmunol.179.4.2501
80. Kong C, Yan X, Zhu Y, Zhu H, Luo Y, Liu P, et al. Fusobacterium Nucleatum Promotes the Development of Colorectal Cancer by Activating a Cytochrome P450/epoxyoctadecenoic Acid Axis via TLR4/Keap1/NRF2 Signaling. *Cancer Res* (2021). doi: 10.1158/0008-5472.can-21-0453
81. Lijun H, Yan L, Xuehua K, Rui W, Qi P, Yan Z, et al. Fusobacterium Nucleatum Facilitates M2 Macrophage Polarization and Colorectal Carcinoma Progression by Activating TLR4/NF- κ B/S100A9 Cascade. *Front Immunol* (2021) 12:658681. doi: 10.3389/fimmu.2021.658681
82. Ting C, Qing L, Jiao W, Yaxin W, Wei P, Wei P, et al. Fusobacterium Nucleatum Promotes M2 Polarization of Macrophages in the Microenvironment of Colorectal Tumours via a TLR4-Dependent Mechanism. *Cancer Immunol Immunother* (2018) 67:1635–6. doi: 10.1007/s00262-018-2233-x
83. Yaxin W, Jiao W, Ting C, Qing L, Wei P, Huan L, et al. Fusobacterium Nucleatum Potentiates Intestinal Tumorigenesis in Mice via a Toll-Like Receptor 4/P21-Activated Kinase 1 Cascade. *Digest Dis Sci* (2018) 63:1210–8. doi: 10.1007/s10620-018-4999-2
84. Kinder Haake S, Lindemann RA. Fusobacterium Nucleatum T18 Aggregates Human Mononuclear Cells and Inhibits Their PHA-Stimulated Proliferation. *J Periodontol* (1997) 68(1):39–44. doi: 10.1902/jop.1997.68.1.39
85. Ma CT, Luo HS, Gao F, Tang QC, Chen W. Fusobacterium Nucleatum Promotes the Progression of Colorectal Cancer by Interacting With E-Cadherin. *Oncol Lett* (2018) 16(2):2606–12. doi: 10.3892/ol.2018.8947
86. Rubinstein MR, Baik JE, Lagana SM, Han RP, Raab WJ, Sahoo D, et al. Fusobacterium Nucleatum Promotes Colorectal Cancer by Inducing Wnt/Beta-Catenin Modulator Annexin A1. *EMBO Rep* (2019) 20(4):e47638. doi: 10.15252/embr.201847638
87. Stockham S, Stamford JE, Roberts CT, Fitzsimmons TR, Marchant C, Bartold PM, et al. Abnormal Pregnancy Outcomes in Mice Using an Induced Periodontitis Model and the Haematogenous Migration of Fusobacterium Nucleatum Sub-Species to the Murine Placenta. *PloS One* (2015) 10(3):e0120050. doi: 10.1371/journal.pone.0120050
88. Han YW, Redline RW, Li M, Yin L, Hill GB, McCormick TS. Fusobacterium Nucleatum Induces Premature and Term Stillbirths in Pregnant Mice: Implication of Oral Bacteria in Preterm Birth. *Infect Immun* (2004) 72(4):2272–9. doi: 10.1128/iai.72.4.2272-2279.2004

