

Diplomarbeit

Dynamik des vaginalen Mikrobioms in der
Schwangerschaft

und seine Assoziation mit maternalen Faktoren und humanen
Milch-Oligosacchariden (HMOs)

eingereicht von

Hannah Viviane Weißmair

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktorin der gesamten Heilkunde

(Dr.ⁱⁿ med. univ.)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt am

Lehrstuhl-/Diagnostik & Forschungs-Institut für Hygiene,

Mikrobiologie und Umweltmedizin

unter der Anleitung von

Charlotte Neumann, PhD

Univ.-Prof.ⁱⁿ Dr.ⁱⁿ Christine Moissl-Eichinger

Graz, 13. April 2026

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Des Weiteren erkläre ich hiermit, dass, sofern bei der Erstellung dieser Arbeit Künstliche Intelligenz (KI) Werkzeuge zur Generierung und/oder Korrektur bestimmter Textpassagen verwendet wurden, dieser Einsatz unter Einhaltung ethischer Grundsätze, akademischer Integrität und den Vorgaben meiner Universität erfolgte, sowie in Folge dies transparent gemacht und in angemessener Weise gekennzeichnet wurde.

Graz, 13. April 2026

Hannah Viviane Weißmair, eh.

Zusammenfassung auf Deutsch

Diese retrospektive Studie beschäftigte sich mit der Frage, welche Veränderungen im vaginalen Mikrobiom im Verlauf der Schwangerschaft auftreten und wie diese möglicherweise durch maternale Faktoren, das kindliche Geschlecht oder die Konzentration und Komposition der humanen Milch-Oligosaccharide beeinflusst werden. Ein Verständnis über die Zusammensetzung des vaginalen Mikrobioms ist wichtig, da Dysbalancen mit einer Prävalenz für urogenitale Infektionserkrankungen und einem erhöhten Risiko für Schwangerschaftskomplikationen wie Frühgeburtlichkeit assoziiert sein können. Die untersuchte Kohorte umfasste 48 Frauen, von denen zu vier Messzeitpunkten in der Schwangerschaft vaginale Abstrichproben gesammelt wurden und mittels 16S rRNA Sequenzierung analysiert. Die Daten wurden durch Metadaten und HMO-Profilierung aus Urinproben ergänzt. Durchschnittlich zeigten sich auf Genus-Ebene stabil hohe *Lactobacillus*-Werte ohne beobachtbare Zunahme dieser Dominanz im Verlauf. Ab einem BMI über 22 konnte eine Tendenz für Diversitätserhöhung festgestellt werden. Steigenden BMI-Werte korrelierten mit erhöhten Abundanzen für *Gardnerella* und *Fingoldia*. Eine geringere Gewichtszunahme in der Schwangerschaft schien mit erhöhten relativen Anteilen für *Gardnerella*, eine erhöhte Gewichtszunahme mit *Corynebacterium* einherzugehen. Eine Assoziation zwischen reduzierten oder schwankenden *Lactobacillus*-Dominanzen bei erhöhtem mütterlichem Alter konnte nicht festgestellt werden. In Abhängigkeit des fötalen Geschlechts wurden bei Müttern weiblicher Föten höhere *Lactobacillus* Dominanzen beobachtet, dieser Effekt trat bei positivem Sekretor-Status verstärkt auf. Sie zeigten auch anteilsmäßig höhere Werte für *Gardnerella* (Ø 10 %), während Mütter männlicher Föten höhere Abundanzen für *Prevotella* (Ø 2,4 %) aufwiesen. Sekretor-positive hatten 3,5-mal höhere *Gardnerella* Abundanzen, Sekretor-negative 2,7-mal höhere *Prevotella* Werte. Bezüglich Frühgeburten gab es keine assoziativen Auffälligkeiten im Mikrobiom. Alle untersuchten humanen Milch-Oligosaccharide stiegen in ihren Konzentrationen mit dem Gestationsalter an. Bei den von der FUT2/FUT3-Enzymaktivität abhängigen 2'FL und LDFT waren die Differenzen zwischen den Sekretor-Gruppen besonders groß. Direkte Effekte dieser HMOs auf die Komposition des vaginalen Mikrobiom konnten nicht gezeigt werden.

Abstract in English

This study examines changes occurring in the vaginal microbiome during pregnancy and how they may be affected by maternal factors, fetal sex or the concentration and composition of human milk oligosaccharides. Understanding the composition of the vaginal microbiome is important, because disbalances can be connected to a prevalence of urogenital infections and pregnancy complications of higher risk, such as preterm birth.

The cohort studied consisted of 48 woman from whom vaginal swabs were collected at four different points in time during pregnancy. These swabs were then analyzed by 16S rRNA gene sequencing. The data collected was supplemented by metadata and HMO-profiles derived from urine samples.

On average, the amount of *Lactobacillus* was stable and overall high, without trends of increase or decrease. A BMI higher than 22 was correlated with an increase of diversity. Rising values of BMI showed higher abundance of *Gardnerella* and *Finegoldia*. Less weight-gain through pregnancy seemed to be connected to a higher relative abundance of *Gardnerella*; more weight-gain with *Corynebacterium*. A connection between reduced or fluctuating dominance of *Lactobacillus* and higher maternal age could not be determined. Depending on fetal sex higher values of *Lactobacillus* were observed in mothers of female fetuses. This effect was amplified in mothers with secretor positivity. They also showed a higher abundance of *Gardnerella* (ø 10 %), while mothers of male fetuses had higher values of *Prevotella* (ø 2,4 %). Secretor-positive ones had 3.5 times higher abundance of *Gardnerella*; secretor-negative ones 2,7 times higher values of *Prevotella*. Preterm birth did not seem to be linked to changes of microbiome. All of the observed human milk oligosaccharides increased with gestational age. Depending on the secretor-group, the difference between the levels of FUT2/FUT3-dependent 2'FL and LDFT showed most significant differences. However, specific effects of those HMOS on the vaginal microbiome couldn't been shown.

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG AUF DEUTSCH	III
ABSTRACT IN ENGLISCH	IV
INHALTSVERZEICHNIS	V
ABKÜRZUNGEN	VII
GLOSSAR	VIII
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	IX
TABELLENVERZEICHNIS	X
EINLEITUNG	1
<i>Vorwort</i>	1
HINFÜHRUNG ZUM THEMA	1
DIE ALLGEMEINE BEDEUTUNG DES DARMMIKROBIOMS	1
<i>Drei Enterotypen des Darmmikrobioms</i>	2
<i>Effekte des Darmmikrobioms</i>	3
<i>Die Rolle der Ernährung</i>	3
ENTWICKLUNGSSCHRITTE INTESTINALES MIKROBIOM.....	4
<i>Das frühkindliche Darmmikrobiom</i>	5
DAS VAGINALE MIKROBIOM	6
DER SEKRETOR-STATUS	6
HMOs – AUFBAU, VORKOMMEN, SUBTYPEN UND FUNKTION	7
<i>Funktionen der humanen Milch-Oligosaccharide</i>	8
PHYSIOLOGISCHES VAGINALMIKROBIOM - 5 COMMUNITY STATE TYPES UND ETHNISCHER EINFLUSS	8
<i>Lactobacillus und Geschlechtshormone</i>	9
VERÄNDERUNGEN DES VAGINALEN MIKROBIOMS IN DER SCHWANGERSCHAFT.....	9
<i>Lactobacillus – Bedeutung; protektive Rolle; relevante Subgruppen</i>	10
<i>Folgen mikrobieller Dysbalancen</i>	11
<i>Bakterielle Vaginose – Definition und die Bedeutung von Gardnerella</i>	11
<i>Klinik bakterieller Vaginosen / Dysbalancen</i>	12
<i>Komplikationen während der Schwangerschaft</i>	13
<i>Lactobacillus Dominanz während der Schwangerschaft</i>	13
AUFZEIGEN DER KENNTNIS- UND FORSCHUNGSLÜCKE	14
<i>Der Einfluss des maternalen Gewichts</i>	14
<i>Gewichtszunahme während der Schwangerschaft</i>	16
<i>Alter der Mutter</i>	17
<i>Fetales Geschlecht</i>	17
<i>Gardnerella</i>	18
<i>Frühgeburtlichkeit</i>	19
<i>Sekretor-Status, HMOs und vaginales Mikrobiom während der Schwangerschaft</i>	20
<i>Humane Milch Oligosaccharide</i>	22
BEGRÜNDUNG DER FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG	23
EINSCHRÄNKUNGEN/ABGRENZUNGEN	24
<i>Studiendesign</i>	24
<i>Kohorte</i>	24
<i>Metadaten</i>	24
<i>Messzeitpunkte</i>	25
<i>Probenentnahme, DNA-Extraktion, PCR und Sequenzierung</i>	25
MATERIAL UND METHODEN	26

<i>Theoretisches Wissen</i>	26
<i>Gel Elektrophorese Basics</i>	27
<i>PCR – „Polymerase Chain Reaktion“</i>	27
STUDIENDESIGN	28
UNTERSUCHTE KOHORTE	28
<i>Einschlusskriterien</i>	28
<i>Ausschlusskriterien</i>	29
<i>Metadaten</i>	29
PROBENENTNAHME UND VERARBEITUNG	29
<i>Arbeitsschritte</i>	30
<i>DNA-Extraktionsprotokoll</i>	31
<i>PCR-Amplifikation</i>	31
<i>Illumina MiSeq Sequenzierung (durchgeführt im ZMF der Medizinischen Universität Graz)</i>	32
<i>Auswertung</i>	32
DIE BESCHREIBUNG DER KOHORTE ANHAND DER METADATEN	32
<i>Der Body-Mass-Index</i>	32
<i>Die Gewichtszunahme</i>	33
<i>Das maternale Alter</i>	34
<i>Der Sekretor-Status</i>	34
<i>Das Geschlecht des Ungeborenen</i>	35
<i>Der Geburtstermin</i>	35
<i>HMO-Profilierung</i>	35
DATENANALYSE	37
<i>Biostatistische Methodik einzelner Fragestellungen:</i>	37
ERGEBNISSE MIT GRAPHISCHEN DARSTELLUNGEN	44
<i>Diversität des Mikrobioms</i>	44
<i>Der prägraviden BMI</i>	46
<i>Gewichtszunahme in der Schwangerschaft</i>	49
<i>Das mütterliche Alter</i>	53
<i>Intrauterine fetale Hormonproduktion</i>	55
<i>Gardnerella</i>	60
<i>Frühgeburtlichkeit</i>	64
<i>Der Sekretor-Status</i>	66
<i>Humane Milch-Oligosaccharide</i>	73
DISKUSSION: BEANTWORTUNG DER FORSCHUNGSFRAGEN, VERGLEICHENDE, ERLÄUTERUNGEN	77
LITERATURVERZEICHNIS	90
ANHANG	99

Abkürzungen

IgA - Immunglobuline A

ASV - amplicon sequencing variants

BIPoC - Black, Indigenous and People of Color

CST - community state type

DNA - Desoxyribonukleinsäure

HMO - humane Milch-Oligosaccharide

NC - negative Control / Negativkontrolle

PCR - Polymerase Chain Reaktion

PCOS - polyzystisches Ovarialsyndrom

ppBMI - prepregnancy BMI / prägravid BMI

SSW - Schwangerschaftswoche

Glossar

16S rRNA Sequenzierung - Standardmethode für die taxonomische Klassifikation von Bakterien

95 % - Konfidenzintervall - Wertebereich, der mit 95 % Wahrscheinlichkeit den gesuchten Wert beinhaltet

Abundanz - Anteile bzw. Häufigkeiten von bspw. Gattungen oder Spezies am Mikrobiom; können relativ oder absolut sein

Alpha-Diversität - Artenvielfalt im Mikrobiom

Amplicon Sequencing Variants - hochauflösende DNA-Sequenzen auf Genebene, kann taxonomisch Gattungen und teilweise auch Spezies zugeordnet werden

humane Milchligosaccharide - Mehrfachzucker, die nur in der Schwangerschaft und Stillzeit vom mütterlichen Körper produziert werden

Median - der Zentralwert, der mittlere Wert aller erhobenen Werte

Mikrobiom - Bakterielle Lebensgemeinschaft inklusive der im Zusammenhang stehenden Faktoren (bspw. Metabolite, Moleküle) und koexistierende Lebensformen

Mittelwert - der Durchschnittswert aller erhobene Werte

Odds-Ratio - statistisches Maß, dass die Stärke eines Zusammenhangs zwischen zwei Merkmalen vergleicht

p-Wert - gibt die Wahrscheinlichkeit an, das vorliegende (oder ein extremeres) Ereignis zu beobachten, wenn es eigentlich keinen Zusammenhang gibt

Polymerase Chain Reaction - Methode zur Erstellung multipler Kopien einer DNA-Sequenz

Reads - abgelesene DNA-Sequenzen

Sekretor Status - abhängig von der FUT2/FUT3-Enzymaktivität wird zwischen Sekretor positiven und Sekretor negativen unterschieden. Sekretor-positive haben eine FUT2/FUT3-Enzymaktivität, weshalb sie HMOs mit α -1,2-fucosylierten Strukturen synthetisieren können.

Spearman-Korrelation - prüft monotone Zusammenhänge zwischen ordinal- oder intervallskalierten Variablen

Spezies - Art z.B. *Lactobacillus iners*

Standardabweichung - zentrales Streuungsmaß der Statistik, das die durchschnittliche Abweichung vom Mittelwert zeigt.

Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG A: EMPFEHLUNGEN FÜR DIE GEWICHTSZUNAHME IN DER SCHWANGERSCHAFT, AOK GESUNDHEITSKASSE DEUTSCHLAND	34
GRAFIK A: DAS PROZENTUELLE VORKOMMEN DER ZEHN HÄUFIGSTEN BAKTERIEN-GATTUNGEN IM VAGINALEN MIKROBIOM, SORTIERT NACH MESSZEITPUNKT V1-V4 UND INDIVIDUUM.	44
GRAFIK B: RELATIVE ABUNDANZ VON <i>LACTOBACILLUS</i> PRO FRAU ZU DEN MESSZEITPUNKTEN V1-V4	45
GRAFIK C: DIE ZEHN HÄUFIGSTEN BAKTERIEN-GATTUNGEN IN ABHÄNGIGKEIT DER MESSZEITPUNKTE V1-V4 UND DES PRÄGRAVIDEN BMI-WERTES	46
GRAFIK D DIE ZEHN HÄUFIGSTEN BAKTERIEN-GATTUNGEN IN ABHÄNGIGKEIT DES PRÄGRAVIDEN BMIs, DEM SEKRETOR-STATUS UND DEN MESSZEITPUNKTEN	47
GRAFIK E: PROZENTUELLE ANTEILE AUSGEWÄHLTER ASVs, DIE DEN SPEZIES <i>LACTOBACILLUS</i> INERS UND <i>LACTOBACILLUS</i> JENSENII SOWIE DEN GATTUNGEN <i>GARDNERELLA</i> UND <i>FINEGOLDIA</i> TAXONOMISCH ZUGEORDNET WURDEN.	48
GRAFIK F: DIE ZEHN HÄUFIGSTEN BAKTERIEN-GATTUNGEN IN ABHÄNGIGKEIT DER GEWICHTSZUNAHME IN DER SCHWANGERSCHAFT UND DER MESSZEITPUNKTE V1-V4.....	49
GRAFIK G: SPEARMAN-KORRELATION VON <i>GARDNERELLA</i> UND <i>CORYNEBACTERIUM</i> MIT DEM AUSMAß DER GEWICHTSZUNAHME IN DER SCHWANGERSCHAFT IN ABHÄNGIGKEIT DER MESSZEITPUNKTE T1-T4.....	51
GRAFIK H: PROZENTUELLE ANTEILE AUSGEWÄHLTER ASVs, DIE DEN GATTUNGEN <i>FINEGOLDIA</i> , <i>GARDNERELLA</i> UND <i>CORYNEBACTERIUM</i> TAXONOMISCH ZUGEORDNET WURDEN.....	52
GRAFIK I: DIE ZEHN HÄUFIGSTEN BAKTERIEN-GATTUNGEN IN ABHÄNGIGKEIT DES MATERNALEN ALTERS BEI ERSTVORSTELLUNG UND DEN MESSZEITPUNKTEN V1-V4	53
GRAFIK J: RELATIVE ABUNDANZ VON <i>LACTOBACILLUS</i> IN LOGREADS IN ABHÄNGIGKEIT DES MATERNALEN ALTERS UND DER 4 MESSZEITPUNKTE V1-V4.....	54
GRAFIK K: DIE ZEHN HÄUFIGSTEN BAKTERIEN-GATTUNGEN IN ABHÄNGIGKEIT DES KINDSGESCHLECHTS UND DER MESSZEITPUNKTE V1-V4	55
GRAFIK L: ZEIGT DAS VAGINALE MIKROBIOM DER MÜTTER ZU DEN MESSZEITPUNKTEN V1-V4 DER SCHWANGERSCHAFT AUFGEGLIEDERT NACH GESCHLECHT UND SEKRETOR-STATUS.....	59
GRAFIK M: RELATIVE <i>LACTOBACILLUS</i> -ABUNDANZ IN % VON DREI AUSGEWÄHLTEN SCHWANGEREN ZU DEN MESSZEITPUNKTEN V1-V4.....	62
GRAFIK N: RELATIVE <i>GARDNERELLA</i> -ABUNDANZ IN % VON DREI AUSGEWÄHLTEN SCHWANGEREN ZU DEN MESSZEITPUNKTEN V1-V4.....	62
GRAFIK O <i>GARDNERELLA</i> -ANTEIL IN PROZENT UND ZU ALLEN MESSZEITPUNKTE V1-V4.....	63
GRAFIK P: DIE ZEHN HÄUFIGSTEN BAKTERIEN-GATTUNGEN IN ABHÄNGIGKEIT DES ENTBINDUNGSTAGES UND DER MESSZEITPUNKTE V1-V4	64
GRAFIK Q : PROZENTUELLE ANTEILE AUSGEWÄHLTER ASVs, DIE DEN SPEZIES <i>LACTOBACILLUS</i> JENSENII, <i>LACTOBACILLUS</i> INERS UND DEN GATTUNGEN <i>GARDNERELLA</i> UND <i>FINEGOLDIA</i> TAXONOMISCH ZUGEORDNET WURDEN.	65
GRAFIK R: DIE ZEHN HÄUFIGSTEN BAKTERIEN-GATTUNGEN IN ABHÄNGIGKEIT DES SEKRETOR-STATUS UND DER VIER MESSZEITPUNKTE V1-V4	66
GRAFIK S: <i>GARDNERELLA</i> -ANTEIL IN PROZENT IN ABHÄNGIGKEIT DES SEKTRETOR-STATUS UND DER MESSZEITPUNKTE	67
GRAFIK T: LOG-TRANSFORMIERTE READS VON <i>GARDNERELLA</i> IN ABHÄNGIGKEIT DES SEKRETOR-STATUS	68
GRAFIK U: <i>PREVOTELLA</i> -ANTEIL IN PROZENT IN ABHÄNGIGKEIT DES SEKTRETOR-STATUS UND DER MESSZEITPUNKTE	69
GRAFIK V: DIE ZEHN HÄUFIGSTEN BAKTERIEN-GATTUNGEN IN ABHÄNGIGKEIT DES SEKRETOR-STATUS, DES ENTBINDUNGSTAGES UND DER MESSZEITPUNKTE V1-V4.....	70
GRAFIK W: FÜNF BOXPLOTS ZEIGEN DIE ABUNDANCE DER HMOs 3'SLN, 6'SLN, 2'FL, 3'SL UND LDFT IN ABHÄNGIGKEIT DER MESSZEITPUNKTE V1, V2, V4	73
GRAFIK X: ABUNDANZEN DER HMOs 3'SLN, 6'SLN, 2'FL, 3'SL, LDFT IN ABHÄNGIGKEIT DES SEKRETOR-STATUS	74
GRAFIK Y: DIE ZEHN HÄUFIGSTEN BAKTERIEN-GATTUNGEN SORTIERT NACH DEM SEKRETOR-STATUS, DEN MESSZEITPUNKTEN V1, V2 UND V4 UND IN AUFSTIEGENDEN 2'FL- HMO- KONZENTRATIONEN LINKS BZW LDFT-KONZENTRATIONEN RECHTS.....	75

Tabellenverzeichnis

TABELLE A: KONTINGENZTAFEL MIT LACTOBACILLUS-WERTEN $>/\leq 80$ NACH KINDSGESCHLECHT AUFGETEILT	39
TABELLE B: KONTINGENZTAFEL MIT LACTOBACILLUS-WERTEN $>/\leq 50$ NACH KINDSGESCHLECHT AUFGETEILT	40
TABELLE C: DIESE KONTINGENZTAFEL ZEIGT DEN ANTEIL DER FRÜH- BZW. TERMINGEBURTEN IN ABHÄNGIGKEIT DES SEKRETOR-STATUS	42
TABELLE D: ABSOLUTE ANZAHL AN FRAUEN LACTOBACILLUS-ANTEIL ÜBER 50 %, ÜBER 80 % UND ÜBER 90 %.....	44
TABELLE E: KONTINGENZTAFEL MIT LACTOBACILLUS-WERTEN $>/\leq 80$ NACH KINDSGESCHLECHT AUFGETEILT	56
TABELLE F: KONTINGENZTAFEL MIT LACTOBACILLUS-WERTEN $>/\leq 50$ NACH KINDSGESCHLECHT AUFGETEILT	56
TABELLE G: ODDS-RATIONES FÜR $\leq 80\%$ LACTOBACILLUS BZW $\leq 50\%$ LACTOBACILLUS ZU DEN MESSZEITPUNKTEN V1-V4	57
TABELLE H: ERGEBNISTABELLE DES FISHER'S EXACT TESTS FÜR 2x2.....	58
TABELLE I: GARDNERELLA-ANTEIL IN PROZENT VON DREI AUSGEWÄHLTEN SCHWANGEREN ZU DEN MESSZEITPUNKTEN V1-V4 UND MIT DURCHSCHNITTSWERT "GESAMT"	61
TABELLE J: LACTOBACILLUS-ANTEIL IN PROZENT VON DREI AUSGEWÄHLTEN SCHWANGEREN ZU DEN MESSZEITPUNKTEN V1-V4 UND MIT DURCHSCHNITTSWERT "GESAMT"	61
TABELLE K: GARDNERELLA-ANTEIL IN PROZENT IN ABHÄNGIGKEIT VON DEN MESSZEITPUNKTEN	62
TABELLE L: GARDNERELLA-ANTEIL IN PROZENT IN ABHÄNGIGKEIT DES SEKRETOR-STATUS UND DER MESSZEITPUNKTE V1-V4.....	67
TABELLE M: PREVOTELLA-ANTEIL IN PROZENT IN ABHÄNGIGKEIT DES SEKRETOR-STATUS UND DER MESSZEITPUNKTE V1-V4.....	69
TABELLE N.: KONTINGENZTAFEL FÜR DEN ZUSAMMENHANG ZWISCHEN SEKRETOR-STATUS UND FRÜHGEBURT BZW. TERMINGEBURT	71
TABELLE O: MITTELWERTE UND STANDARDABWEICHUNGEN FÜR DIE PARAMETER PRÄGRAVIDER BMI, BMI BEI GEBURT UND GEWICHTSZUNAHME IN DER SCHWANGERSCHAFT. DIE VERGLEICHSGRUPPEN SIND IN ABHÄNGIGKEIT DES SEKRETORSTATUS.	72
TABELLE P: ERGEBNISTABELLE FÜR POTENZIELLE UNTERSCHIEDE ZWISCHEN DEN SEKRETOR-GRUPPEN BEZÜGLICH PPBMI, BMI BEI GEBURT UND GEWICHTSZUNAHME WÄHREND DER SCHWANGERSCHAFT	72

Einleitung

Vorwort

Im Wissen, dass sich nicht jede schwangere Person automatisch als weiblich identifiziert, soll darauf hingewiesen werden, dass alle Begriffe, die Schwangere betreffen und sich nicht nur auf die Untersuchungskohorte beziehen, alle elterlichen Personen einschließen sollen - unabhängig ihrer Genderidentität.

Hinführung zum Thema

Die allgemeine Bedeutung des Darmmikrobioms

So wie der Mensch die Erde besiedelt, dienen auch Haut und Schleimhaut unseres Körpers als Lebensraum für ein komplexes Ökosystem verschiedenartiger Mikrobiota, bestehend aus Bakterien, Archaeen, Eukaryonten und Viren (1). Der Darm beherbergt das größte und komplexeste Mikrobiom des menschlichen Körpers und viele Studien konnten zeigen, dass das überwiegend kommensal lebende Mikrobiom weitreichende Auswirkungen auf die Gesundheit ihres Wirts hat (2-5). Die Quantität der Kommensalen und Symbionten ist dabei enorm. Zuletzt wurde die Zahl eukaryotischer Zellen des menschlichen Körpers auf ca. 3×10^{13} (1) geschätzt, während die der Mikrobiota vermutlich 3.9×10^{13} (2) beträgt (4). Die Verteilung innerhalb des Magen-Darmtrakts ist ungleichmäßig - die höchste bakterielle Konzentration findet sich im Kolon (5). Enorm ist nicht nur die Quantität, sondern auch die Diversität des Mikrobioms. Allein im Darm konnten bisher mindestens 800 verschiedene bakterielle Spezies und 7000 verschiedene Stämme detektiert werden (5,6). Der Begriff Mikrobiota umfasst dabei alle lebenden Mitglieder - sogenannte Mikroorganismen - die das Mikrobiom definieren. Diese Mikroorganismen können sowohl Bakterien, als auch Archaeen, Pilze, Algen oder kleine Protisten sein.

Im Terminus Mikrobiom werden zusätzlich zur lebenden Keimgesellschaft des Mikrobioms auch die mit den Mikroorganismen im Zusammenhang stehenden Faktoren inkludiert. Dies umfasst das gesamte Spektrum an produzierten Molekülen, Metaboliten und Strukturelementen, sowie koexistierenden Lebensformen wie assoziierten Phagen, Viren und extrazelluläre DNA (7).

¹ Unsicherheit: 2%, Variation: 14% innerhalb einer Population normalgewichtiger Männer (70kg)

² Unsicherheit: 24%, Variation: 52% innerhalb einer Population normalgewichtiger Männer (70kg)

Die Beziehung zwischen den einzelnen Mikrobiota und ihrem Wirt kann kommensal, symbiotisch oder parasitär sein. Bei einer kommensalen Beziehung profitiert ein Partner vom anderen; der andere Partner hat dadurch weder Vor- noch Nachteile. Wobei die Begriffe mutualistisch bzw. symbiotisch die Beziehung zwischen Mensch und Mikrobiom besser beschreiben würden, da vermutlich beide voneinander profitieren. Im Gegenteil dazu versteht man unter einer parasitären Beziehung, dass ein Partner von der Beziehung profitiert, während der andere benachteiligt wird (8,9). Verarmungen oder Dysbalancen des Mikrobioms können indirekt oder direkt bei der Pathogenese onkologischer, metabolischer, autoimmuner, neurodegenerative, kardiovaskulärer und sogar psychiatrischer Krankheiten eine Rolle spielen (1). Doch auch bei gesunden Menschen ist die intraindividuelle Komposition des Mikrobioms nicht statisch und abhängig von externen Variablen wie Ernährung, Medikation³, Erkrankungen und Umweltfaktoren (10). Auch die Genetik scheint die Ansiedlung bestimmter Bakterienstämme zu favorisieren.

Drei Enterotypen des Darmmikrobioms

Bereits 2011 kamen *Arumugam et al.* zur Erkenntnis, dass man Menschen anhand ihres Mikrobioms in drei Gruppen - sogenannte Enterotypen - einteilen könne. Personen der Gruppe „Enterotyp 1“ weisen ein Mikrobiom auf, das besonders reich an *Bacteroides* und den häufig mit ihnen vergesellschafteten *Parabacteroides* ist, während jene der Gruppe „Enterotyp 2“ eher eine Prädominanz von *Prevotella* und *Desulfovibrio* zeigen. „Enterotyp 3“ - der am weitest verbreitetste Typ - hat eine Prävalenz für eine Besiedlung mit *Ruminococcus* und *Akkermansia*. *Arumugam et al.* verglichen intestinale Mikrobiome von Personen unterschiedlicher Kontinente, die diversen Ethnien angehörten und unterschiedlichen Alters, Geschlechts und Gewichts waren. Keiner dieser Faktoren schien einen signifikanten Einfluss auf die Zuteilung zu einem Enterotyp zu haben. Auch nutritive Gewohnheiten hatten nach *Arumugam et al.* keinen wesentlichen Einfluss. Interessant ist, dass die Art des Enterotypen Auswirkungen auf den Metabolismus von Nährstoffen und Medikamenten hat. Dies liegt an den spezifischen Eigenschaften der prävalenten Bakterienstämme. Medizinisch könnte

³ beispielsweise Antibiotika, Antazida oder Immunsuppressoren (5)

diese Einteilung nicht nur in der Therapie relevant sein, sondern auch für diagnostische und prognostische Zwecke verwendet werden, beispielsweise bei der Beurteilung von Prädispositionen für Multisystemerkrankungen wie das metabolische Syndrom, Diabetes mellitus oder Adipositas-assoziierte Erkrankungen (11). Die Unterteilung nach Enterotypen ist umstritten, da viele Wissenschaftler*innen diese Kategorisierung für eine zu vereinfachte Darstellung des komplexen Mikrobioms halten. Heute weiß man, dass sich Enterotypen ändern können und es viele Mischtypen gibt (12).

Effekte des Darmmikrobioms

Das Mikrobiom hat einen trophischen Effekt auf das intestinale Epithelium und fördert das Wachstum intestinaler Mikrovilli, wodurch es eine bedeutende Rolle bei der intestinalen Entwicklung spielt. Die Darmschleimhaut ist die Begegnungszone zwischen Umwelt und Körper, wo externe Mikroorganismen und Antigene mit den Körperzellen in Kontakt treten (13). Wichtig für die menschliche Gesundheit ist, der Aufbau eines Immunsystems GALT (gastrointestinal associated lymphoid tissue), das eine große Anzahl an mikrobiellen Antigenen toleriert und somit kaum allergische und entzündliche Reaktionen zeigt. Gleichzeitig muss das Immunsystem aktiv genug sein, um Pathogene abzuwehren (14). Die Mikrobiota wirken nicht nur direkt, sondern auch indirekt über die Produktion von Metaboliten und Signalmolekülen des Gastrointestinaltrakts. Effekte zeigen sich sowohl bezüglich der viszeralen Sensibilität und Motilität als auch auf die Verdauung, Sekretion, Energiegewinnung sowie die Immunabwehr und die mukösen Barrierefunktionen (5).

Die Rolle der Ernährung

Für die langfristige Ansiedlung einer bakteriellen Spezies ist ab dem Ausreifen des Mikrobioms das Ernährungsverhalten des Wirts entscheidend. Bei unzureichender, oft unausgewogener Nährstoffzufuhr sind die kommensal lebenden Mikroorganismen erschweren Wachstums- und Überlebensbedingungen ausgesetzt. Alle Nahrungskomponenten, die noch nicht bereits vor dem Eintreffen im Colon verdaut und resorbiert wurden, dienen den im Colon lebenden Bakterien als potenzielle Nahrungsquelle. Mittels metabolischer Reaktionen wie

der Fermentation ballaststoffreicher Lebensmittel oder resistenter Stärke oder durch Biotransformation konjugierter Gallensäure sowie Metabolisation von Oxalaten können Bakterien jene für uns unverdaulichen Nahrungsbestandteile verstoffwechseln. Das Darmmikrobiom ist auch für die Herstellung einiger Vitamine, wie beispielsweise Vitamin K und Vitamin B12 essenziell (15).

Berücksichtigt man die Fülle an Faktoren, die das Mikrobiom beeinflussen, liegt es nahe, dass es sowohl intra- als auch interindividuell eine hohe Diversität der Komposition des intestinalen, mikrobiellen Ökosystems gibt (16). Diese Einzigartigkeit der Zusammensetzung geht sogar so weit, dass sie mit der Individualität des Fingerabdrucks verglichen wird und beginnt ab der Geburt (17).

Entwicklungsschritte intestinales Mikrobiom

Das erste, native Mikrobiom ist in seiner Komposition noch äußerst instabil und einfach strukturiert, wird aber mit zunehmendem Lebensalter schnell komplexer und diverser (15). Beim Fötus ist der Gastrointestinaltrakt steril und mit Fruchtwasser gefüllt. Die erste Besiedlung des Darmmikrobioms beginnt in der Austreibungsphase des Geburtsprozesses, beim Durchtritt durch den Vaginalkanal. Durch den mukomukösen Schleimhautkontakt mit dem mütterlichen vaginalen Mikrobiom kommt es zum Verschlucken primärer bakterieller Kolonisatoren. Damit wird der Grundstein für die folgende mikrobielle Besiedlung des fetalen Verdauungstraktes gelegt (18,19). Außerdem beeinflussen diese frühen Interaktionen die Langzeitentwicklung eines gesunden Ökosystems der Haut und Schleimhaut, sowie des systemischen Immunsystems (19,20). In Bezug auf das Immunsystem spielen die Mikrobiota vermutlich bei der Induktion, dem Training als auch bei der Funktionsausübung eine fundamentale Rolle (19).

Diese Unterschiede und ihre immunologischen Konsequenzen sind vor allem im ersten Lebensjahr bedeutsam, da in dieser Zeit das junge Mikrobiom in seiner Komposition äußerst instabil ist. Etwa im Alter von drei Jahren ist das Mikrobiom nach einer zunehmenden Stabilisierung mit dem eines erwachsenen Menschen zu vergleichen (21).

Vermutlich vorbereitend auf diese erste bakterielle Prägung des Kindes kommt es im Rahmen der Schwangerschaft zu signifikanten Veränderungen innerhalb des maternalen vaginalen Ökosystems. In vorherigen Studien konnte eine tendenzielle

Reduktion der bakteriellen Vielfalt mit zeitgleicher quantitativer Dominanz von *Lactobacillus* beobachtet werden (22). Auch unabhängig von der Schwangerschaft sind kurzzeitige Schwankungen unter Anderem während der Menstruation und bei sexueller Aktivität zu beobachten (23).

Heute ist bekannt, dass die vaginale mikrobielle Besiedlung nicht nur die mütterliche, sondern auch die fetale Gesundheit wesentlich beeinflusst und ihre Dysbalance das Risiko von Schwangerschaftskomplikationen wie präterminale Geburten erhöht (24).

Das frühkindliche Darmmikrobiom

32,4 % der Kinder wurde 2023 in Österreich per Sectio caesarea entbunden. Ihnen fehlt der mukomuköse Kontakt auf dem Weg durch den vaginalen Geburtskanal (25). Analysen des frühkindlichen Darmmikrobioms dieser per Sectio entbundenen Kinder ergaben sichtbare Diversitätsverarmungen. Die vom Entbindungsmodus abhängigen Differenzen spielen aber offenbar nur in den ersten Wochen bis Monaten eine entscheidende Rolle. Später schleicht sich der Effekt aus und die Unterschiede in der Mikrobiomzusammensetzung zwischen den zwei Gruppen werden marginal (26). Allerdings zeigen frühere Studien, dass bereits diese wenige Wochen Lebenszeit mit verändertem Mikrobiom anhaltende Effekte auf die Immunsystementwicklung und -aktivierung haben können (19). Nach der Entbindung sind Ernährung und Umweltfaktoren die wichtigsten Einflussfaktoren auf die Weiterentwicklung und Stabilisierung der mikrobiellen Gemeinschaft (27). Säuglinge, die mit Muttermilch ernährt werden, entwickeln ein komplexes Mikrobiom, das reich an *Bifidobacterium spp.* ist. In deutlich geringerer Zahl können außerdem andere obligate Anaerobier wie *Clostridium spp.*, *Bacteroides spp.* und *Enterobacter* sowie *Enterokokken* nachgewiesen werden. Bei einer Ernährung mit künstlicher Säuglingsnahrung konnten dagegen in höheren Zahlen Besiedelungen mit anderen *Anaerobiern* beobachtet werden. Bei per Sectio Entbundenen verzögert sich die Etablierung eines stabilen Mikrobioms, was man anhand einer geringeren Prävalenz für *Bacteroides spp.* und einer verminderten Gesamtkomplexität sieht (19).

Grund dafür sind die im Kolostrum und der Muttermilch enthaltenen lebenden Mikroben, Metaboliten, Immunglobuline⁴, Immunzellen und Zytokine. All diese Faktoren beeinflussen das sich formierende Mikrobiom. Die Immunglobuline A regulieren die Immunaktivierung und beeinflussen die mikrobielle Bindung am Darmepithel über die Bindung von Nahrungs- und mikrobiellen Antigenen. Die vorhandenen Metabolite - einschließlich der humanen Milch-Oligosaccharide - fördern die Ansiedelung bestimmter Bakterienstämme, die sich vermutlich evolutionär als günstig erwiesen haben (28). Im Erwachsenenalter spielt der Geburtsmodus keine Rolle mehr, hier sind Lifestylefaktoren der größte Einflussfaktor auf die Zusammensetzung des Mikrobioms (29).

Durch die Korrespondenz der Vaginalmikrobiota mit den Darmmikrobiota beeinflussen sie die Gesundheit der Frau auf vielfältige Weise, beispielsweise durch immunologische Prozesse (30).

Das vaginale Mikrobiom

Für diese Arbeit über die Veränderungen des vaginalen Mikrobioms während der Schwangerschaft, wurde ein besonderes Augenmerk auf die Zusammensetzung des maternalen vaginalen Mikrobioms gelegt, um intra- und interindividuelle Unterschiede zu verschiedenen Messzeitpunkten aufzuzeigen. Da das vaginale Mikrobiom ein komplexes, dynamisches Mikroökosystem ist, das nicht nur während des Menstruationszyklus und der Schwangerschaft sondern lebenslang ständigen Schwankungen unterliegt, ist diese Analyse komplex (31).

Der Sekretor-Status

Der Sekretor-Status wurde im Rahmen der Metadaten für diese Arbeit verwendet, weshalb seine Bedeutung kurz definiert werden soll: Von Sekretor-positiven Individuen spricht man, wenn aufgrund des genetischen Erbmaterials die Enzyme Fucosyltransferase-2 (FUT2) und Fucosyltransferase-3 (FUT3) gebildet werden können. Sekretor-negative Schwangere (in Europa ca. 28 %) können nicht die Enzyme sezernieren, die für die Bildung von einigen humanen Milch-Oligosacchariden (HMOs) nötig wären, wie beispielsweise Fucosyllactose (2'-FL)

⁴ vorwiegend IgA

oder Lacto-N-fucopentaose I (LNFP I). Ihrem HMO-Profil fehlen folglich α -1,2-fucosylierten Strukturen, die bei Sekretor-positiven Frauen die am häufigsten vorkommenden HMOs sind (32,33).

HMOs - Aufbau, Vorkommen, Subtypen und Funktion

Humane Milch Oligosaccharide (HMOs) sind eine Gruppe bioaktiver, divers konfigurierter Glykane, die ausschließlich bei Schwangeren gefunden werden können und denen eine Reihe von Funktionen zugeschrieben wird. Heute sind etwa 200 verschiedenen Strukturformen bekannt (34), wobei die Grundstruktur („core structure“) aller HMOs ein Laktose-(Gal β 1-4Glc)-Rest am reduzierenden Ende ist. Die weiteren Bausteine der HMOs sind fünf verschiedenen Monosaccharide: Glucose, Galaktose, N-Acetylglucosamin, Fucose, Sialinsäure. Bei einer Fucosylierung - dem Anhängen einer Fucose an die core-Struktur - wird das entstehende HMO neutral, während bei einer Sialylierung - dem Anhängen einer Sialinsäure - wird das entstehende HMO sauer wird. Die große Vielfalt in der Komposition der HMOs entsteht durch Diversität der Reihung der fünf Monosaccharide, glykosidischen Verbindungen und durch diverse Verzweigungen. Auf Basis ihrer Struktur lassen sie sich in drei Hauptgruppen untergliedern: 1. Neutrale, nicht-fucosylierte HMOs, 2. Neutrale fucosylierte HMOs und 3. Sialylierte (saure) HMOs (34,35). Welche Art der Fucosyl-Muster exprimiert werden kann, ist durch genetischen Polymorphismus determiniert und steht im Zusammenhang mit den Genen für das Lewis-Blutgruppensystem und den Sekretor-Status. Aufgrund dessen sind die interindividuellen Unterschiede groß. Aber auch intraindividuell kann eine Veränderung der HMO-Konzentrationen und Zusammensetzungen in Abhängigkeit vom Gestationsalter festgestellt werden (36,37). Die humanen Milch-Oligosaccharide können bereits in den ersten Trimestern im maternalen Serum nachgewiesen werden. In einer Arbeit von *E. Jantscher-Krenn et al.* wird beschrieben, dass sich die Konzentrationen der Sekretor-abhängigen HMOs - beispielsweise 2'FL und LDFT - in der Zeitspanne zwischen der 14. und 22. Gestationswoche deutlich erhöhen. Davor dominieren HMOs mit Sialyllactose-Resten. Danach nähert sich das Verhältnis zwischen Sialyllactose- und Fucosyllactose-HMOs einem Gleichgewicht an (38).