89. Han YW, Fardini Y, Chen C, Iacampo KG, Peraino VA, Shamoni JM, et al. Term Stillbirth Caused by Oral *Fusobacterium Nucleatum*. *Obstet Gynecol* (2010) 115(2 Pt 2):442–5. doi: 10.1097/AOG.0b013e3181cb9955
90. Ikegami A, Chung P, Han YW. Complementation of the fadA Mutation in *Fusobacterium Nucleatum* Demonstrates That the Surface-Exposed Adhesin Promotes Cellular Invasion and Placental Colonization. *Infect Immun* (2009) 77(7):3075–9. doi: 10.1128/IAI.00209-09
91. Gauthier S, Tetu A, Himaya E, Morand M, Chandad F, Rallu F, et al. The Origin of *Fusobacterium Nucleatum* Involved in Intra-Amniotic Infection and Preterm Birth. *J Matern Fetal Neonatal Med* (2011) 24(11):1329–32. doi: 10.3109/14767058.2010.550977
92. Vander Haar EL, So J, Gyamfi-Bannerman C, Han YW. *Fusobacterium Nucleatum* and Adverse Pregnancy Outcomes: Epidemiological and Mechanistic Evidence. *Anaerobe* (2018) 50:55–9. doi: 10.1016/j.anaerobe.2018.01.008
93. Chan E, Brundler MA, Zhang K. Identification of *Fusobacterium Nucleatum* in Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Placental Tissues by 16S rRNA Sequencing in a Case of Extremely Preterm Birth Secondary to Amniotic Fluid Infection. *Pathology* (2019) 51(3):320–2. doi: 10.1016/j.pathol.2018.11.013
94. Hounkonnou CPA, Briand V, Fievret N, Accrombessi M, Yovo E, Mama A, et al. Dynamics of Submicroscopic Plasmodium falciparum Infections Throughout Pregnancy: A Preconception Cohort Study in Benin. *Clin Infect Dis* (2020) 71(1):166–74. doi: 10.1093/cid/ciz748
95. Tuikue Ndam N, Tornyigah B, Dossou AY, Escriou G, Nielsen MA, Salanti A, et al. Persistent Plasmodium falciparum Infection in Women With an Intent to Become Pregnant as a Risk Factor for Pregnancy-Associated Malaria. *Clin Infect Dis* (2018) 67(12):1890–6. doi: 10.1093/cid/ciy380
96. Aldo P, You Y, Szigeti K, Horvath TL, Lindenbach B, Mor G. HSV-2 Enhances ZIKV Infection of the Placenta and Induces Apoptosis in First-Trimester Trophoblast Cells. *Am J Reprod Immunol* (2016) 76(5):348–57. doi: 10.1111/aji.12578
97. Garcia AG, Marques RL, Lobato YY, Fonseca ME, Wigg MD. Placental Pathology in Congenital Rubella. *Placenta* (1985) 6(4):281–95. doi: 10.1016/s0143-4004(85)80038-2
98. Chua CLL, Hasang W, Rogerson SJ, Teo A. Poor Birth Outcomes in Malaria in Pregnancy: Recent Insights Into Mechanisms and Prevention Approaches. *Front Immunol* (2021) 12:621382. doi: 10.3389/fimmu.2021.621382
99. Fest S, Aldo PB, Abrahams VM, Visintin I, Alvero A, Chen R, et al. Trophoblast-Macrophage Interactions: A Regulatory Network for the Protection of Pregnancy. *Am J Reprod Immunol* (2007) 57(1):55–66. doi: 10.1111/j.1600-0897.2006.00446.x
100. Moraes JGN, Silva PRB, Mendonca LGD, Scanavez AA, Silva JCC, Chebel RC. Effects of Intrauterine Infusion of *Escherichia Coli* Lipopolysaccharide on Uterine Health, Resolution of Purulent Vaginal Discharge, and Reproductive Performance of Lactating Dairy Cows. *J Dairy Sci* (2017) 100(6):4772–83. doi: 10.3168/jds.2016-11630
101. Moraes JGN, Mendonca LGD, Silva PRB, Scanavez AA, Galvao KN, Ballou MA, et al. Effects of Intrauterine Infusion of *Escherichia Coli* Lipopolysaccharide on Uterine mRNA Gene Expression and Peripheral Polymorphonuclear Leukocytes in Jersey Cows Diagnosed With Purulent Vaginal Discharge. *J Dairy Sci* (2017) 100(6):4784–96. doi: 10.3168/jds.2016-11643
102. Nikolov A, Popovski N. Role of Gelatinases MMP-2 and MMP-9 in Healthy and Complicated Pregnancy and Their Future Potential as Preeclampsia Biomarkers. *Diag (Basel)* (2021) 11(3):480. doi: 10.3390/diagnostics11030480
103. Wallace AE, Fraser R, Cartwright JE. Extravillous Trophoblast and Decidual Natural Killer Cells: A Remodelling Partnership. *Hum Reprod Update* (2012) 18(4):458–71. doi: 10.1093/humupd/dms015
104. Grasso E, Paparini D, Hauk V, Salamone G, Leiros CP, Ramhorst R. Differential Migration and Activation Profile of Monocytes After Trophoblast Interaction. *PLoS One* (2014) 9(5):e97147. doi: 10.1371/journal.pone.0097147
105. Bejar EC, Mallard C, Powell TL. Expression and Subcellular Localization of TLR-4 in Term and First Trimester Human Placenta. *Placenta* (2006) 27(2–3):322–6. doi: 10.1016/j.placenta.2004.12.012
106. Holmlund U, Cebers G, Dahlfors AR, Sandstedt B, Bremme K, Ekstrom ES, et al. Expression and Regulation of the Pattern Recognition Receptors Toll-Like Receptor-2 and Toll-Like Receptor-4 in the Human Placenta. *Immunology* (2002) 107(1):145–51. doi: 10.1046/j.1365-2567.2002.01491.x
107. Abrahams VM, Bole-Aldo P, Kim YM, Straszewski-Chavez SL, Chaiworapongsa T, Romero R, et al. Divergent Trophoblast Responses to Bacterial Products Mediated by TLRs. *J Immunol* (2004) 173(7):4286–96. doi: 10.4049/jimmunol.173.7.4286
108. Cao B, Mysorekar IU. Intracellular Bacteria in Placental Basal Plate Localize to Extravillous Trophoblasts. *Placenta* (2014) 35(2):139–42. doi: 10.1016/j.placenta.2013.12.007
109. Seferovic MD, Pace RM, Carroll M, Belfort B, Major AM, Chu DM, et al. Visualization of Microbes by 16S *In Situ* Hybridization in Term and Preterm Placentas Without Intraamniotic Infection. *Am J Obstet Gynecol* (2019) 221(2):E1–E23. doi: 10.1016/j.ajog.2019.04.036
110. Yoshida T, Takada K, Komine-Aizawa S, Kamei Y, Ishihara O, Hayakawa S. *Lactobacillus Crispatus* Promotes Invasion of the HTR-8/SVneo Trophoblast Cell Line. *Placenta* (2021) 111:76–81. doi: 10.1016/j.placenta.2021.06.006