Funktionen der humanen Milch-Oligosaccharide

Die Kohlenhydrate der HMOs gleichen auffallend jenen der epithelialen Zellen im Darm, an die pathogene Keime binden, um in den Körper eindringen zu können. Aufgrund dieser Similarität wird vermutet, dass HMOs unter anderem dazu dienen, als freie Rezeptoren verschiedene Pathogene zu binden und damit ein Eindringen dieser zu verhindern. Es gibt auch Nachweise, dass HMOs direkt mit Mikroben interagieren können und hier antiadhäsive beziehungsweise antimikrobielle Wirkungen haben. Auf diese Weise können sie eine Kolonisation mit pathogenen Mikroben verhindern (39). Außerdem wirken HMOs prebiotisch, da sie von bestimmten Bakterienspezies zur Energiegewinnung metabolisiert werden können. So fördern sie beispielsweise die Ansiedelung von *Bifidobacterium*, *Bacteroiden* und *Lactobacillus*, die durch ihren pH-senkenden Effekt die Vermehrung pathogener Keime erschweren. Andere Bakterien, die HMOs nicht direkt abbauen können, profitieren von angereicherten Stoffwechselprodukten, wodurch auch sekundär die Komposition mikrobieller Gemeinschaften beeinflusst wird (40-44). Durch die beim Stillen übertragene Muttermilch beeinflussen die HMOs das Darmmikrobiom der Säuglinge. Man spricht in diesem Zusammenhang vom MOM - dem „milk oriented microbiome“ (37).

HMOs zirkulieren bereits pränatal im maternalen Blutkreislauf und können im Urin detektiert werden. Deshalb ist davon auszugehen, dass sie auch pränatal einen Effekt haben. Dieser könnte sich nicht nur lokal, sondern zusätzlich an anderen Stellen des maternalen Körpers manifestieren - beispielsweise im Mund, dem Urogenitaltrakt, dem Darm oder den Brustdrüsen. Ebenso könnte aufgrund der plazentaren Übertragung und dem Nachweis von HMOs im Nabelschnurblut die pränatale mikrobielle Besiedelung des Fetus beeinflusst werden (45).

Physiologisches Vaginalmikrobiom - 5 community state types und ethnischer Einfluss

Durch die systemische Analyse und den Vergleich von 396 vaginaler Mikrobiome durch *B. Ma et al.* konnten abhängig von der Zusammensetzung fünf „community state types“ identifiziert werden. Bei vier dieser fünf Gemeinschaftstypen konnte

eine Dominanz eines der vier verbreitetsten *Lactobacillus spp.*⁵ festgestellt werden (46) Auch der ethnische Hintergrund scheint einen Einfluss auf die vaginale Besiedlung zu haben. So zeigten in einer US-amerikanischen Studie weiße und asiatische Frauen tendenziell ein azinöseres Milieu als hispanische und BIPOC Frauen und korrelativ eine häufigere *Lactobacillus* Dominanz (47).

Lactobacillus und Geschlechtshormone

Das Vorkommen von *Lactobacillus* korreliert mit verschiedenen Wirtsfaktoren, insbesondere mit dem Einfluss der Geschlechtshormone. Zwar kann *Lactobacillus* unabhängig vom Alter bei den meisten Frauen nachgewiesen werden, doch zeigt sich eine ausgeprägte Dominanz während des reproduktiven Lebensalters - von der Menarche bis zur Menopause. In der Pubertät und während der Schwangerschaft führen erhöhte Östrogenspiegel zur Proliferation vaginaler Epithelzellen und zur vermehrten Akkumulation von Glykogen. Eine glykogenreiche Vaginalumgebung bietet optimale Bedingungen für das Wachstum von *Lactobacillus* (48). Progesteron begünstigt die Zytolyse dieser Zellen und setzt so gespeichertes Glykogen frei, das anschließend von *Lactobacillus* in Glukose und Maltose aufgespalten werden kann. Dabei entsteht unter anderem Laktat als Fermentationsprodukt (49), welches hilft, den vaginalen pH-Wert im physiologischen Bereich zwischen 3,5 und 4,5 zu halten. Diese Ansäuerung hemmt das Wachstum potenziell schädlicher Mikroorganismen (46,50).

Veränderungen des vaginalen Mikrobioms in der Schwangerschaft

Während der Schwangerschaft kann eine Verschiebung der Gemeinschaftsgruppen der Vagina beobachtet werden. Die Artenvielfalt verringert sich und stabilisiert sich bezüglich der dominierenden Bakterienstämme (51,52).

Meist wird es stärker durch ein oder zwei *Lactobacillus* Arten dominiert. Jedoch gibt es auch bei diesen Veränderungen ethnische Diversitäten zu beachten (51,53-55).

⁵ *L. crispatus*, *L. iners.*, *L.gasseri*, *L. jensenii*

Lactobacillus - Bedeutung; protektive Rolle; relevante Subgruppen

Ein von *Lactobacillus* dominiertes vaginales Mikrobiom gilt als gesundheitsförderlich. Dies liegt daran, dass die protektive Rolle von *Lactobacillus* gegen pathogene Mikroorganismen bereits seit der Entdeckung durch Döderlein im 19. Jahrhundert umfassend beschrieben ist. Derzeit sind über 140 *Lactobacillus*-Arten bekannt, von denen jedoch nur wenige typischerweise das vaginale Mikrobiom dominieren. Zum vaginalen Kernmikrobiom gehören: *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. jensenii* oder *L. iners* (56). Diese Arten gelten als zentrale Vertreter vaginaler Gesundheit, da sie durch die Produktion von Milchsäure, Wasserstoffperoxid und Bakteriziden zur Aufrechterhaltung eines sauren vaginalen pH-Werts beitragen. Das saure Milieu hemmt das Wachstum potenzieller Pathogene (57,58). Zusätzlich fördern sie durch ihre Adhäsion an das vaginale Epithel eine Barrierefunktion gegenüber der Anheftung und Invasion anderer Mikroorganismen (58).

Bei 20 bis 30 % der untersuchten Personen (46) konnte jedoch auch eine vaginale Mikrobiomzusammensetzung ohne signifikante *Lactobacillus* Dominanz und ohne Krankheitswert nachgewiesen werden. Obwohl sie ein vielfältiges Spektrum fakultativer und streng anaerober Mikroorganismen beherbergen, zeigten sie keine Symptome einer bakteriellen Vaginose (46). Besonders unter BIPoC und hispanischen Frauen ist der Anteil dieser Mikrobiome mit 40 % besonders hoch (47). Sie haben neben *Lactobacillus* eine Reihe anderer Gattungen wie *Atopobium*, *Corynebacterium*, *Anaerococcus*, *Peptoniphilus*, *Prevotella*, *Gardnerella*, *Sneathia*, *Eggerthella*, *Mobiluncus*, *Fingoldia*, uvm. (47,60-62). Einige dieser Bakterienstämme sind zu homo- oder heterofermentative Milchsäuregärungen in der Lage (62). Es scheint, dass bei der Beurteilung eines gesunden bzw. pathologischen vaginalen Milieus eher die katabole Funktion der Säureproduktion zur Aufrechterhaltung des pH-Wertes eine Rolle spielt als die tatsächliche Gattung der Bakterien (47). Solange keine Symptome wie Dyspareunie, Pruritus, Dysurie, Fluori vaginalis, Clue Cells, Amingeruch oder Veränderungen des vaginalen pH-Werts (63) auftreten, kann eine nicht-*Lactobacillus* dominiertes Mikrobiom auch als Normvariante betrachtet werden (46). Die Ergebnisse der durchgeführten Studien zur Analyse des vaginalen Mikrobioms ergaben, dass es kein einheitliches Kernmikrobiom für die menschliche Vagina gibt, sondern, wie bereits erwähnt,

verschiedene Gemeinschaftsgruppen (CST), die als Normvarianten existieren und in den allermeisten Fällen (4/5 Gruppen) von *Lactobacillus* dominiert werden (47).

Folgen mikrobieller Dysbalancen

Das mikrobielle Gleichgewicht kann durch exo- und endogene Faktoren gestört werden und dann verschiedene Infektionskrankheiten begünstigen, in dem es zu einem übermäßigen Wachstum pathogener Keime kommt. Gynäkologische Infektionen sind in der Regel durch eine vaginale Dysbiose gekennzeichnet. Die pathologische Vermehrung anaerober Bakterien kann zu bakterieller Vaginitis oder atrophischer Vaginitis führen. Bei Überwucherung mit *Candida albicans*, einem Pilz, kommt es zur vulvovaginalen Candidose; andere Erreger wie *Trichomonas vaginalis* können eine trichomonalen Vaginitis zur Folge haben, eine Gonorrhoe wird durch *N. gonorrhoeae* verursacht, während beispielweise eine Zervizitis durch *Mycoplasma genitalium* ausgelöst wird. Typische Erreger für das pelvic inflammatory disease ist *Chlamydia trachomatis*. Auch das Risiko für nicht-infektiöse Krankheiten wie induzierte Aborte, intrauterine Adhäsionen, Fehlgeburt, Frühgeburt und Unfruchtbarkeit stehen mit einer vaginalen Dysbiose in Zusammenhang und gefährden somit die Fertilität (64,65).

Bakterielle Vaginose - Definition und die Bedeutung von *Gardnerella*

Die bakterielle Vaginose als weltweit häufigste vaginale Erkrankung hat eine Prävalenz von 23 bis 29 % innerhalb der sexuell aktiven Frauen und ist definiert durch eine stark erhöhte absolute Bakterienzahl und eine hohe bakterielle Diversität anaerober und fakultativ anaerober Bakterienarten. Die bakterielle Vaginose ist vom Verlust beziehungsweise Rückgang der Gesamtzahl von *Lactobacillus* gekennzeichnet, die mit einer gesteigerten Vermehrung anaerober Mikroben einhergeht. Veränderungen des vaginalen Mikrobioms spielen jedoch auch eine Rolle bei der Anfälligkeit für sexuell übertragbare Erkrankungen, Harnwegsinfektionen und Geburtskomplikationen wie Frühgeburtlichkeit (46,66). Bei 95 bis 100 % der Frauen, die die Diagnose einer bakterieller Vaginose erhalten, ist *Gardnerella* die prädomiante Bakteriengattung (67). Aufgrund dieser Fehlbesiedlung kommt es zur Verdrängung potenziell protektiver *Lactobacillus* des gesunden vaginalen Mikrobioms. Die bekannteste dominante Bakterienart bei

bakteriellen Vaginose ist *Gardnerella vaginalis*, die sich durch eine sehr hohe Virulenz auszeichnet (68). Bestimmte HMOs - 2'FL, LDFT und 3'SL zeigten eine positive Assoziation zu verschiedenen *Gardnerella* Spezies, die im Urin und vaginalem Mikrobiom nachgewiesen werden konnten. Dies war bei Sekretor-positiven Frauen deutlicher ausgeprägt (69). Es lässt sich deshalb davon ausgehen, dass zumindest einige *Gardnerella* in der Lage sind, HMOs zu metabolisieren - insbesondere jene HMOs, die mit einem positiven Sekretor-Status assoziiert sind. Somit scheint die Sekretor-Positivität begünstigend für das *Gardnerella*-Wachstum zu sein. Auch gibt es eine positive Assoziation zwischen einem urogenitalen *Gardnerella*-Nachweis und einer Zervixverkürzung als Indikator für frühe Wehen und Frühgeburtlichkeit (69).

Die Virulenz von *Gardnerella* ergibt sich vor allem durch das ausgeprägte Adhäsionsvermögen, wodurch sie an den Vaginalepithelzellen einen Biofilm bilden können (70). Innerhalb der Biofilm-Matrix können Assoziationen mit anderen virulenten Bakterienstämmen beobachtet werden. Durch diese Biofilm-Bildung wird nicht nur die Therapie der bakteriellen Vaginose erschwert (71), sondern auch die Ko-Aggregation weiterer pathogener Mikroben begünstigt. Dadurch haben Frauen, die an einer bakteriellen Vaginose erkrankt sind ein höheres Risiko, an weiteren STIs zu erkranken, da auch Erreger wie *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis*, *M. genitalium*, *T. vaginalis*, *T. pallidum*, *HIV*, *HSV* und *HPV* von den ökologischen Interaktionen mit dem Biofilm der *Gardnerella* profitieren (72,73). Durch das erhöhte Infektionsrisiko steigt auch das Risiko für ascendierende Infektionen wie Zervizitis, Endometritis und Unterleibsentzündungen (74). Bei einer Chronifizierung erhöht sich das Risiko für Unfruchtbarkeit, insbesondere Eileiterunfruchtbarkeit (75).

Klinik bakterieller Vaginosen / Dysbalancen

Hinweisgebend für eine bakterielle Vaginose kann klinisch ein dünnflüssiger, homogener gräulicher Ausfluss mit oder ohne Amingeruch sein, der mit einer Alkalisierung des vaginalen pH-Werts vergesellschaftet ist. Diagnostisch kann im Nativpräparat der Nachweis von Schlüsselzellen „clue cells“ wegweisend sein (67).

Komplikationen während der Schwangerschaft

Während der Schwangerschaft kann eine bakterielle Vaginose zu erheblichen Komplikationen führen und steht beispielsweise mit vorzeitigen Wehen, Zervixverkürzung, vorzeitigem Blasensprung und Frühgeburtlichkeit in Verbindung (76,77).

Lactobacillus Dominanz während der Schwangerschaft

Das vaginale Mikrobiom gesunder Schwangerer, die eine komplikationslose, normalterminierte Geburt haben, wird größtenteils von *Lactobacillus vaginalis*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus gasseri* und *Lactobacillus jensenii* besiedelt (78). Insgesamt zeigt sich auch, dass das vaginale Mikrobiom schwangerer Frauen weniger Schwankungen unterliegt als das nicht-schwangerer Frauen. Falls sich während der Schwangerschaft ein Wechsel des Community State Type ergibt, ist dieser Wechsel fast ausschließlich von einem *Lactobacillus* dominierten CST zu einem ebenfalls von *Lactobacillus* dominierten (78). Ein von *Lactobacillus* dominiertes Mikrobiom scheint demnach eine günstige Besiedelung für die Schwangerschaft zu sein. Einige Prozesse während der Schwangerschaft scheinen die Dominanz von *Lactobacillus* zu begünstigen: durch die erhöhte Produktion von Östrogen wird die Anreicherung von Glykogen innerhalb der vaginalen Epithelien gefördert. Glykogen kann von *Lactobacillus* besonders gut verstoffwechselt werden, da sie es mit der von ihnen sezernierten α -Amylase spalten und die entstehenden Zuckermoleküle als Nährstoffquelle nutzen können. Auf diese Weise trägt eine erhöhte Östrogenkonzentration im Vaginalepithel zu einer Begünstigung des Mikroklimas für die Ansiedelung und Vermehrung von *Lactobacillus* bei (79). Interessant ist, dass dieser Effekt auch für Frauen beschrieben wird, die sich einer exogen induzierten Östrogenenerhöhung unterziehen: Sowohl bei der Einnahme von östrogenhaltigen oralen Kombinationspräparaten zur Kontrazeption als auch bei Frauen mit postmenopausaler Hormonersatztherapie konnte eine verringerte α -Diversität mit einer erhöhten *Lactobacillus* Dominanz beobachtet werden (80,81). Während des Östrogenabfalls in der postpartalen Phase können dagegen verringerte Anteilswerte für *Lactobacillus* im vaginalen Mikrobiom festgestellt werden (81). Ebenso zeigt sich bei Patientinnen mit PCOS - polyzystisches Ovarialsyndrom - eine geringere *Lactobacillus* Dominanz im Vergleich zu

Kontrollgruppen. Diese endokrine Störung ist mit verringerten Östrogen- und erhöhten Androgenspiegeln assoziiert (82). Während der Schwangerschaft steigen die drei wichtigsten humanen Östrogene - Estradiol (E2), Estron (E1) und vor allem Estriol (E3) kontinuierlich und deutlich an. Der Anstieg ist gut untersucht und im 1. Trimester besonders stark, dann kontinuierlich steigend und im 3. Trimester werden die höchsten Konzentrationen im Vergleich zu nicht schwangeren Personen erreicht. Nach der Geburt fallen alle Östrogene abrupt ab. Das dominierendste Östrogen in der Schwangerschaft ist Estriol (E3) (83).

Aufzeigen der Kenntnis- und Forschungslücke

Ziel der Diplomarbeit ist es, die Dynamik des vaginalen Mikrobioms in der Schwangerschaft zu untersuchen und dabei im Besonderen die Assoziation mit maternalen Faktoren und humanen Milch-Oligosacchariden zu berücksichtigen. Dies gelingt über mehrere kleiner Forschungsfragen, bei denen mögliche Korrelationen zwischen Metadaten, HMOs und den ausgewerteten Mikrobiom-Daten analysiert werden.

Wie bereits angeführt, begünstigt eine erhöhte Östrogenkonzentration das *Lactobacillus* Wachstum, wodurch eine Erhöhung und Stabilisierung des *Lactobacillus* Anteils am vaginalen Mikrobiom mit zunehmendem Gestationsalter zu erwarten ist (51,52). In der untersuchten Kohorte soll durch die Analysen der zehn häufigsten Bakterien-Gattungen des vaginalen Mikrobioms zu vier Messzeitpunkten in der Schwangerschaft diese Erwartung in **Forschungsfrage 1** bestätigt oder widerlegt werden.

Hypothese 1: Die *Lactobacillus* Dominanz steigt mit zunehmendem Gestationsalter.

Der Einfluss des maternalen Gewichts

In einigen Studien, die die vaginale *Lactobacillus* Dominanz abhängig vom Körpergewicht bei Frauen im gebärfähigen Alter untersuchten, zeigte sich eine deutliche Tendenz für ein *Lactobacillus* dominiertes vaginales Mikrobiom in der normalgewichtigen Kohorte (84-86). In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass ehemals übergewichtige Frauen nach einer bariatrischen Operation

einen signifikanten Anstieg der *Lactobacillus* Dominanz zeigten (87). Ein von *Lactobacillus* dominiertes Mikrobiom gilt als günstig für die Aufrechterhaltung der vaginalen Gesundheit (23). Ob eine statistisch signifikante Korrelation zwischen der Diversität des Mikrobioms und einem erhöhten Body-Mass-Index besteht, wird in **Forschungsfrage 1a** untersucht.

Hypothese 1a: Schwangere mit Adipositas zeigen im Vergleich zu Normalgewichtigen tendenziell seltener eine Dominanz von *Lactobacillus*.

Des Weiteren soll in **Forschungsfrage 1aa** geprüft werden, ob möglicherweise andere Faktoren wie das Gestationsalter oder der Sekretor-Status die Stärke der potenziellen Korrelation zwischen BMI und Diversität des Mikrobioms beeinflussen. Das Gestationsalter wird durch die Messungen zu vier verschiedenen Zeitpunkten während der Schwangerschaft repräsentiert. Aufgrund der massiven physiologischen Erhöhungen des Östrogenspiegels in der Schwangerschaft bei allen Frauen (83), wurde eine Verringerung der Differenz in der *Lactobacillus* Dominanz mit erhöhtem Gestationsalter erwartet. Etwaige prägravide Unterschiede würden durch die starken endokrinologischen Veränderungen an Bedeutung verlieren. Da es Assoziationen zwischen Sekretor-abhängigen HMOs und Gewichtsveränderungen gibt (36), wurde erwartet, dass sich in Abhängigkeit des Sekretor-Status die Effekte eines erhöhten BMIs auf die Mikrobiom-Komposition verstärken könnten. Um den Einfluss des maternalen BMI-Wertes noch genauer spezifizieren zu können, wurden in der **Forschungsfrage 1b** Amplicon Sequencing Variants (ASVs) mit relativ hohen Abundanzen auf eine signifikante Korrelation untersucht, darunter ASVs die taxonomisch den Spezies *Lactobacillus iners* und *Lactobacillus jensenii* zugeordnet wurden und ASVs, die den Gattungen *Gardnerella* und *Fingoldia* zugeordnet wurden.

Hypothese 1aa:

Innerhalb der Sekretor-Gruppen zeigen sich unterschiedlich starke Korrelationen zwischen BMI und Veränderungen im Muster des Mikrobioms, die sich mit steigendem Gestationsalter verringern.

Hypothese 1b:

In Abhängigkeit des BMIs zeigen sich Veränderungen in den Abundanzen der ASVs, die taxonomisch den Spezies *Lactobacillus iners* und *Lactobacillus*

jensenii zugeordnet wurden und ASVs, die den Gattungen *Gardnerella* und *Finegoldia* zugeordnet wurden.

Gewichtszunahme während der Schwangerschaft

Aktuell gibt es wenige Studien, die sich mit einer potenziellen Korrelation zwischen der Ausprägung der Gewichtszunahme in der Schwangerschaft und Veränderungen im vaginalen Mikrobiom in der Schwangerschaft beschäftigen.

In einer Studie von *Kosinska-Kaczynska et al.* wurde innerhalb der Kohorte mit exzessiver Gewichtszunahme eine tendenzielle Verringerung der α -Diversität (Shannon-Index) im Vergleich zur Kohorte ohne exzessive Gewichtszunahme festgestellt (88). Im Rahmen dieser Arbeit soll in **Forschungsfrage 1c** durch den Vergleich der Metadaten „prägravid BMI“, „BMI bei Geburt“ und „Gewichtszunahme während der Schwangerschaft“ in Zusammenschau mit den genomischen DNA-Daten eine Tendenz aufgezeigt werden, welche vaginalen Mikrobiom-Kompositionen eventuell mit einer erhöhten Gewichtszunahme in der Schwangerschaft assoziiert sein könnten. Da bereits bekannt ist, dass übergewichtige Schwangere tendenziell ein diverseres Mikrobiom aufweisen (87), sind kohärente Ergebnisse auch für die untersuchte Kohorte zu erwarten. Weiters soll in **Forschungsfrage 1cc** analysiert werden, welche Spezies neben *Lactobacillus* in Abhängigkeit der Gewichtszunahme am Aufbau des vaginalen Mikrobioms beteiligt sind. Für *Gardnerella* ist bekannt, dass sie durch das ausgeprägte Adhäsionsvermögen Biofilm-Matrizen an den Vaginalepithelzellen aufbauen. Diese Biofilme begünstigen das Wachstum anderer pathogener Mikroben (70). Es ist demnach zu vermuten, dass in Mikrobiomen mit erhöhtem *Gardnerella* Anteil eine zunehmende Diversität zu beobachten ist. Da *Gardnerella* mit einem erhöhten Risiko für Frühgeburtlichkeit assoziiert ist (89), sollte eine potenziell mit der Gewichtszunahme korrelierende Veränderung geprüft werden.

Hypothese 1c: In Abhängigkeit der maternalen Faktoren „prägravid BMI“, „BMI bei Geburt“ und „Gewichtszunahme während der Schwangerschaft“ können korrelative Veränderungen im vaginalen Mikrobiom beobachtet werden.

Hypothese 1cc: Frauen, die keine *Lactobacillus* Dominanz des vaginalen Mikrobioms besitzen, haben höhere *Gardnerella* Abundanzen.

Alter der Mutter

In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass Frauen ≥ 35 Jahre eine signifikant erhöhte α -Diversität im Vergleich zu Frauen < 35 Jahren haben (90,91). Mit zunehmendem Alter zeigte sich eine weniger dominante *Lactobacillus crispatus* Besiedelung. In **Forschungsfrage 2** wird deshalb analysiert, ob das mütterliche Alter die Diversität des vaginalen Mikrobioms beeinflusst.

Bei der Analyse und dem Vergleich verschiedener vaginaler Mikrobiome schwangerer Frauen, zeigten sich in früheren Studien bei älteren Schwangeren auch stärkere Schwankungen der *Lactobacillus* Dominanz im Vergleich zu jüngeren Schwangeren (91,92). Die **Forschungsfrage 2a** untersucht die Diversitäts-Schwankungen in Abhängigkeit des Alters. Da die Studienlage diesbezüglich aktuell begrenzt ist, werden die Ergebnisse der mikrobielle Analyse Schwangere im Alter von 18 bis 45 Jahren die bisherigen Beobachtungen ergänzen.

Hypothese 2: Ältere Frauen haben im Vergleich ein *Lactobacillus* ärmeres vaginales Mikrobiom.

Hypothese 2a: Die *Lactobacillus* Dominanz unterliegt bei älteren Frauen stärkeren Schwankungen.

Fetales Geschlecht

Es ist bereits bekannt, dass die fetale intrauterine Hormonproduktion Auswirkungen auf die Schwangerschaft hat. Beispielsweise konnte eine Wirkung auf die Plazentadurchblutung und die Insulinsensitivität durch die kindliche Hormonproduktion belegt werden (93,94). Zu der Frage, inwiefern das Geschlecht des Fötus die Komposition des vaginalen Mikrobioms in der Schwangerschaft potenziell beeinflussen könnte, gibt es bisher kaum wissenschaftliche Arbeiten. Allerdings ist ein Zusammenhang zwischen Östrogen und *Lactobacillus* Dominanz beschrieben, weshalb ein geschlechtsspezifischer Unterschied wahrscheinlich ist (93,94). Mögliche Auswirkungen der geschlechtsabhängigen Hormonproduktion auf die Diversität des vaginalen Mikrobioms werden in **Forschungsfrage 3** analysiert. Da die Östrogenproduktion bei Schwangeren mit weiblichen Föten um ca. 9 % höher ist als bei jenen mit männlichen Föten (95), sind Effekte auf die mikrobielle Komposition zu erwarten. Die **Forschungsfrage 3a** beschäftigt sich mit einer potenziellen Korrelation zwischen dem Sekretor-Status, dem Kindsgeschlecht und

der Diversität des Mikrobioms und versucht zu analysieren, ob die vom Sekretor-Status abhängigen HMO-Kompositionen geschlechtsspezifisch unterschiedliche Effekte auf das vaginale Mikrobiom haben. Ein tendenzieller Unterschied ist zu erwarten, da sowohl in Abhängigkeit des Kindsgeschlecht durch den hormonellen Status (95), als auch durch das Sekretor-abhängige HMO-Profil die Wachstumsbedingungen verändert werden könnten (96,97).

Hypothese 3: Schwangere, die eine Tochter erwarten haben aufgrund der fetalen intrauterinen Hormonproduktion eine erhöhte *Lactobacillus* Besiedelung.

Hypothese 3a: Der Sekretor-Status beeinflusst die Korrelation zwischen Kindsgeschlecht und Zusammensetzung des vaginalen Mikrobioms.

Gardnerella

Wie bereits vom Darmmikrobiom bekannt, gibt es auch innerhalb der vaginalen Mikrobiom-Kompositionen die Unterteilung in bakterielle Gemeinschaftstypen, die sogenannten Community State Types. Ein Subtyp der CST - Typ IV - zeichnet sich durch einen vergleichsweise hohen Anteil an Taxa aus, die mit einem erhöhten Risiko für Infektionserkrankungen wie der bakteriellen Vaginose in Verbindung gebracht werden (68). Eines dieser Taxa ist beispielsweise *Gardnerella*. Da *Gardnerella* sich auch bei einigen Probandinnen der Kohorte zeigte, beschäftigt sich die **Forschungsfrage 4** damit, welche Auffälligkeiten sich innerhalb der Metadaten jener Probandinnen zeigten. Weiters ist eine Assoziation zwischen einem positiven Sekretor-Status und einer erhöhter *Gardnerella* Besiedelung bekannt. Grund dafür ist, dass zumindest einige *Gardnerella* Spezies 2'FL und LDFT, die das HMO-Profil Sekretor-positiver Frauen dominieren, als Nahrungsquelle nutzen können (69). Somit werden für Sekretor-positive Frauen höhere relative *Gardnerella* Abundanzen erwartet.

Hypothese 4: Die Metadaten der Frauen mit erhöhten *Gardnerella* Anteilen des vaginalen Mikrobioms unterscheiden sich von den anderen Frauen der Untersuchungskohorte.

Frühgeburtlichkeit

Frühgeburtlichkeit ist einer der führenden Gründe für neonatale Mortalität und Morbidität. Die Ursachen für Frühgeburtlichkeit sind bislang nicht gänzlich geklärt, es ist anzunehmen, dass die Ätiologie multifaktorieller Genese ist (89,96,98,99). In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass eine Verminderung des *Lactobacillus* Anteils am vaginalen Mikrobiom während der Schwangerschaft mit negativen Auswirkungen für die mütterliche und kindliche Gesundheit assoziiert ist (66,89). Eine erhöhte Prävalenz für Infektionserkrankungen wie die vaginale Dysbiose und Schwangerschaftskomplikationen wie Frühgeburtlichkeit konnte festgestellt werden (81). Ein Zusammenhang mit bakteriellen Vaginosen und urogenitalen Infektionen als eine Ursache für Frühgeburtlichkeit ist bereits etabliert (24). Der Pathomechanismus ist dabei meist über eine PPROM⁶ (preterm prelabor rupture of membranes) als Folge einer aufsteigenden Infektion aus der Vagina, die dann in weiterer Folge eine Frühgeburtlichkeit bedingen kann (100). Im Rahmen dieser Studie wurden alle Frauen exkludiert, die unter vaginalen Infektionen litten und/oder anamnestisch im Zeitraum von sechs Monaten vor der Schwangerschaft bis zur Geburt Antibiotika oder Probiotika einnahmen. Deshalb konnte ein Zusammenhang zwischen bakteriellen Vaginosen oder anderen Infekt-assoziierten Ursachen und Frühgeburtlichkeit nicht geprüft werden. Bislang ist nicht abschließend geklärt, ob das Auftreten einzelner Spezies wie *Gardnerella* oder ein insgesamt ungünstiges vaginales Mikrobiomprofil das Risiko für Frühgeburtlichkeit signifikant erhöhen. Bei 12,5% der Schwangeren in der Kohorte kam es zu einer frühgeburtlichen Entbindung, vor dem 260. Gestationstag. 2024 lag die Frühgeburtenraten in Österreich bei 6,8%, womit sie in der untersuchten Kohorte somit fast doppelt so hoch ist (101). Die **Forschungsfrage 5** widmet sich der Frage nach einer möglichen Korrelation zwischen dem Entbindungstag und der Diversität der mikrobiellen Komposition, insbesondere einer möglichen Kausalität zwischen erhöhter *Gardnerella* Abundanz und Frühgeburtlichkeit. **Forschungsfrage 5a** beschäftigt sich mit der Frage, wie viel Prozent der Termingeburten ein diverses Mikrobiom aufzeigen, mit der Erwartungshaltung, dass es mehr sind als in der Kohorte der Schwangeren mit Frühgeburtlichkeit. Sollte dem nicht so sein, könnte dies ein Hinweis darauf sein, dass die individuelle

⁶ vorzeitiger Blasensprung

Komposition bedeutender ist, als der Nachweis einzelner Spezies. Ob es Unterschiede innerhalb der Abundanzen spezifischer ASVs in Abhängigkeit des Entbindungstages gibt, wird in **Forschungsfrage 5b** untersucht.

Hypothese 5: Ein verringerter *Lactobacillus* Anteil des vaginalen Mikrobioms, insbesondere mit erhöhtem *Gardnerella* Anteil findet sich vor allem bei Frauen, die frühgeburtlich entbunden haben.

Hypothese 5a: Prozentuell haben die Frauen, die termingeburtlich entbunden haben seltener ein Mikrobiom mit *Lactobacillus* \leq 50 % als jene, die frühgeburtlich entbunden haben.

Hypothese 5b: Die ASVs die taxonomisch potenziell pathogenen Mikroben zugeordnet wurden, zeigten sich häufiger bei Frauen, die frühgeburtlich entbunden haben, während die ASVs, die taxonomisch *Lactobacillus* zugeordnet wurden höhere Abundanzen bei termingeburtlichen Entbindungen aufwiesen.

Sekretor-Status, HMOs und vaginales Mikrobiom während der Schwangerschaft

In einer prospektiven Kohortenstudie mit über 300 schwangeren Frauen von *Kundu et al.* wurde der genetisch determinierte Sekretor-Status - der durch Aktivität des FUT2/FUT3-Enzyms definiert ist - mit der Zusammensetzung des vaginalen Mikrobioms und möglichen Auswirkungen auf den Schwangerschaftsverlauf in Beziehung gesetzt. Abhängig von genetischen Polymorphismen im FUT2/FUT3-Gen haben Sekretor-positive Menschen eine FUT2/FUT3-Enzymaktivität, Sekretor-negative Menschen nicht. Diese Enzymaktivitäten sind notwendig, um Fucose in Glykane einzubauen, die auf Körperoberflächenproteinen vorkommen. Diese Glykane sind Teil der histo-Blutgruppenantigene, darunter die H-Antigene, die die Grundlage für die ABO-Blutgruppenantigene bilden. Durch FUT2 kann dem Zuckergerüst eine α -1,2-verknüpfte Fucose hinzugefügt werden, was zur Funktionalisierung der glykanen Oberflächen von Schleimhäuten und Sekreten führt. Glykane Blutgruppenantigene dienen mikrobiellen Organismen als Bindungsstellen und Nährstoffquellen, weil eine Reihe von Bakterien spezifische Bindungsproteine für diese Glykanstrukturen besitzen und sie als Energiequellen nutzen können. (96) Sekretor-positive Mütter produzieren mehr 2'FL und LNFP-I HMOs, während Sekretor-negative Frauen mehr 3'FL, LNFP-II und LNT HMOs

produzieren (97). Insgesamt haben Sekretor-positive Frauen aufgrund ihrer FUT2/FUT3-Enzymaktivität ein anderes Nährstoffangebot, wodurch die mikrobielle Besiedelung beeinflusst wird. Die **Forschungsfrage 6** beschäftigt sich mit der Frage, ob sich die *Lactobacillus* Dominanz in Abhängigkeit des Sekretor-Status unterscheidet.

In der von *Kundu et al.* analysierten Kohorte konnten dazu passende Korrelationen zwischen dem Sekretor-Status und vaginalem Mikrobiom aufgezeigt werden: Bei Sekretor-negativen Frauen zeigten die vorkommenden *Lactobacillus* Arten andere mikrobielle Taxa als Kompositionspartner auf, als innerhalb der Gruppe Sekretor-positiver Frauen (96). Mikrobielle Gemeinschaftsstrukturen scheinen sich demnach in Abhängigkeit des FUT2/FUT3-Status zu unterscheiden. Im Rahmen der **Forschungsfrage 6a** soll analysiert werden, welche Spezies neben *Lactobacillus* in Abhängigkeit des Sekretor-Status eine Rolle bei der Komposition des vaginalen Mikrobioms spielen. Weiters konnte gezeigt werden, dass ein hochdiverses, *Lactobacillus*-armes vaginales Mikrobiom von Sekretor-negativen Frauen statistisch signifikant häufiger mit einer kürzeren Gestationsdauer korrelierte als bei Sekretor-negativen Frauen mit *Lactobacillus*-Dominanz und als bei Sekretor-positiven Frauen. Dies könnte darauf hinweisen, dass die Kombination dieser beiden Faktoren (Sekretor-Negativität + fehlende *Lactobacillus* Dominanz) ein Risikofaktor für Frühgeburtlichkeit darstellen könnte. Die Differenz betrug dabei circa 25 Tage (96). Ob Sekretor-negative Frauen mit diversem Mikrobiom früher entbinden, wird in **Forschungsfrage 6b** thematisiert.

Ein bislang in der Forschung kaum beleuchteter Zusammenhang ist die potenzielle Korrelation zwischen dem Sekretor-Status und dem maternalen BMI oder der Gewichtszunahme in der Schwangerschaft. Es ist bekannt, dass HMOs bereits pränatal im maternalen Blutkreislauf zirkulieren und im Urin detektiert werden können und es ist davon auszugehen, dass sie auch pränatal einen Effekt haben (39). Zuletzt konnten *Jantscher-Krenn et al.* in einer Studie eine Assoziation zwischen der mütterlichen Körperkomposition (BMI und Körperfettmasse) und der Konzentration fukosylierter HMOs - insbesondere 2'FL - zeigen (37). In **Forschungsfrage 6c** wird eine mögliche Korrelation zwischen dem Sekretor-Status - der direkt mit der Fähigkeit zur Synthetisierung von 2'FL-HMOs zusammenhängt - und dem BMI und der Gewichtszunahme in der Schwangerschaft geprüft.

Hypothese 6: Die *Lactobacillus* Dominanzen unterscheidet sich zwischen den Sekretor-Gruppen.

Hypothese 6a: Die mikrobiellen Kompositionspartner von *Lactobacillus* unterscheiden sich in Abhängigkeit des Sekretor-Status.

Hypothese 6b: Sekretor-negative Frauen, die verringerte Abundanzen von *Lactobacillus* haben entbinden häufiger frühgeburtlich.

Humane Milch Oligosaccharide

Die HMO Komposition und Konzentrationen hängen nicht nur vom Sekretor-Status, sondern auch vom Gestationsalter ab - im Laufe der Schwangerschaft steigt die totale Anzahl dieser, während die relativen Häufigkeiten einzelner HMOs im Laufe der Schwangerschaft variieren (37,38). Inwiefern sich die HMO-Profile in Abhängigkeit des Gestationsalters der Untersuchungskohorte verändert, wird in **Forschungsfrage 7** analysiert. **Forschungsfrage 8** widmet sich der Untersuchung der Sekretor-abhängigen Unterschiede innerhalb der HMO-Abundanzen. Mögliche Auswirkungen von 2'FL und LDFT auf die Komposition des vaginalen Mikrobioms werden in der **Forschungsfrage 9** untersucht. Da 2'FL als Präbiotikum für bestimmte *Bifidobakterien* wirkt (102), steigt bei Sekretor-negativen möglicherweise die relative Häufigkeit von Bakterien, die nicht direkt von 2'FL profitieren, beispielsweise *Gardnerella* oder *Prevotella*. Dies könnte folglich mit einem höheren Risiko für bakterielle Dysbiose assoziiert sein.

Hypothese 7: Zwischen dem 1. und dem 2. Untersuchungszeitpunkt sind die größten Veränderungen für die Konzentrationen von 2'FL und LDFT zu beobachten.

Hypothese 8: Die FUT2-abhängigen 2'FL und LDFT sind vermehrt innerhalb der Sekretor-positiven Kohorte anzutreffen.

Hypothese 9: Eine Verminderung von 2'FL führt zu einer Veränderung der mikrobiellen Muster.

Begründung der Fragestellung und Zielsetzung

Ziel der Diplomarbeit ist die systematische Untersuchung von Veränderungen des vaginalen Mikrobioms während der Schwangerschaft, sowie die Analyse von möglichen maternalen Einflussfaktoren.

Es ist bekannt, dass die Zusammensetzung und Dynamik des vaginalen Mikrobioms eine wichtige Rolle für die weibliche Gesundheit und den Schwangerschaftsverlauf spielt (31,57,66,84). Im Gegensatz zum gut erforschten Darmmikrobiom, bei dem sich eine hohe Diversität vorteilig zeigt (1), zeichnet sich das gesunde vaginale Mikrobiom in der Regel durch eine *Lactobacillus* Dominanz aus (51). Die bakterielle, vaginale Besiedlung wird durch zahlreiche Faktoren beeinflusst - beispielsweise dem mütterlichen Alter und Gewicht, hormonelle Veränderungen, Medikamenteneinnahme und genitalen Infektionserkrankungen (47,57,82,103). Ein weiterer Fokus dieser Arbeit ist die Analyse eines möglichen Zusammenhangs zwischen dem Sekretor-Status der Mutter und den Veränderungen ihres vaginalen Mikrobioms in der Schwangerschaft, wobei es um die Fähigkeit der Mutter geht, humane Milch-Oligosaccharide (HMOs) zu produzieren, die potenziell die mikrobielle Zusammensetzung beeinflussen könnten. Bei der Auswahl der Fragestellung wurde eine offene Fragestellung gewählt, da das Ergebnis der Arbeit zu Beginn dieser noch unklar war. Das vaginale Mikrobiom mit seinen Veränderungen in der Schwangerschaft ist im Vergleich zum Darmmikrobiom eine wenig erforschte mikrobielle Gemeinschaft sodass sich die Forschungsschwerpunkte zu diesem Thema erst zu entwickeln beginnen.

Einschränkungen/Abgrenzungen

Für die Ermittlung potenzieller Bias und getroffener Maßnahmen zur Vermeidung dieser wurde KI als ergänzende Unterstützung verwendet (Prompt: Vermeidung von Bias, ChatGPT 5.3, OpenAI, 18.02.2026; <https://chatgpt.com>)

Studiendesign

Durch das retrospektive Studiendesign konnte keine Randomisierung der Teilnehmerinnen und keine Verblindung der Forscher*innen erzielt werden. Dadurch könnte es zu potenziell unvermeidbaren systemischen Bias kommen. Eine Anonymisierung wurde jedoch durchgeführt.

Kohorte

Die Kohorte mit nur 48 Schwangeren war klein, wodurch die statistische Power der Testergebnisse eingeschränkt ist. Kleine Unterschiede im Mikrobiom, die erst bei größeren Kohorte signifikant wären, könnten aufgrund der kleinen Zahl der untersuchten Frauen übersehen werden. Außerdem wurden die Proben nur bei Schwangeren, die sich an der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe des LKH Graz im Rahmen der Schwangerschaft betreuen ließen genommen, wodurch kulturelle, ethische oder lokale Umweltfaktoren die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf andere Populationen beschränken. Zur Minimierung von Selektionsbias wurden klare Einschluss- und Ausschlusskriterien definiert. Dabei wurde besonders darauf geachtet, jene Kriterien, die das Mikrobiom stark beeinflussen und damit die Ergebnisse verzerren könnten, zu minimieren. Dies erfolgte beispielsweise durch den Ausschluss von Frauen mit Infektionserkrankungen, Anti- oder Probiotika Einnahme oder verlängertem Geburtsprozess. Auf diese Weise wurden systematische biologische Bias minimiert. Trotz der strengen Determination von Ein- und Ausschlussfaktoren konnten nicht alle Einflussfaktoren auf die mikrobielle Komposition erhoben werden. Faktoren wie sexuelle Aktivität, Ernährungsgewohnheiten, Hygienepraktiken, Stress, usw. können das Mikrobiom beeinflussen und angesichts der kleinen Kohorte könnten durch die hohe Anzahl an ungewissen Variablen die Ergebnisse verzerrt sein (23).