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2021 Heusler, Einenkel, Ehrhardt, Muzzio and Zygmunt. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

8. Danksagung

Ohne die Unterstützung der Universität Greifswald wäre meine Arbeit im Labor und die Fertigstellung meiner Dissertation nicht möglich gewesen. Besonderer Dank gilt Professor Marek Zygmunt für die Ermöglichung meiner Doktorandenstelle.

Hervorzuheben ist auch Dr. Damián Muzzio, der mich in die wissenschaftliche Thematik einführte und das Thema der Arbeit konzipierte. Von meinem ersten Tag im Labor bis zur Fertigstellung meiner Dissertation war er immer ansprechbar, beantwortete Fragen und unterstützte bei Problemen. Ich hätte mir keinen besseren Betreuer wünschen können.

Dankbar bin ich auch Rebekka Einenkel, die die Publikation mit Experimenten erweiterte, mich beim Schreiben der Dissertation zusätzlich betreute und immer gute Stimmung im Labor verbreitet hat. Mit Damián und Rebekka gemeinsam hatte ich auch die Möglichkeit den Kongress der *society for reproductive investigation* in San Diego zu besuchen, ein Erlebnis, dass ich immer in guter Erinnerung behalten werde.

Bei Jens Ehrhardt bedanke ich mich für die tolle Einarbeitung in den Laboralltag und die Durchführung von Experimenten. Danke auch für die Krankenversorgung meines Laptops, den Spaß mit Hühnern und die netten Unterhaltungen.

Ebenfalls zu meiner erfolgreichen Dissertation beigetragen hat die Unterstützung durch das Gerhard-Domagk-Nachwuchsförderprogramm. Sowohl die finanzielle Unterstützung als auch die lehrreichen Seminare haben mein Promotionsjahr bereichert.

Ich danke auch meiner Familie und meinen Freunden, besonders meiner Schwester Thea, für ihre Unterstützung.