Metadaten

Die Metadatenerhebung, um Einflussfaktoren wie die Medikamenteneinnahme zu erhalten, erfolgte auf Basis von Fragebögen, wodurch eine Möglichkeit der Falschinformation besteht.

Messzeitpunkte

Das gewählte longitudinale Studiendesign mit vier Messzeitpunkten für jede Schwangere diente der Minimierung interindividueller Bias, wodurch die intraindividuellen Veränderungen besser beobachtet werden konnten. Da jede Frau als ihre eigene Kontrolle gilt, konnten interindividuelle Unterschiede im Mikrobiom in ihrer Bedeutung reduziert werden. Jedoch reichen die vier Messzeitpunkte pro Schwangerer möglicherweise nicht aus um kurzfristige Mikrobiomschwankungen detektieren zu können. Gerade bei älteren Schwangeren ist bekannt, dass ihre Mikrobiom-Kompositionen stärker schwanken als bei jüngeren, wodurch die Ergebnisse auch innerhalb der untersuchten Kohorte unterschiedlich aussagekräftig sein könnten (91,92).

Probenentnahme, DNA-Extraktion, PCR und Sequenzierung

Die standardisierte Probenentnahme- und Probenverarbeitungsprozesse minimierten Sampling-Bias. Die vaginalen Abstrichproben wurden nach mit FLOQ-Swabs zu determinierten Messzeitpunkten in der gleichen Klinik gewonnen und die weiteren Verarbeitungsschritte nach vorgegebenen Protokollen durchgeführt. Da die Probenentnahme- und Laborarbeiten von Hand und in kleinen Durchläufen durchgeführt wurden, kann es trotz Negativkontrollen, standardisierten Abläufen und der Verwendung von sterilen Materialien zu Kontaminationen oder systemischen Fehlern kommen.

Durch die Lagerung bei -80°C und identischen Lagerbedingungen für alle Proben, sowie die Analyse der Daten innerhalb eines engen Zeitraums (Mai - Juni 2024) konnten Degradations-Bias vermieden werden, da mikrobielles Wachstum und Abbau weitgehend minimiert und für alle Proben etwa gleich war. Die Verarbeitung der Proben erfolgte auch nicht nach Entnahmezeitpunkt oder Individuum, sondern zufällig, wodurch Messbias minimiert wurden. Kontaminationsbias konnte durch die Negativkontrollen (NC) bei jeder Extraktion minimiert werden. Außerdem wurde unter sterilen Bedingungen in einem Labor

und mit geeigneten Materialien gearbeitet. Bei der PCR der V4-Region des 16S rRNA-Gens werden primär bakterielle Taxa detektiert, Pilze, Viren und Archaeen wurden in dieser Arbeit nicht erfasst. Die Komposition des Mikrobioms kann jedoch eigentlich nur in Zusammenschau aller Einflussfaktoren und Cofaktoren abschließend beurteilt werden.

Material und Methoden

Theoretisches Wissen

Die humane DNA ist der Speicherort der genetischen Information und im Nucleus - dem Zellkern einer Zelle - verpackt. Darin ist sie als doppelsträngige, antiparallel laufende Helix organisiert. Modellhaft kann man sich den Aufbau der DNA wie eine Leiter vorstellen, deren Längsstäbe aus Zuckern aufgebaut und über Phosphat-Di-Esterbindungen verbunden sind, während die Basen die Sprossen der Leiter bilden. Die Basen Guanin und Cytosin binden dabei über drei Hydrogenbindungen, während die Basen Adenin und Thymin über zwei Hydrogenbindungen verbunden sind (104,105). Die DNA-Isolation hat zum Ziel, genomische DNA aus der Probe zu extrahieren, indem sie von den anderen zellulären Komponenten getrennt wird. Die dafür verwendeten Methoden sind sowohl chemischer beispielsweise enzymatische, als auch physikalische Methoden beispielsweise mittels Zentrifugation. Welche Methoden im Speziellen verwendet werden, hängt sowohl vom Probenmaterial, der Weiterverarbeitung, als auch vom DNA-Typ und der Größe beziehungsweise Anzahl der DNA-Proben, die isoliert werden sollen, ab. Grundsätzlich lässt sich die DNA-Isolation in vier Hauptschritte gliedern. Zuerst wird das entnommene Gewebe vorbereitet. Im nächsten Schritt wird die DNA aus dem Zellmaterial isoliert. Im dritten Schritt wird die DNA der Probe konzentriert und im letzten Schritt misst man die DNA-Konzentration und ihre Reinheit. Voraussetzung ist, die chemische oder mechanische Homogenisierung der Probe. Dazu können die bakteriellen Zellwände chemisch aufgespalten werden. Für Gram-negative Bakterien verwendet man Lysozyme, für Gram-positive Bakterien Lysostaphine und für Hefen Zymolyase. Zellmembranen dagegen können mit Detergenzien, Proteinasen oder EDTA zerstört werden. Die DNA-Extraktion selbst funktioniert über organische Lösungsmittel, hohe Salzkonzentrationen oder Guanidiniumchlorid. Die Zentrifugation dient dem physikalischen Entfernen der

Zellreste, wie beispielsweise Proteine, Lipide oder Polysaccharide. Eine DNA-Ausfällung (Präzipitation) erreicht man durch die Zugabe von Ethanol oder Isopropanol.

Gel Elektrophorese Basics

Aufgrund der angehängten Phosphatgruppen ist die DNA insgesamt negativ geladen. Im elektrischen Feld bewegt sie sich deshalb in Richtung der positiv geladenen Elektrode. Die negative Ladung der DNA ist abhängig von der Größe beziehungsweise dem Molekulargewicht der DNA, weshalb sich im elektrischen Feld die DNA-Moleküle nach ihrer Negativität und damit auch nach ihrer Größe sortieren. Die Migration im elektrischen Feld ist indirekt proportional zum \log_{10} des Molekulargewichts. Dies bedeutet folglich, dass sich größere Moleküle langsamer bewegen als kleinere Moleküle. Die DNA-Migration wird auch vom verwendeten Gel und dem verwendeten Puffer beeinflusst. Für größere DNA-Moleküle verwendet man ein Agarose Gel, für kleinere ein Polyacrylamide Gel. Bei der Verwendung von Agarose Gelen, benötigt man außerdem einen TRIS-Acetat Puffer.

PCR - „Polymerase Chain Reaktion“

PCR kürzt den Fachbegriff „Polymerase-Kettenreaktion“ ab, der eine Methode beschreibt mit der multiple Kopien eines einzelnen DNA-Moleküls durch enzymatische Multiplikation einer spezifischen DNA-Sequenz hergestellt werden können. Dabei kommt es zu einer exponentiellen Amplifikation der Zielsequenz zwischen zwei spezifischen Primern.

Die PCR läuft in 3 Hauptschritten ab, die physikalische und chemische Katalysatoren erfordern:

1. Denaturierung der Doppelstrang-DNA
2. Anlegen des Primers
3. Synthetisierung eines komplementären DNA-Stranges

Diese Schritte werden zyklisch circa 30-mal wiederholt.

Studiendesign

Die Studie wurde als retrospektive Studie am Institut für Hygiene, Mikrobiologie und Umweltmedizin der Medizinischen Universität Graz durchgeführt. Aufgrund des gewählten Studiendesigns war weder eine Randomisierung noch eine Verblindung der Forscher*innen vorgesehen.

Zur Erforschung der Veränderungen des vaginalen Mikrobioms während der Schwangerschaft wurden bei 48 Schwangeren zu vier, zeitlich determinierten Messzeitpunkten vaginale Abstriche durchgeführt. Der erste Messzeitpunkt wurde dabei circa für die zwölfte Schwangerschaftswoche (SSW) terminiert, die Abstriche für diesen Messzeitpunkt erfolgten zwischen der 12. bis 14. SSW. Der zweite Messzeitpunkt sollte etwa in der 20. SSW erfolgen, die Probengewinnung fand zwischen der 20. bis 24. SSW statt. Der dritte Messzeitpunkt wurde mit dem vom Mutter-Kind-Pass vorgegebenen Termin für den oralen Glukosetoleranztest zusammengelegt und erfolgte zwischen der 25. bis 28. SSW. Der letzte vaginale Abstrich sollte etwa in der 34. SSW erfolgen und die Datenerhebung wurde bei den Frauen zwischen der 34. bis 39. SSW durchgeführt. Für jede Frau wurden folglich vier Proben zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der Schwangerschaft erhoben. Die Probenentnahme erfolgte mittels sterilen Abstrichtupfern (FLOQ-Swabs) im Zeitraum zwischen 2016 bis 2022. Vom Zeitpunkt der Probengewinnung bis zum Beginn der analytischen Arbeit im Mai und Juni 2024 wurden die Nativproben bei -80°C im Institut für Hygiene, Mikrobiologie und Umweltmedizin der Medizinischen Universität Graz gelagert.

Untersuchte Kohorte

Alle Teilnehmerinnen waren zur Behandlung und Betreuung im Landeskrankenhaus Graz (Steiermark, Österreich) auf der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe.

Einschlusskriterien

Alter zwischen 18-45 Jahren, abgegebene schriftliche Einverständniserklärung zur Teilnahme an der Studie⁷, Einlingsschwangerschaft mit Geburt eines gesunden

⁷ Die Daten für diese Diplomarbeit wurden im Rahmen der Studie von *Jantscher-Krenn et al.* erhoben, bei der damals die Einverständniserklärungen der Testpersonen umfasste, dass die gewonnenen Proben für weitere Folgestudien verwendet werden können.

Kindes, Termingeburt, keine prolongierte Geburt (definiert als Partus innerhalb von 12h nach Wehenbeginn bzw. Blasensprung);

Ausschlusskriterien

Bakterielle oder fungale Infektionen der Mutter in der Schwangerschaft, Einnahme von Medikamenten, Antibiotika oder Probiotika in den letzten sechs Monaten vor Beginn der Schwangerschaft, Multiparität, fetale Anomalien, maternaler Diabetes (vorschwangerschaftlich und/oder Gestationsdiabetes), Schwangerschaftskomplikationen wie Hypertension, (Pre)Eklampsie, HELLP-Syndrom, schwere Infektionserkrankungen wie HIV, HCV, Drogenabusus, positiver Raucherstatus in der Anamnese;

Metadaten

Zusätzlich zu den vaginalen Abstrichen wurden einige Metadaten der Patientinnen erhoben: das mütterliche Alter, die Größe und das Gewicht vor der Schwangerschaft zur Ermittlung des Body-Mass-Index vor der Schwangerschaft (ppBMI); das Gewicht zu allen Messzeitpunkten sowie das Gewicht der Schwangeren bei Geburt zur Ermittlung der Gewichtszunahme während der Schwangerschaft; die Zahl der vorausgegangenen Schwangerschaften, Geburten, Aborte und induzierten Abbrüche; die Einnahme von Supplementen ja/nein und welche Art der Supplemente eingenommen worden sind; ob und in welcher Dosierung Medikamenten (insbesondere Antibiotika) während der Schwangerschaft eingenommen wurden; die Ethnie, die Anzahl vorrausgegangener Schwangerschaften und die Anzahl der lebendgeborenen Kinder; der Sekretor-Status; der Geburtsmodus; das Gestationsalter bei Geburt in Wochen und Tagen; spezifische Daten des geborenen Kindes (Geschlecht, Ethnie, Geburtsgewicht, Körperlänge bei Geburt, Kopfumfang bei Geburt, Ponderal-Index, Zeit bis zum ersten Meconiumabgang, Zeitpunkt und Art der ersten Nahrungsaufnahme (Muttermilch/Formula/beides).

Probenentnahme und Verarbeitung

Zur Gewinnung genomischer DNA aus den vaginalen Abstrichproben wurde das QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) verwendet. Die vaginalen Abstrichtupfer waren im

Gefrierschrank bei -80 °C gelagert und mussten vor Beginn der DNA-Extraktion aufgetaut werden. In der Vorbereitung wurden ebenso das bei -20°C gelagerten Mutanolysin aufgetaut und das Enzym Lysozym 10mg/ml, sowie der Lysis Buffer aus dem 4 °C Kühlschrank geholt. Mutanolysin wurde zusätzlich zu Lysozym eingesetzt, um die Peptidoglykanschicht Gram-positiver Bakterien besser spalten zu können und somit die Qualität der genomischen DNA-Extraktion zu verbessern. Pro Durchlauf konnte aus 24 Proben DNA extrahiert werden, wobei 23 Proben vaginale DNA enthielten und eine Probe als Negativkontrolle (NC) verwendet wurde. Für die NC wurde ein steriles Mikroreaktionsgefäß (Eppendorf) verwendet. Die Dokumentation erfolgte sowohl digital als auch analog.

Arbeitsschritte

Zuerst wurden den vaginalen Abstrichproben je 500 Mikroliter des Lysis-Puffers hinzugefügt (steril gefiltert, 20 mM TRIS-HCl pH 8,2 mM Na-EDTA, 1,2% Triton X-100). Im nächsten Schritt wurde in alle Proben 50 µL Lysozym (10 mg/mL) und 6 µL Mutanolysin (25 KU/mL) pipettiert. Zur optimalen Vermischung der Reagenzien wurden diese daraufhin mittels Vortex vermischt und zur Entfernung der Tröpfchen am Deckel mit der kleinen Zentrifuge kurz zentrifugiert. Danach inkubierten die Proben eine Stunde bei 37 °C im Thermoblock (400rpm).

Nach der Inkubation wurden sowohl die Flüssigkeiten als auch die Vaginalabstriche in Lysis Matrix E Reaktionsgefäße (MP Biomedicals) transferiert und zweimal im MagNA Lyser Instrument (Roche) auf 5.500 rpm für 30 Sekunden zentrifugiert. Dieser Schritt diente der mechanischen Lyse. In den Pausen wurden die Proben auf Eis gelagert. Eine weitere Zentrifugation mit 10.000 rcf wurde für 3min durchgeführt, um Beads vom Überstand zu trennen.

Anschließend wurde der Überstand in ein neues, steriles Reaktionsgefäß pipettiert und in weiterer Folge mit 180 µL ATL, sowie 20 µL Proteinase K vermengt, mittels Vortex vermischt und anschließend 30 Minuten lang bei 56 °C und 400 rpm im Thermoblock inkubiert. Im nächsten Schritt wurden weitere 200 µL des Puffers AL hinzugefügt, gevortext und zentrifugiert, bevor eine erneute Inkubationszeit von zehn Minuten bei 70 °C und 400 rpm im Thermoblock folgte. Nach einer erneuten Zentrifugation und der Zugabe von 200 µL Ethanol (96-100 %) wurden die Proben erneut mittels Vortex vermischt und anschließend zentrifugiert. Die entstandene

Mixtur wurde in eine QIAamp Mini spin column transferiert, die in einem 2ml Sammelröhrchen steckte und darin bei 8.000 rpm für eine Minute zentrifugiert wurde.

In weiterer Folge wurden einmal 500 µL AM1-Puffer und 500 µL AW2-Puffer hinzugegeben und jeweils danach für eine Minute bei 8.000 rpm bzw. für drei Minuten bei 14.000 rpm zentrifugiert. Dazwischen wurde das Sammelröhrchen gewechselt und zum Schluss durch eine letzte Zentrifugation auf höchster Geschwindigkeit sichergestellt, dass jeglicher Rest des AW2 Puffers eliminiert wurde.

Die Probe wurde nun in ein neues, steriles und beschriftetes 1.5 ml Mikrozentrifugen-Tube transferiert, bevor diesem 30 µL AE Puffer hinzugefügt wurden. Nach einer Inkubationszeit von einer Minute bei Raumtemperatur und einer Zentrifugation für eine Minute bei 8.000 rpm wurde wiederholt ein 30 µL AE Puffer hinzugefügt. Anschließend wurde die extrahierte DNA bei -80 °C eingefroren. Für die Aufbereitung der vaginalen Abstrichproben wurde das QIAamp DNA Mini Kit verwendet, das die Nukleinsäure-Aufreinigung auf Basis von Silikamembranen aus Abstrichen ermöglicht. Dies gelingt über eine spezifische Bindung der DNA, während Verunreinigungen nicht binden und ausgewaschen werden.

DNA-Extraktionsprotokoll

Das DNA-Extraktionsprotokoll befindet sich im Anhang.

PCR-Amplifikation

Die extrahierte DNA aus den vaginalen Abstrichproben wurde verwendet, um die V4 Region des 16S rRNA-Gens zu amplifizieren. Die dafür verwendeten Primer waren ILLU-515 und ILLU-806. Im Rahmen der Vorbereitung der PCR-Amplifikation wurde ein Mastermix aus insgesamt 975 µl Wasser und EX Tag Puffer dNTP. Dafür wurden sowohl die Proben aus dem auf -80°C temperierten Gefrierschrank geholt, als auch die Pufferlösung Ex Tag Buffer dNTP und die Primer ILLU-515 und ILLU-806 aufgetaut. Anschließend wurden alle zu verwendenden Lösungen kurz mittels Vortex und Zentrifuge vorbereitet, bevor der Mastermix erstellt worden ist. Für

die Durchführung der PCR-Reaktion wurden in Triplikaten 24 µl mit 1 µL / 30 µL genomischer DNA vermischt.

Der Mastermix setzt sich zusammen aus: 975 µl Wasser, 1X Buffer mit MgCl₂, 200µM je dNTP mix, 200 nM forward primer Illu-515F, 200 nM reverse primer Illu-806R, 0.5 U ExTaq Polymerase.

Illumina MiSeq Sequenzierung (durchgeführt im ZMF der Medizinischen Universität Graz)

Die DNA-Konzentrationen der verwendeten Proben wurden mittels SequalPrep normalization plate (Invitrogen) normalisiert und zur probenspezifischen Nachverfolgung gekennzeichnet. Weiters wurde zur Purifikation ein Gelschnitt durchgeführt. Die Sequenzierung erfolgte mittels Illumina Mi-Seq-Gerät und MS-102-3003 MiSeq Reagent Kit v3-600 Zyklen.

Auswertung

Die Raw Reads wurden wie in (106) beschrieben in Qiime2 (107) und mit Decontam (108) prozessiert und mittels Microbiome Explorer analysiert und dargestellt. Die Grafen wurden mittels Inkscape (1.4.2 (ebf0e940, 2025-05-08)) verschönert, z.B. Legenden und Überschriften angeglichen, ohne an den Daten selbst etwas zu ändern. Statistische Auswertungen fanden in R (108) statt.

Die Beschreibung der Kohorte anhand der Metadaten

Von den Frauen wurden außerdem einige Metadaten erhoben, anhand derer mögliche Zusammenhänge zwischen Veränderungen im vaginalen Mikrobiom und wichtigen Determinanten in der Schwangerschaft aufgezeigt werden konnten. Diese Metadaten umfassten den Body-Mass-Index (BMI) vor der Schwangerschaft, das Alter der Schwangeren, die Gewichtszunahme während der Schwangerschaft, den Status der Sekretion von Humanen Milch Oligosacchariden (HMOs), das Geschlecht des Ungeborenen und den Geburtstermin.

Der Body-Mass-Index

Der Body-Mass-Index (BMI) wird aus der Körpergröße und dem Gewicht berechnet und ist ein besserer Indikator für den Ernährungszustand als das Körpergewicht

allein, da die Körpergröße berücksichtigt wird. Die Formel zur Berechnung des BMI lautet: Körpergewicht in Kilogramm dividiert durch die Körpergröße in Metern zum Quadrat. Ein Ergebnis von $<18,5$ gilt als Untergewicht, zwischen $18,5$ bis $24,9$ spricht man von Normalgewicht, und ab >25 ist eine Person übergewichtig. Ab >30 spricht man von Adipositas. Der BMI-Mittelwert vor der Schwangerschaft der untersuchten Kohorte war mit $23,9$ im höheren Normbereich. Der höchste gemessene BMI war $47,7$ (Adipositas per magna), der niedrigste $16,2$ (Untergewicht), sodass alle Gewichtsklassen in der ausgewählten Kohorte repräsentiert waren.

Die Gewichtszunahme

Wie viel Gewicht eine Person während der Schwangerschaft zunehmen sollte, hängt von ihrem Ausgangsgewicht ab. Eine untergewichtige Schwangere sollte insgesamt $12,5 - 18$ kg zunehmen (109,110). Drei der vier Untergewichtigen nahmen in der Studie ausreichend Gewicht zu, bei einer Untergewichtigen fehlen die Metadaten zur Zunahme während der Schwangerschaft. Normalgewichtige Frauen sollten insgesamt $11,5 - 16$ kg zunehmen (109,110). Von den 31 normalgewichtigen Frauen hatten 15 eine empfohlene Gewichtszunahme, sieben nahmen zu viel Gewicht zu und sieben zu wenig. Bei zwei normalgewichtigen Frauen fehlen die Metadaten zur Gewichtszunahme während der Schwangerschaft. Übergewichtige Frauen mit einem BMI zwischen 25 bis $29,9$ sollten insgesamt $7 - 11,5$ kg zunehmen (109,110). Innerhalb dieser Untergruppe schafften vier der acht Frauen eine Gewichtszunahme im empfohlenen Bereich, drei legten zu viel Gewicht zu, eine zu wenig.

Gewicht vor der Schwangerschaft	Empfohlene Gewichtszunahme insgesamt	Empfohlene Gewichtszunahme im 2. und 3. Trimester pro Woche
Untergewicht (BMI unter 18,5)	12,5 bis 18 kg	0,5 bis 0,6 kg
Normalgewicht (BMI von 18,5 bis 24,9)	11,5 bis 16 kg	0,4 bis 0,5 kg
Übergewicht (BMI von 25 bis 29,9)	7 bis 11,5 kg	0,2 bis 0,3 kg
Adipositas (BMI ab 30)	5 bis 9 kg	0,2 bis 0,3 kg

Empfehlungen für die Gewichtszunahme in der Schwangerschaft

Abbildung A: Empfehlungen für die Gewichtszunahme in der Schwangerschaft, AOK Gesundheitskasse Deutschland(109,110)

Das maternale Alter

Das mütterliche Alter wurde bei der ersten Probenentnahme erhoben und lag durchschnittlich bei 35,9 Jahre. In Österreich liegt das Durchschnittsalter bei Geburt bei 31,6 Jahren (101), womit die untersuchte Kohorte etwas älter war als der österreichische Durchschnitt schwangerer Frauen. Die jüngste Schwangere war bei ihrem ersten Termin zur Probeentnahme 26 Jahre alt, die älteste 45.

Der Sekretor-Status

Der Sekretor-Status beschreibt die Eigenschaft einer Schwangeren, bestimmte humane Milch-Oligosaccharide (HMOs) in Körperflüssigkeiten wie beispielsweise Muttermilch zu sekretieren. Voraussetzung für die Absonderung mancher HMOs ist das Vorhandensein des Enzyms Fucosyltransferase2 (FUT2) und Fucosyltransferase 3 (FUT3), welches genetisch determiniert ist. FUT2 verhilft zur Bildung der α -1,2-Fucosyl-Zuckerstrukturen in HMOs (111). Ist eine Person „Sekretor-negativ“, hat sie keine aktive FUT2-Genaktivität, weshalb kein FUT2 gebildet werden kann. In diesem Fall können HMOs nicht im gleichen Umfang gebildet und sezerniert werden, wie bei „Sekretor-positiven“ Personen. Bezüglich der Werte, wie viel Prozent der Schwangeren Sekretor positiv bzw. Sekretor negativ seien, gibt es in

der Literatur verschiedene Angaben, die von 70 - 85% Sekretor positiven und dementsprechend 15 - 30% Sekretor negativen Frauen sprechen (112-114). HMOs als sekretierte Oligosaccharide finden sich auch in der Muttermilch. Beim Stillen gelangen sie in den Gastrointestinaltrakt des Babys, wo sie die Reifung des Darmmikrobioms beeinflussen, da sie als Präbiotika für Bakterien, insbesondere *Bifidobacterium*, dienen. Ein Vorhandensein der FUT2- und FUT3-Enzyme - bei Sekretor-positiven Müttern, ermöglicht eine Veränderung der Vielfalt an sekretierten HMOs, was vermutlich einen günstigen Effekt auf die Entwicklung des kindlichen Darms und Immunsystems hat (115). Bei der untersuchten Kohorte zeigte sich bei ca. 27 % (13/48) ein negativer und bei 73 % (35/48) ein positiver Sekretor-Status, womit sich die Zahlen mit denen aus der Literatur decken.

Das Geschlecht des Ungeborenen

In Österreich wurden 2024 51,5 % Buben und 48,5 % Mädchen geboren (101). Die Schwangeren der untersuchten Kohorte gebaren 18 Jungen und 28 Mädchen, bei zwei Kindern fehlt die Geschlechtsinformation in den Metadaten. Das Geschlecht der ungeborenen Kinder könnte insofern interessant sein, dass ihre fetale Hormonproduktion einen Einfluss auf die Veränderungen des mütterlichen vaginalen Mikrobioms nehmen könnten.

Der Geburtstermin

Bei einer Entbindung vor dem 260. Schwangerschaftstag spricht man von einer Frühgeburt. Eine Termin- oder Normalgeburt ist definiert mit einer Entbindung zwischen dem 260. bis 293. Schwangerschaftstag und ab Tag 294 spricht man von einer Übertragung (116).

Von den 48 untersuchten Schwangeren, kam es bei 5 Frauen zu einer Frühgeburt, bei einer Frau wurde der Entbindungstag nicht erfasst und 42 Frauen gebaren termingerecht. Es gab keine Übertragungen. 2024 lag die Frühgeburtenraten bei 6,8 %, bei der untersuchten Kohorte lag sie bei 12,5 %(101).

HMO-Profilierung

Dank der von der Forschungsgruppe zur Verfügung gestellten HMO-Daten, die aus Urinproben der untersuchten Kohorte gewonnen wurden, konnten die Mikrobiom-Daten mit den HMO-Daten verbunden werden.

Datenanalyse

Zur bioinformatischen Aufbereitung der Daten wurde der Microbiome Explorer in RStudio-2025.09.2-418 verwendet. Die α -Diversität der Proben wurde mittels Chao-Richness-Estimator und inversen Simpson-Diversitätsindex analysiert, die Resultate mittels R dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Aldex2 und Excel und die Korrelationen zwischen oder mit den Metadaten mittels t-Test.

Biostatistische Methodik einzelner Fragestellungen:

Zu Forschungsfrage 1c: Biostatistische Analyse zur Prüfung eines möglichen Zusammenhangs zwischen Sekretor-Status und den folgenden Parametern: maternaler BMI vor der Schwangerschaft, maternaler BMI bei Geburt und durchschnittliche Gewichtszunahme während der Schwangerschaft.

Mit Excel erhobene Werte Mittelwerte und Standardabweichungen:

Sekretor-Status	maternaler BMI vor der Schwangerschaft	maternaler BMI bei Geburt	durchschnittliche Gewichtszunahme in der Schwangerschaft
positiv (n = 35)	23,2 ± 4,6	28,5 ± 4,9	13,8 kg ± 5,7
negativ (n = 13)	26,0 ± 8,4	29,9 ± 7,9	11,1 kg ± 4,0

Zum Finden des passenden Tests und der benötigten Formeln zum Ausrechnen der Werte zur Ermittlung des p-Werts wurde KI gefragt, die Rechnung selbst erfolgte mit dem Taschenrechner. (Prompt: Art und Formeln der passenden statistischen Tests, ChatGPT 5.3, OpenAI, 02.03.2026; <https://chatgpt.com>)

Um zu ermitteln, ob die Beobachtungen zufällig oder statistisch signifikant sind, wurde der Welch-t-Test für unabhängige Gruppen mit großer Varianz und/oder Stichprobengröße verwendet. Aufgrund der großen Differenz zwischen den Standardabweichungen konnte nicht der klassische t-Test verwendet werden.

Welch-t-Test

Maternaler BMI vor der Schwangerschaft

1. Standardfehler der Mittelwertsdifferenz „maternaler BMI vor der Schwangerschaft“

$$SE_{ppBMI} = \sqrt{\frac{SD_{Secretor_positiv}^2}{n_{Secretor_positiv}} + \frac{SD_{Secretor_negativ}^2}{n_{Secretor_negativ}}} = \sqrt{\frac{4,6^2}{35} + \frac{8,4^2}{13}} = 2,5$$

2. T-Wert Berechnung

$$T - Wert_{ppBMI} = \frac{\text{Differenz der beiden Mittelwerte}}{SE} = \frac{2,8}{1,8} = 1,6$$

3. Welch-Satterthwaite-Formel

$$df = \frac{\left(\frac{SD_{Secretor_positiv}^2}{n_{Secretor_positiv}} + \frac{SD_{Secretor_negativ}^2}{n_{Secretor_negativ}}\right)^2}{\frac{\left(\frac{SD_{Secretor_positiv}^2}{n_{Secretor_positiv}}\right)^2}{n_{Secretor_positiv}^{-1}} + \frac{\left(\frac{SD_{Secretor_negativ}^2}{n_{Secretor_negativ}}\right)^2}{n_{Secretor_negativ}^{-1}}} = \frac{\left(\frac{4,6^2}{35} + \frac{8,4^2}{13}\right)^2}{\frac{\left(\frac{4,6^2}{35}\right)^2}{34} + \frac{\left(\frac{8,4^2}{13}\right)^2}{12}} = \frac{36,4}{2,47} = 14,7$$

$$p = 0,13$$

Maternaler BMI zum Zeitpunkt der Geburt

1. Standardfehler „maternaler BMI bei der Geburt“

$$SE_{lBMI} = \sqrt{\frac{SD_{Secretor_positiv}^2}{n_{Secretor_positiv}} + \frac{SD_{Secretor_negativ}^2}{n_{Secretor_negativ}}} = \sqrt{\frac{4,9^2}{35} + \frac{7,9^2}{13}} = 2,3$$

2. T-Wert Berechnung:

$$T - Wert_{lBMI} = \frac{\text{Differenz}}{SE} = \frac{1,4}{1,8} = 0,8$$

3. Welch-Satterthwaite-Formel

$$df = \frac{\left(\frac{SD_{Secretor_positiv}^2}{n_{Secretor_positiv}} + \frac{SD_{Secretor_negativ}^2}{n_{Secretor_negativ}}\right)^2}{\frac{\left(\frac{SD_{Secretor_positiv}^2}{n_{Secretor_positiv}}\right)^2}{n_{Secretor_positiv}^{-1}} + \frac{\left(\frac{SD_{Secretor_negativ}^2}{n_{Secretor_negativ}}\right)^2}{n_{Secretor_negativ}^{-1}}} = \frac{\left(\frac{4,9^2}{35} + \frac{7,9^2}{13}\right)^2}{\frac{\left(\frac{4,9^2}{35}\right)^2}{34} + \frac{\left(\frac{7,9^2}{13}\right)^2}{12}} = 14,8$$

$$p = 0,44$$

Maternale Gewichtszunahme während der Schwangerschaft

1. Standardfehler „Gewichtszunahme in der Schwangerschaft“

$$SE_{weightgain} = \sqrt{\frac{SD_{Secretor_positiv}^2}{n_{Secretor_positiv}} + \frac{SD_{Secretor_negativ}^2}{n_{Secretor_negativ}}} = \sqrt{\frac{5,7^2}{35} + \frac{4,0^2}{13}} = 1,5$$

2. T-Wert Berechnung:

$$T - Wert_{weightgain} = \frac{\text{Differenz}}{SE} = \frac{2,7}{1,5} = 1,8$$

3. Welch-Satterthwaite-Formel

$$df = \frac{\left(\frac{SD_{Secretor_positiv}^2}{n_{Secretor_positiv}} + \frac{SD_{Secretor_negativ}^2}{n_{Secretor_negativ}}\right)^2}{\frac{\left(\frac{SD_{Secretor_positiv}^2}{n_{Secretor_positiv}}\right)^2}{n_{Secretor_positiv}^{-1}} + \frac{\left(\frac{SD_{Secretor_negativ}^2}{n_{Secretor_negativ}}\right)^2}{n_{Secretor_negativ}^{-1}}} = \frac{\left(\frac{5,7^2}{35} + \frac{4,0^2}{13}\right)^2}{\frac{\left(\frac{5,7^2}{35}\right)^2}{34} + \frac{\left(\frac{4,0^2}{13}\right)^2}{12}} = 30,7$$

$$p = 0,08$$

Der Standardfehler der Mittelwertsdifferenz beschreibt, welche Streuung der Differenzen zwischen den Gruppenmittelwerten zu erwarten sind. Der t-Wert ergibt sich aus der Differenz der Mittelwerte / Standardfehler und gibt die Größe des Unterschieds zwischen den Gruppen im Verhältnis zur statistischen Streuung der Daten an. Ein niedriger t-Wert macht ein zufälliges Ereignis wahrscheinlicher, ein hoher t-Wert spricht eher für statistische Signifikanz. Die Welch-Satterthwaite-Formel wurde zur Ermittlung der Freiheitsgrade verwendet. Das sind die Anzahl der unabhängig variierenden Werte innerhalb einer statistischen Berechnung. Aus dem t-Wert und dem Freiheitsgrad lässt sich der p-Wert ermitteln.

Forschungsfrage 3: Analyse einer möglichen Korrelation zwischen intrauteriner fetaler Hormonproduktion und der Dominanz von *Lactobacillus* im Laufe der Schwangerschaft.

Für eine vereinfachte Vergleichbarkeit der Diversitätsanalysen wurden binäre Vergleichsgrößen für das Mikrobiom definiert.

Verglichen werden Mütter in Abhängigkeit des Kindsgeschlechts (w/m) und kategorisiert nach *Lactobacillus* Dominanz, gemessen am relativen Wert von *Lactobacillus* am Gesamtmikrobiom. Der Grenzwert ist dabei einmal mit $> 80\%$ / $\leq 80\%$ und einmal mit $> 50\%$ / $\leq 50\%$ definiert.

Die 2x2 Kontingenztafeln für den Vergleich binärer Größen bilden die Grundlage für die anschließende Odds Berechnung.

Tabelle A: Kontingenztafel mit *Lactobacillus*-Werten $>/\leq 80\%$ nach Kindsgeschlecht aufgeteilt

		Mütter weiblicher Föten n = 28	Mütter männlicher Föten n = 18
V1	> 80 %	6	6
	$\leq 80\%$	22	12
V2	> 80 %	8	8
	$\leq 80\%$	20	10
V3	> 80 %	8	7
	$\leq 80\%$	20	11
V4	> 80 %	9	6
	$\leq 80\%$	19	12

Tabelle B: Kontingenztafel mit *Lactobacillus*-Werten $>/\leq 50\%$ nach Kindsgeschlecht aufgeteilt

		Mütter weiblicher Föten n = 28	Mütter männlicher Föten n = 18
V1	> 50 %	4	5
	$\leq 50\%$	24	13
V2	> 50 %	7	3
	$\leq 50\%$	21	15
V3	> 50 %	5	4
	$\leq 50\%$	23	14
V4	> 50 %	4	3
	$\leq 50\%$	24	15

Errechnung der Odds-Ratio (OR) $\leq 80\%$ *Lactobacillus*:

	$\leq 80\%$ <i>Lactobacillus</i>	$> 80\%$ <i>Lactobacillus</i>
Weiblich (w)	a	b
Männlich (m)	c	d

$$OR \text{ für } V1 = \frac{a \times d}{b \times c} = \frac{\leq 80\% (w) \times > 80\% (m)}{\leq 80\% (m) \times > 80\% (w)} = \frac{6 \times 12}{6 \times 22} = 0,5$$

$$OR \text{ für } V2 = \frac{8 \times 10}{8 \times 20} = 0,5$$

$$OR \text{ für } V3 = \frac{8 \times 11}{7 \times 20} = 0,6$$

$$OR \text{ für } V4 = \frac{9 \times 12}{6 \times 19} = 0,9$$

Errechnung der Odds-Ratio $\leq 50\%$ *Lactobacillus*:

	$\leq 50\%$ <i>Lactobacillus</i>	$> 50\%$ <i>Lactobacillus</i>
Weiblich (w)	a	b
Männlich (m)	c	d

$$OR \text{ für } T1 = \frac{a \times d}{b \times c} = \frac{\leq 50\% (w) \times > 50\% (m)}{\leq 50\% (m) \times > 50\% (w)} = \frac{4 \times 13}{5 \times 24} = 0,4$$

$$OR \text{ für } T2 = \frac{7 \times 15}{3 \times 21} = 1,7$$

$$OR \text{ für } T3 = \frac{5 \times 14}{4 \times 23} = 0,8$$

$$OR \text{ für } T4 = \frac{4 \times 15}{3 \times 24} = 0,8$$

Daraufhin folgte die Durchführung des Fisher's Exact Test für 2x2 mit der Software RStudio-2025.09.2-418 zur weiteren statistischen Bewertung der beobachteten Unterschiede zwischen den Gruppen. Der Fisher's Exact Test ist ein Signifikanztest und berechnet die Wahrscheinlichkeit, die vorliegende oder extremere Beobachtungen zu erhalten, wenn die Nullhypothese angenommen wird. Die Nullhypothese H_0 war: Das fetale Geschlecht hat keinen Einfluss auf die *Lactobacillus* Dominanz.

Mit der Eingabe `matrix_1_80 <- matrix(c(6,22,6,12), nrow=2, byrow=TRUE)` in RStudio wurde eine Matrix als Pendant zur Kontingenztafel erstellt. Diese wurde dann mit dem Befehl `fisher.test(matrix_1_80)` zur Durchführung des Fisher's Exact Text für 2x2 verwendet. Ermittelt wurden automatisch p-Werte, 95 % - Intervalle und die Odds-Rationes. Das gleiche passierte auch mit den entsprechenden Werten für die anderen Zeitpunkte von *Lactobacillus* $>/\leq 80\%$ und für alle Zeitpunkte von *Lactobacillus* $>/\leq 50\%$.

Verwendete Matrizen:

Tabelle E (*Lactobacillus* $>/\leq 80\%$)

```
matrix_1_80 <- matrix(c(6,22,6,12), nrow=2, byrow=TRUE)
rownames(matrix_1_80) <- c("weibl", "männl")
colnames(matrix_1_80) <- c("unter80", "ueber80")
fisher.test(matrix_1_80)
matrix_2_80 <- matrix(c(8,20,6,12), nrow=2, byrow=TRUE)
rownames(matrix_2_80) <- c("weibl", "männl")
colnames(matrix_2_80) <- c("unter80", "ueber80")
fisher.test(matrix_2_80)
matrix_3_80 <- matrix(c(8,20,7,11), nrow=2, byrow=TRUE)
rownames(matrix_3_80) <- c("weibl", "männl")
colnames(matrix_3_80) <- c("unter80", "ueber80")
fisher.test(matrix_3_80)
matrix_4_80 <- matrix(c(9,19,6,12), nrow=2, byrow=TRUE)
rownames(matrix_4_80) <- c("weibl", "männl")
colnames(matrix_4_80) <- c("unter80", "ueber80")
fisher.test(matrix_4_80)
```

Tabelle F (*Lactobacillus* >/≤ 50%)

```
matrix_1_50 <- matrix(c(4, 24,5,13), nrow=2, byrow=TRUE)
rownames(matrix_1_50) <- c("weibl","männl")
colnames(matrix_1_50) <- c("unter50","ueber50")
fisher.test(matrix_1_50)
matrix_2_50 <- matrix(c(7, 21, 3, 15), nrow=2, byrow=TRUE)
rownames(matrix_2_50) <- c("weibl","männl")
colnames(matrix_2_50) <- c("unter50","ueber50")
fisher.test(matrix_2_50)
matrix_3_50 <- matrix(c(5,23,4,14), nrow=2, byrow=TRUE)
rownames(matrix_3_50) <- c("weibl","männl")
colnames(matrix_3_50) <- c("unter50","ueber50")
fisher.test(matrix_3_50)
matrix_4_50 <- matrix(c(4,24,3,15), nrow=2, byrow=TRUE)
rownames(matrix_4_50) <- c("weibl","männl")
colnames(matrix_4_50) <- c("unter50","ueber50")
fisher.test(matrix_4_50)
```

Forschungsfrage 6b: Ob es einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Sekretor-Status und Frühgeburtlichkeit gibt, wurde mittels Fisher's Exact Test ermittelt:

Tabelle C: Diese Kontingenztafel zeigt den Anteil der Früh- bzw. Termingeburten in Abhängigkeit des Sekretor-Status

	Sekretor-negativ n = 13	Sekretor-positiv n = 33
Termingeburt	11	31
Frühgeburt	2	2

Odds Ratio:

	Sekretor-negativ	Sekretor-positiv
Termingeburt	b	d
Frühgeburt	a	c

Odds Ratio: $OR \text{ für } SecFrueh = \frac{a \times d}{b \times c} = \frac{2 \times 31}{11 \times 2} \approx 2.8$

Dann folgte Durchführung des Fisher's Exact Test für 2x2 mit der Software RStudio-2025.09.2-418 für die statistischen Bewertung der beobachteten Unterschiede zwischen den Gruppen. Die Nullhypothese H_0 war: Der Sekretor-Status hat keinen Einfluss darauf, ob es zu einer Frühgeburt kommt.

Mit der Eingabe `matrix_SecFrueh <- matrix(c(2,11,2,31), nrow=2, byrow=TRUE)` in R Studio wurde eine Matrix als Pendant zur Kontingenztafel erstellt. Diese wurde dann mit dem Befehl `fisher.test(matrix_SecFrueh)` zur Durchführung des Fisher's Exact Text für 2x2 verwendet. Ermittelt wurden automatisch p-Werte, 95%-Intervalle und die Odds-Ratio.

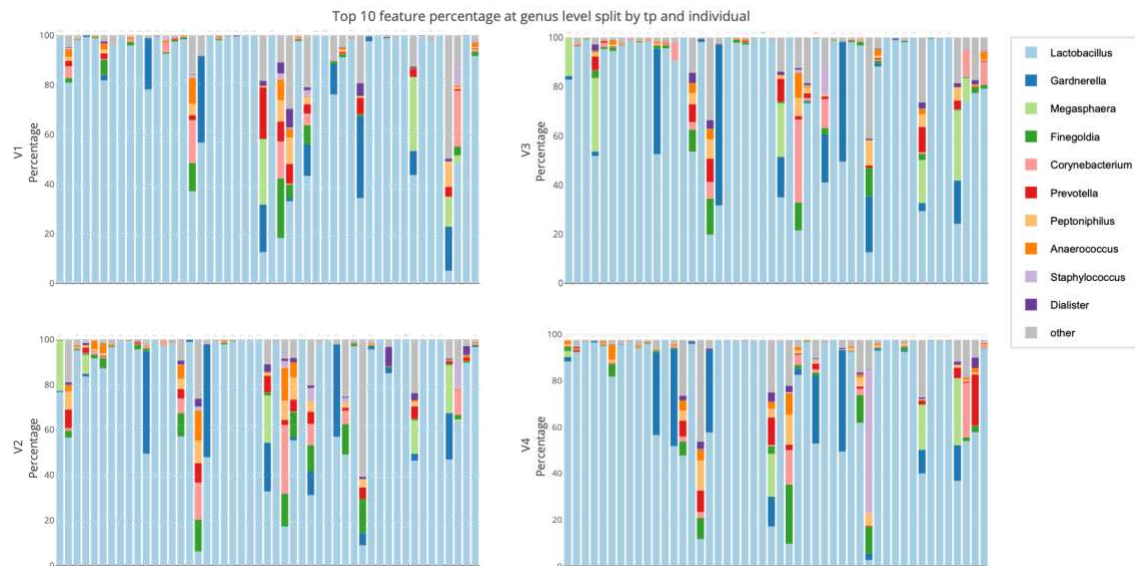
Verwendete Matrix:

```
matrix_SecFrueh <- matrix(c(2,11,2,31), nrow=2, byrow=TRUE)
rownames(matrix_SecFrueh) <- c("sec_neg", "sec_pos")
colnames(matrix_SecFrueh) <- c("frühgeburt", "termingeburt")
fisher.test(matrix_SecFrueh)
```

Ergebnisse mit graphischen Darstellungen

Diversität des Mikrobioms

Forschungsfrage 1: Kann bei der untersuchten Kohorte eine Anreicherung von *Lactobacillus* im Laufe der Schwangerschaft nachgewiesen werden?

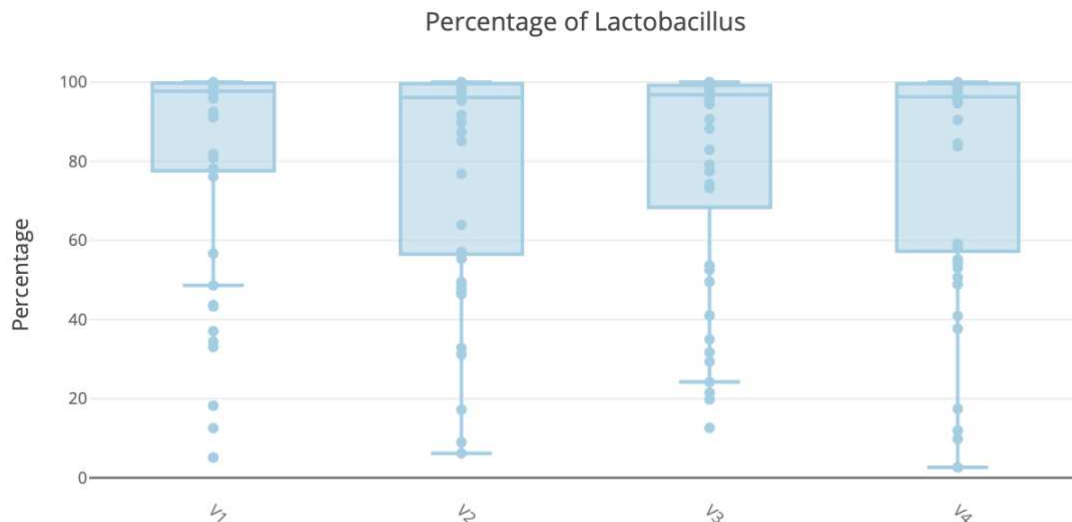


Grafik A: Das prozentuelle Vorkommen der zehn häufigsten Bakterien-Gattung im vaginalen Mikrobiom, sortiert nach Messzeitpunkt V1-V4 und Individuum (jeder Balken entspricht einem Individuum).

Bereits bei einer ersten, überblicksmäßigen Sichtung der Daten (Grafik A) zeigte sich, dass das vaginale Mikrobiom bei dem Großteil der 48 Frauen zu allen Zeitpunkten V1-V4 von *Lactobacillus* dominiert wird. Im Folgenden wird ein Mindestanteil von *Lactobacillus* von über 50 % als Dominanz dieser Spezies definiert. Im zeitlichen Verlauf fällt auf, dass der Anteil der Frauen, die eine *Lactobacillus* Dominanz haben, zum Ende der Schwangerschaft hin leicht steigt, während der Anteil der Frauen, deren Mikrobiom zu mehr als 80 % oder 90 % von *Lactobacillus* besiedelt wird, leicht abnimmt. Diese Änderungen sind jedoch zu gering, um sie als signifikant oder Tendenz werten zu können.

Tabelle D: Absolute Anzahl an Frauen *Lactobacillus*-Anteil über 50 %, über 80 % und über 90 %

Absolute Anzahl von Frauen (gesamt: 48)	<i>Lactobacillus</i> > 50 %	<i>Lactobacillus</i> > 80 %	<i>Lactobacillus</i> > 90 %
V1	39	36	34
V2	38	32	29
V3	39	32	30
V4	41	33	31



Grafik B: Relative Abundanz von *Lactobacillus* Gattungen pro Frau zu den Zeitpunkten V1, V2, V3 und V4

Die Grafik B zeigt den prozentuellen Anteil von *Lactobacillus* an der Zusammensetzung des vaginalen Mikrobioms. Die x-Achse markiert die vier durchgeführten Messzeitpunkte V1-V4. Jeder abgebildete Punkt steht für eine untersuchte Schwangere. Die Größe der Box korreliert mit der Varianz der Daten zwischen den einzelnen Frauen.

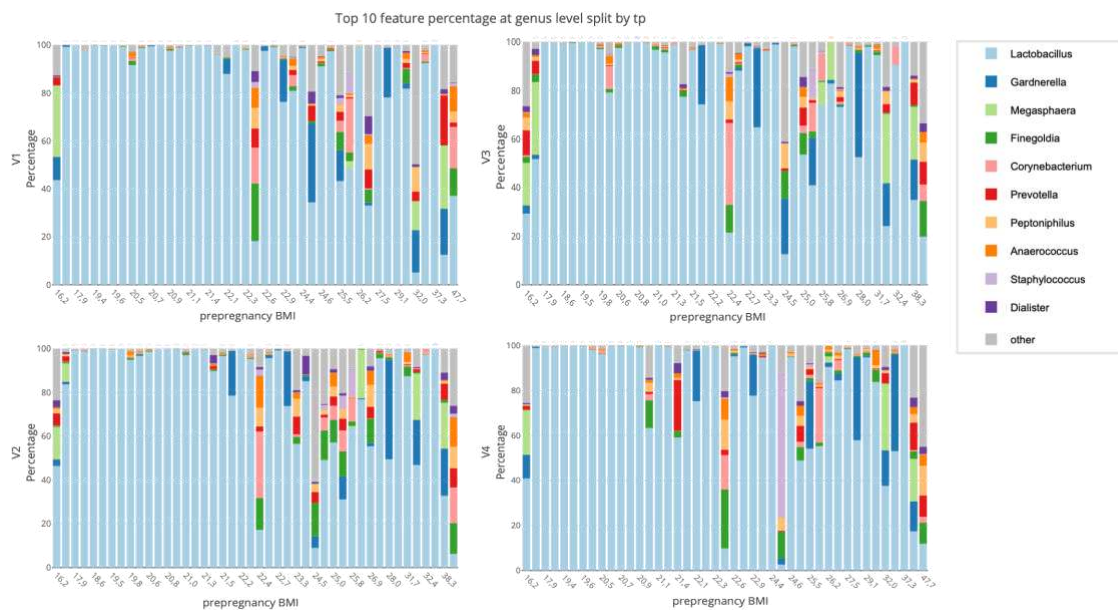
Interpretation: In der untersuchten Kohorte konnte keine klare Änderung der *Lactobacillus*-Abundanz beobachtet werden. Für alle Messzeitpunkte zeigten sich stabil hohe Prozentsätze für *Lactobacillus*, sodass insgesamt gesagt werden kann, dass das vaginale Mikrobiom durchschnittlich sehr von *Lactobacillus* dominiert wird. Statt einer linearen Zu- oder Abnahme dieser Dominanz im Verlauf der Schwangerschaft können in der hier untersuchten Kohorte nur Schwankungen beobachtet werden. Jene Frauen mit fehlender *Lactobacillus* Dominanz ($\leq 50\%$ *Lactobacillus*), werden in der Regel nicht von einer anderen Spezies dominiert, sondern weisen diverse Bakterienspezies auf.

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Metadaten-Analyse dargestellt, bei der verschiedene Variablen untersucht wurden, die mit einer Veränderung der Zusammensetzung des vaginalen Mikrobioms korrelieren könnten:

Der prägraviden BMI

Forschungsfrage 1a: Haben Frauen mit einem erhöhten prägraviden BMI (ppBMI, prepregnancy BMI) ein verändertes Mikrobiom?

Wie bereits aus Tabelle 4 hervorgeht, ist der Anteil der Frauen mit diversem Mikrobiom zum Zeitpunkt V1 9/48, bei V2 10/48, bei V3 9/48 und bei V4 7/48. Bei der Auswertung der Metadaten von acht Frauen mit niedrigen *Lactobacillus* Dominanzen fiel auf, dass fünf von acht ein Gewicht außerhalb des Normbereichs hatten. Eine Person war untergewichtig, vier Personen übergewichtig.

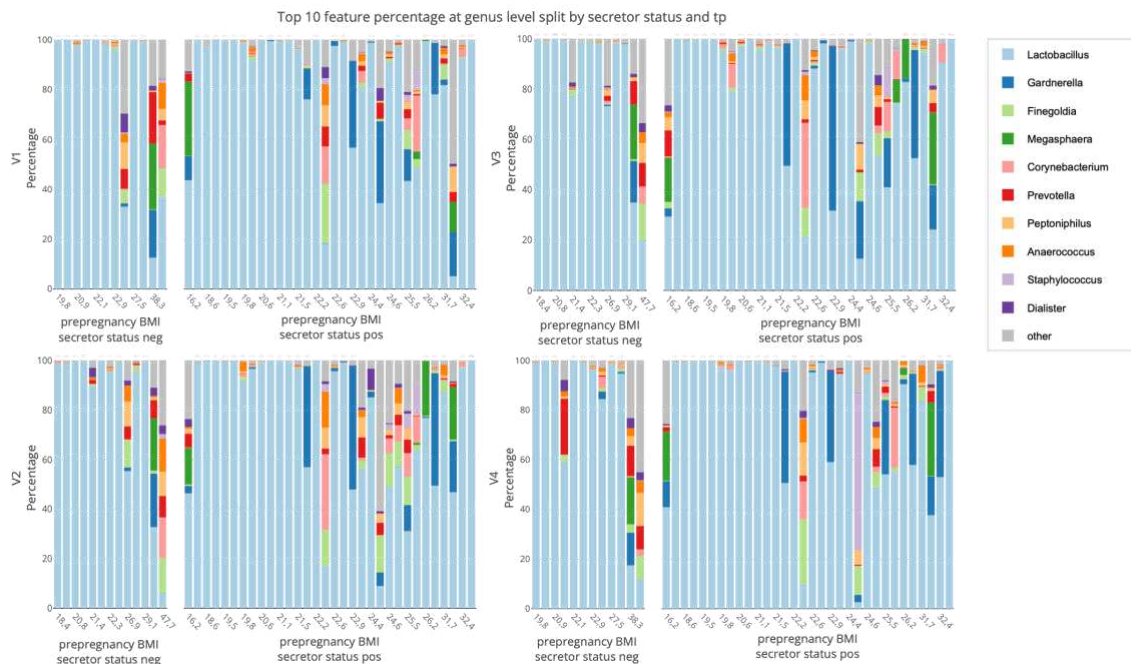


Grafik C: Die zehn häufigsten Bakterien-Gattungen in Abhängigkeit der Messzeitpunkte V1-V4 und des prägraviden BMI-Wertes

Zur genaueren Analyse der Korrelation zwischen höheren prägraviden BMI-Werten und der Diversität werden in Grafik C alle vier Messzeitpunkte separiert dargestellt. Die Grafik zeigt die zehn häufigsten Vertreter der durchschnittlichen Zusammensetzung des vaginalen Mikrobioms in Abhängigkeit des BMIs, der auf der x-Achse dargestellt ist. Frauen mit einem BMI zwischen 17,9 und 21,5 scheinen tendenziell ein stark *Lactobacillus* dominiertes vaginales Mikrobiom zu besitzen. Bei steigendem BMI steigt tendenziell die Anzahl der Frauen mit diversem Mikrobiom. Diese Musteränderung beginnt bereits ab einem BMI > 22, der definitionsgemäß als normalgewichtig gilt. Des Weiteren lässt sich erkennen, dass auch ein sehr geringer BMI < 17 mit einer veränderten mikrobiellen Komposition korrelieren kann. Ein BMI-Wert im unteren Normbereich scheint demnach günstig für eine *Lactobacillus* Dominanz zu sein. Ab einem prägraviden-BMI von > 21,5

spielt *Gardnerella* bei manchen Frauen eine Rolle beim Aufbau des vaginalen Mikrobioms. Andere Gattungen wie *Megasphaera*, *Finnegoldia*, *Corynebakterien* und *Prevotella* erscheinen eher sporadisch.

Forschungsfrage 1aa: Sind das Gestationsalter oder der Sekretor-Status Einflussfaktoren auf die Korrelation zwischen BMI und Veränderungen des Mikrobioms?

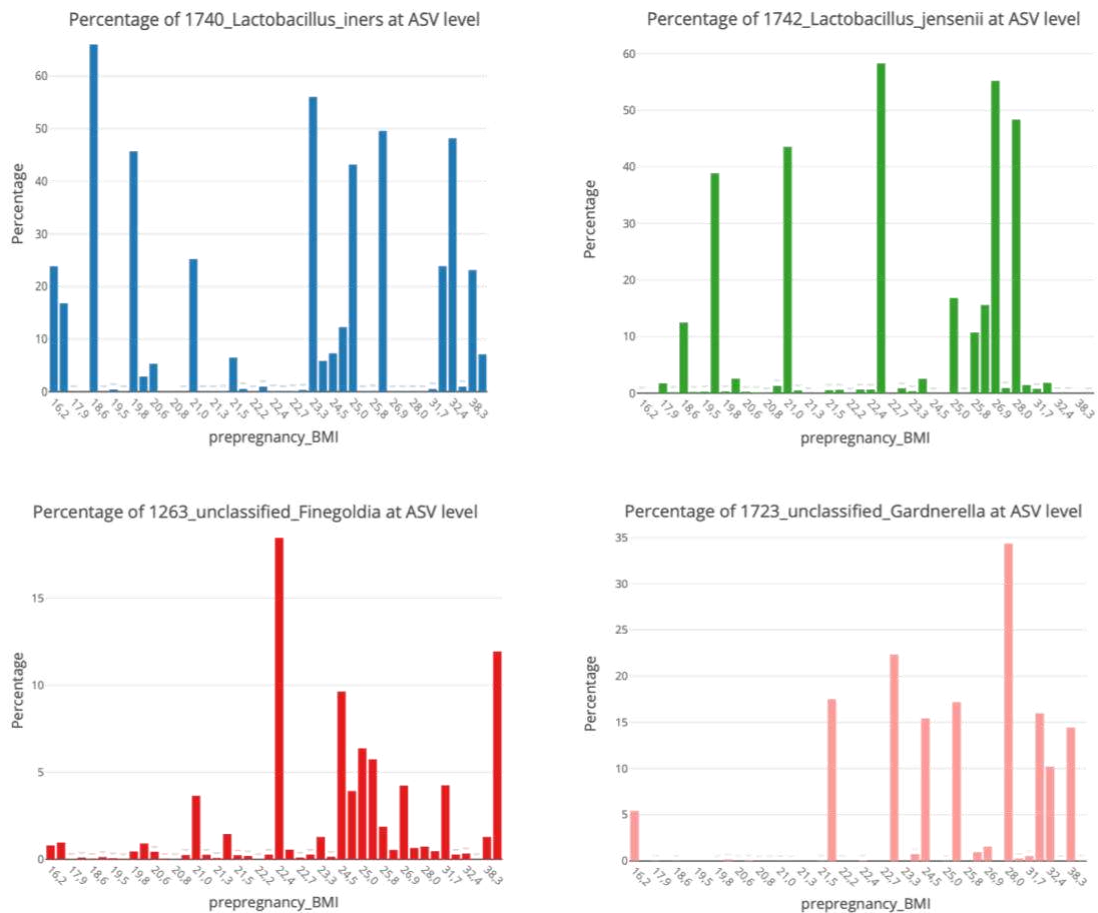


Grafik D Die zehn häufigsten Bakterien-Gattungen in Abhängigkeit des prägraviden BMIs, dem Sekretor-Status und den Messzeitpunkten

Die x-Achse ist nach dem BMI-Wert in steigender Reihenfolge sortiert und unterteilt in Abhängigkeit des Sekretor-Status, während die y-Achse die prozentuellen Anteile der zehn häufigsten Bakterien-Gattungen zeigt.

Interpretation: Auch hier zeigt sich die Tendenz, dass Frauen mit höherem BMI ein anderes mikrobielles Muster haben. Weiters fällt auf, dass die verringerte *Lactobacillus* Dominanz bei erhöhtem BMI kein zeitpunktabhängiges Phänomen ist - vom Beginn bis zum Ende der Schwangerschaft bleibt die Tendenz erhalten. Weder der Sekretor-Status noch das Gestationsalter scheinen demnach einen Einfluss auf die visuelle Korrelation zwischen dem mikrobiellen Muster und dem BMI zu haben.

Forschungsfrage 1b: Inwiefern verändern sich die relativen Anteile ausgewählter Amplicon Sequencing Variants (ASVs) (*Finegoldia*, *Gardnerella*, *Lactobacillus iners*, *Lactobacillus jensenii*) am vaginalen Mikrobiom in Abhängigkeit des prägraviden BMI-Werts?



Grafik E: Prozentuelle Anteile ausgewählter ASVs, die den Spezies *Lactobacillus iners* und *Lactobacillus jensenii* sowie den Gattungen *Gardnerella* und *Finegoldia* taxonomisch zugeordnet wurden.

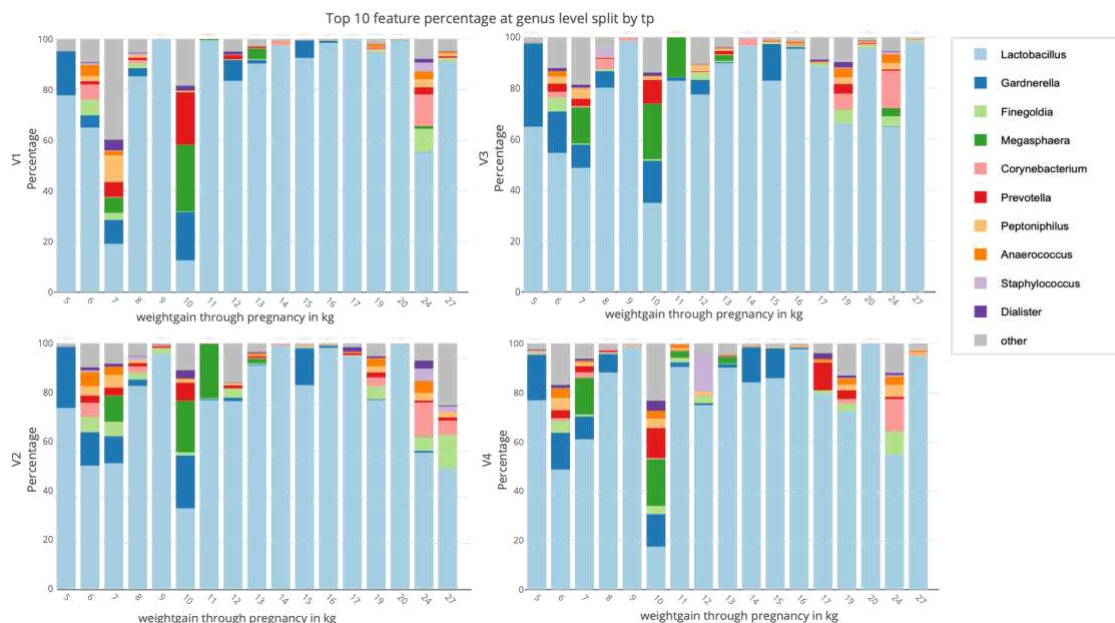
Für die Analyse auf ASV-Ebene wurden ASVs mit vergleichsweise hoher relativer Abundanz im Datensatz und bekannter Bedeutung für das vaginale Mikrobiom ausgewählt.

Interpretation: Das ASV, das taxonomisch *Lactobacillus iners* zugeordnet wurde, zeigte tendenziell hohe Werte über das gesamte BMI-Spektrum. Es können keine Trends bezüglich einer Korrelation von ASV_1740_ *Lactobacillus iners* mit hohen oder niedrigen BMI-Werten beschrieben werden. Bezüglich *Lactobacillus jensenii* verhält es sich ähnlich: Das ASV zeigt insgesamt hohe Werte, in der BMI-Gruppe zwischen 25 bis 32 ist ASV_1742- *Lactobacillus jensenii* tendenziell häufiger ein Bestandteil des vaginalen Mikrobioms. Das ASV_1263_unclassified_ *Finegoldia*

weist bei Frauen mit niedrigem prägravidem BMI eher geringe Abundanzen auf, während höhere Anteile von *Finegoldia* bei höheren prägravidem BMI-Werten zu beobachten sind. Bei *Gardnerella* ist der Unterschied noch deutlicher: Frauen mit BMI im oberen Untergewichtsbereich beziehungsweise unteren Normalbereich weisen fast keine oder sehr geringe *Gardnerella* Abundanzen auf. Ab einem BMI-Wert von über 24 bis 25 treten deutlich häufiger Peaks auf mit Höchstwerten von knapp 35%.

Gewichtszunahme in der Schwangerschaft

Forschungsfrage 1c: Gibt es eine Korrelation zwischen dem Ausmaß der mütterlichen Gewichtszunahme während Schwangerschaft und der Zusammensetzung des Mikrobioms?



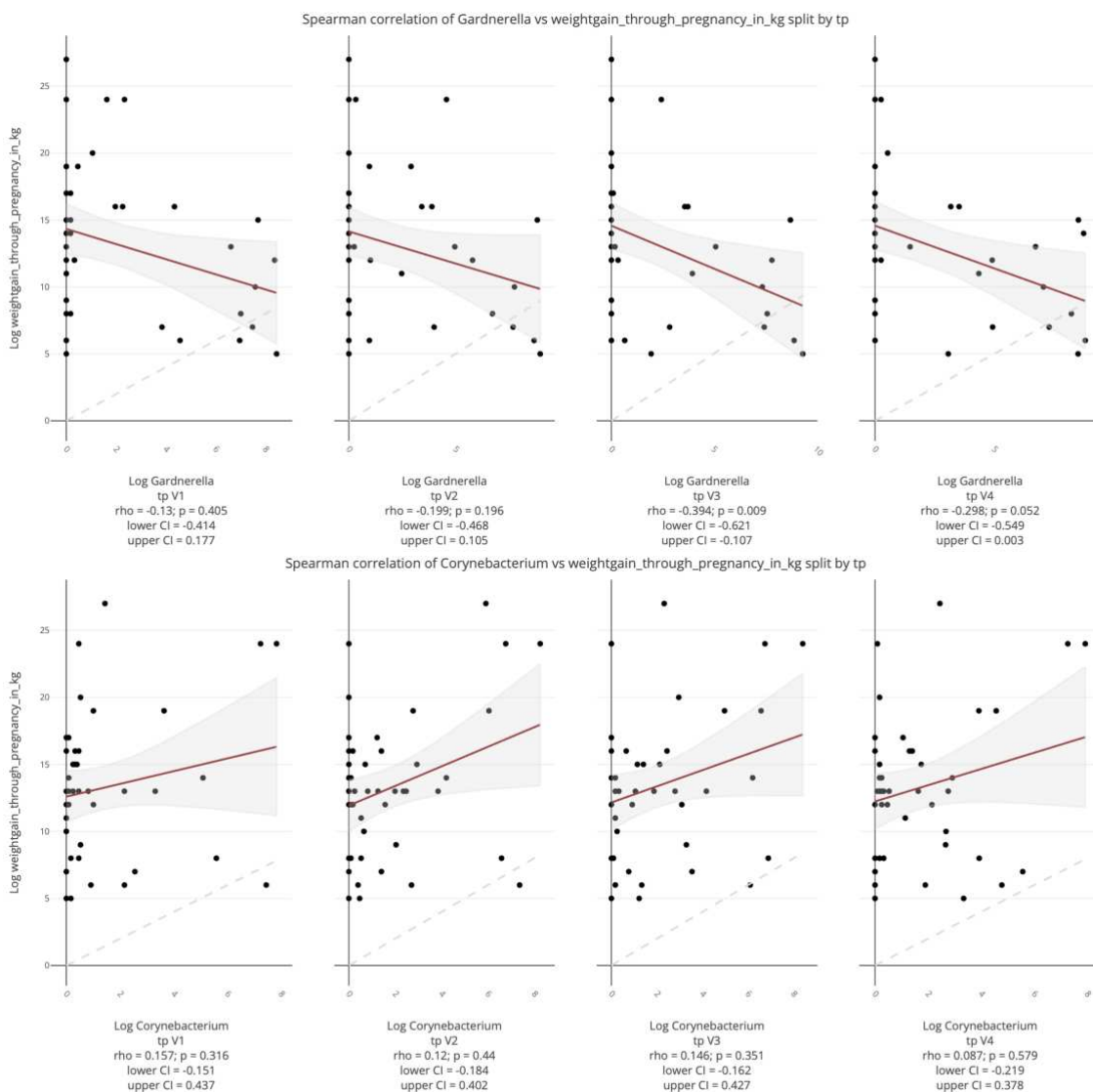
Grafik F: Die zehn häufigsten Bakterien-Gattungen in Abhängigkeit der Gewichtszunahme in der Schwangerschaft und der Messzeitpunkte V1-V4

Die Grafik F zeigt die relativen vaginalen Mikrobiom-Anteile in Abhängigkeit der maternalen Gewichtszunahme in kg (x-Achse) während der Schwangerschaft zu den vier Messzeitpunkten.

Interpretation: Betrachtet man die mikrobiellen Muster fällt auf, dass jene Frauen, die wenig Gewicht zugenommen haben, tendenziell verringerte *Lactobacillus* Anteile zeigten, während Frauen mit einer Gewichtszunahme zwischen 11 bis 20 kg nur eine leichte Verringerung dieser zeigten. Die geringste

Gewichtszunahme (5kg) korrelierte mit dem Mikrobiom einer Frau mit *Lactobacillus-Gardnerella*-Co Dominanz (> 50 % *Lactobacillus*; > 10 % *Gardnerella*). Die Person mit der ausgeprägtesten Gewichtszunahme (27kg) hat trotz Schwankungen zu Beginn und zum Ende der Schwangerschaft ein sehr *Lactobacillus* dominiertes Mikrobiom. *Gardnerella* scheint bei den Frauen, die über 15kg Gewicht zunahmten, keine relevante Rolle an der mikrobiellen Komposition zu spielen, sondern findet sich tendenziell häufiger bei Frauen mit geringer Gewichtszunahme. Diese Beobachtung sind jedoch zu unspezifisch, um von korrelativen Tendenzen zwischen dem Ausmaß der Gewichtszunahme während der Schwangerschaft und der Diversität des Mikrobioms sprechen zu können.

Forschungsfrage 1cc: Welche Spezies kommen in Abhängigkeit vom Ausmaß der Gewichtszunahme neben *Lactobacillus* in der vaginalen Mikrobiom-Komposition vor?



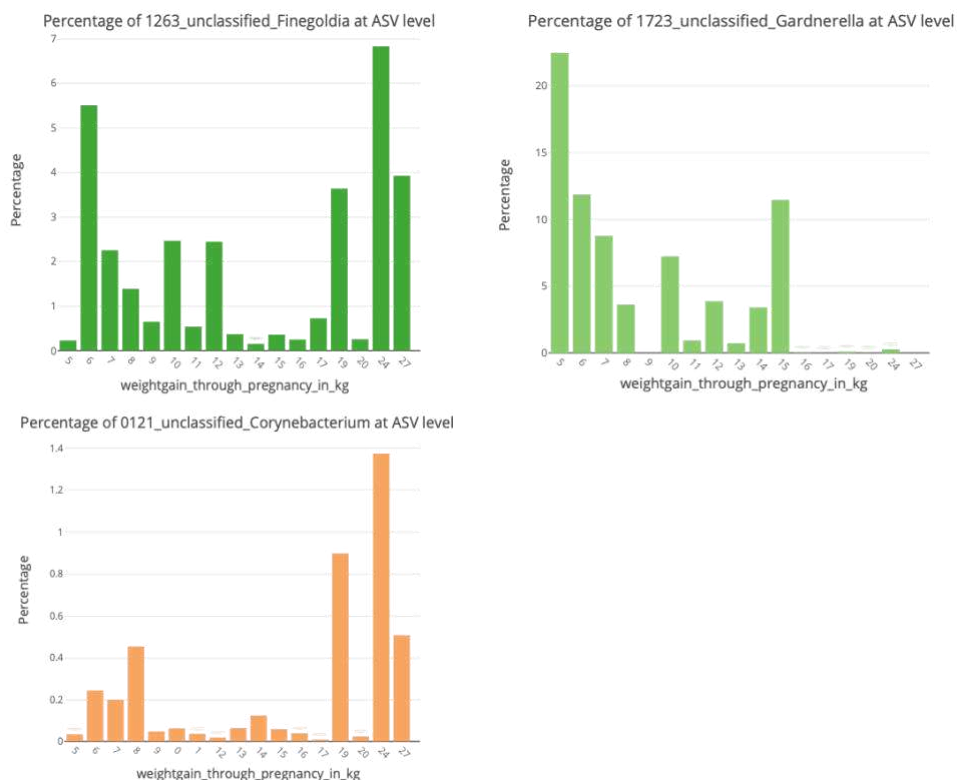
Grafik G: Spearman-Korrelation von Gardnerella (oben) und Corynebacterium (unten) mit dem Ausmaß der Gewichtszunahme in der Schwangerschaft in Abhängigkeit der Messzeitpunkte T1-T4

Die Grafiken zeigen die Spearman Korrelation wobei auf der x-Achse die log-transformierte Abundanz von Gardnerella bzw. Corynebacterium dargestellt ist und auf der y-Achse die log-transformierte Gewichtszunahme während der Schwangerschaft in Kilogramm. Jeder Punkt stellt eine Schwangere dar - je weiter rechts der Punkt liegt, desto mehr Gardnerella bzw. Corynebacterium wurde gemessen und je höher der Punkt liegt, desto mehr Gewicht wurde zugenommen. Die einzelnen Panels entsprechen den Messzeitpunkten V1 bis V4. Rho beschreibt

die Stärke der Korrelationen. Der Wert „1“ würde eine direkte Proportionalität anzeigen, „-1“ eine indirekte Proportionalität. Der p-Wert beschreibt die statistische Signifikanz, wobei ein p-Wert von $< 0,05$ bei einem 95 %-Konfidenzintervall als signifikant gilt. CI bildet das Konfidenzintervall ab und sollte den Wert 0 nicht miteinschließen, um für einen statistisch signifikanten Zusammenhang zu sprechen.

Interpretation: Frauen, die sehr wenig Gewicht zugenommen haben, hatten im Vergleich zu Frauen, die sehr viel zugenommen hatten, eher ein *Gardnerella*-reiches Mikrobiom. Bei gesteigerter Gewichtszunahme zeigten sich höhere Abundanzen von *Corynebacterium*. Bis auf den Messzeitpunkt V3 für *Gardnerella* war keines der Ergebnisse signifikant, es lassen sich jedoch Tendenzen zeigen. Die Effekte bei der Analyse der log-transformierten Abundanz von *Gardnerella* sind klarer, als jene von *Corynebacterium*.

Analyse auf ASV-Ebene:



Corynebacterium wurde ausgewählt, da bei der Spearman Korrelation ein tendenzieller Zusammenhang zwischen der Gattungen und einer erhöhten Gewichtszunahme beobachtet werden konnte.

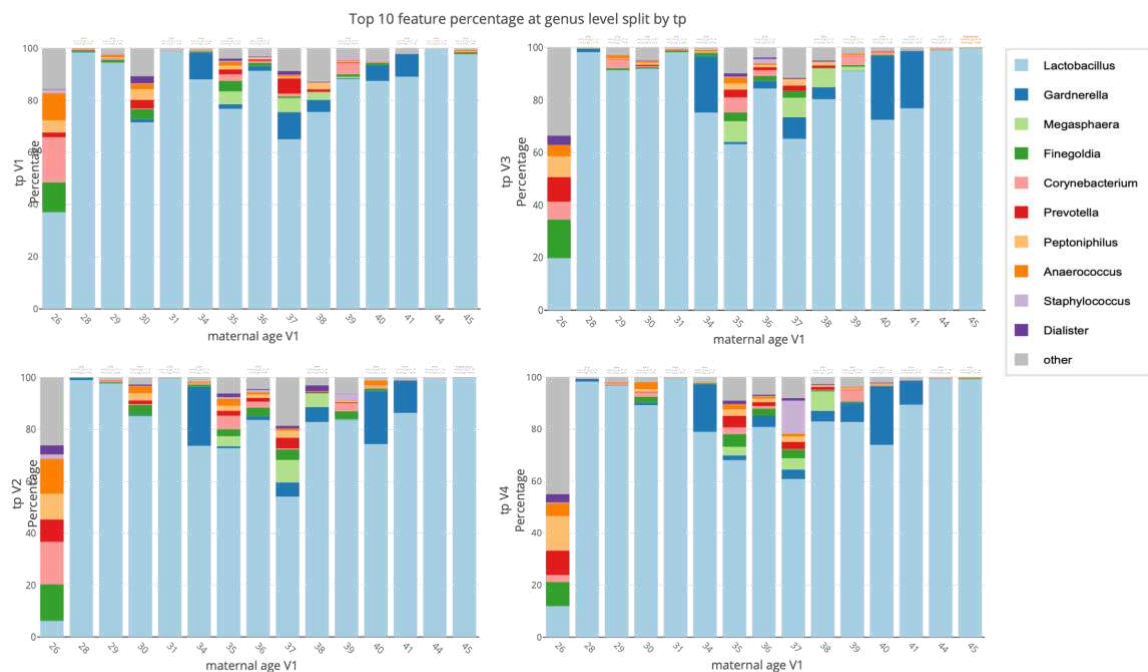
Für das 1263_unclassified_Finegoldia zeigen sich vor allem für Frauen mit sehr geringer und sehr ausgeprägter Gewichtszunahme erhöhte prozentuelle Anteile. Durch die Variationen zwischen den untersuchten Personen gab es keine erkennbare lineare Beziehung für die Gewichtszunahme.

Bei dem *Gardnerella* zugeordneten 1732_unclassified_Gardnerella ASV zeigte sich tendenziell eine Abnahme der relativen Abundanz mit steigender Gewichtszunahme - eine Tendenz zur indirekten Proportionalität ist erkennbar.

Bei der grafischen Analyse von 0121_unclassified_Corynebacterium zeigt sich eine schwache Zunahme des relativen Anteils des ASVs proportional zur Gewichtszunahme in der Schwangerschaft.

Das mütterliche Alter

Forschungsfrage 2: Inwiefern beeinflusst das mütterliche Alter die mikrobielle Zusammensetzung?

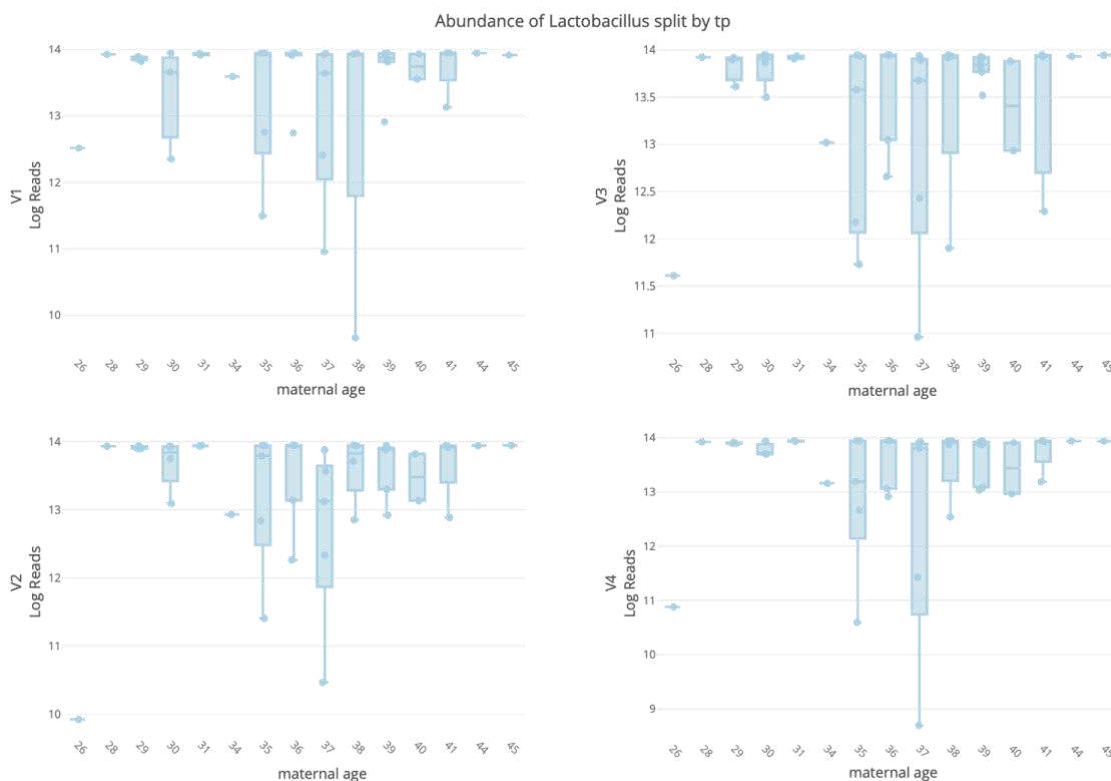


Grafik I: Die zehn häufigsten Bakterien-Gattungen in Abhängigkeit des maternalen Alters bei Erstvorstellung und den Messzeitpunkten V1-V4

In Grafik I ist das mütterliche Alter, das bei Messzeitpunkt V1 erhoben wurde, auf der x-Achse aufsteigend angeordnet. Die y-Achse skaliert prozentuell die zehn am häufigsten vorkommenden Gattungen im vaginalen Mikrobiom.

Interpretation: Es zeigte sich bei der jüngsten Schwangeren mit 26 Jahren die niedrigsten relativen Anteile von *Lactobacillus*. Sich ähnelnde Mikrobiom-Kompositionen konnten bei Frauen zwischen 28 bis 31 und 44 bis 45 Jahren beobachtet werden: sie hatten ein stark von *Lactobacillus* dominiertes vaginales Mikrobiom. Auch Frauen im mittleren Alter zwischen 35 bis 41 zeigten ähnliche *Lactobacillus*-Werte zwischen etwa 60 - 80 % und teilweiser Beteiligung von *Gardnerella* an der mikrobiellen Komposition. Insgesamt ergaben sich hier keine signifikanten Tendenzen für einen Zusammenhang zwischen Alter und Zusammensetzung des Mikrobioms oder altersabhängige Prädominanz bestimmter Gattungen.

Forschungsfrage 2a: Schwankt die Besiedelung mit *Lactobacillus* bei Schwangeren höheren Alters stärker als bei jüngeren Schwangeren?



Grafik J: relative Abundanz von *Lactobacillus* in logReads in Abhängigkeit des maternalen Alters und der 4 Messzeitpunkte V1-V4

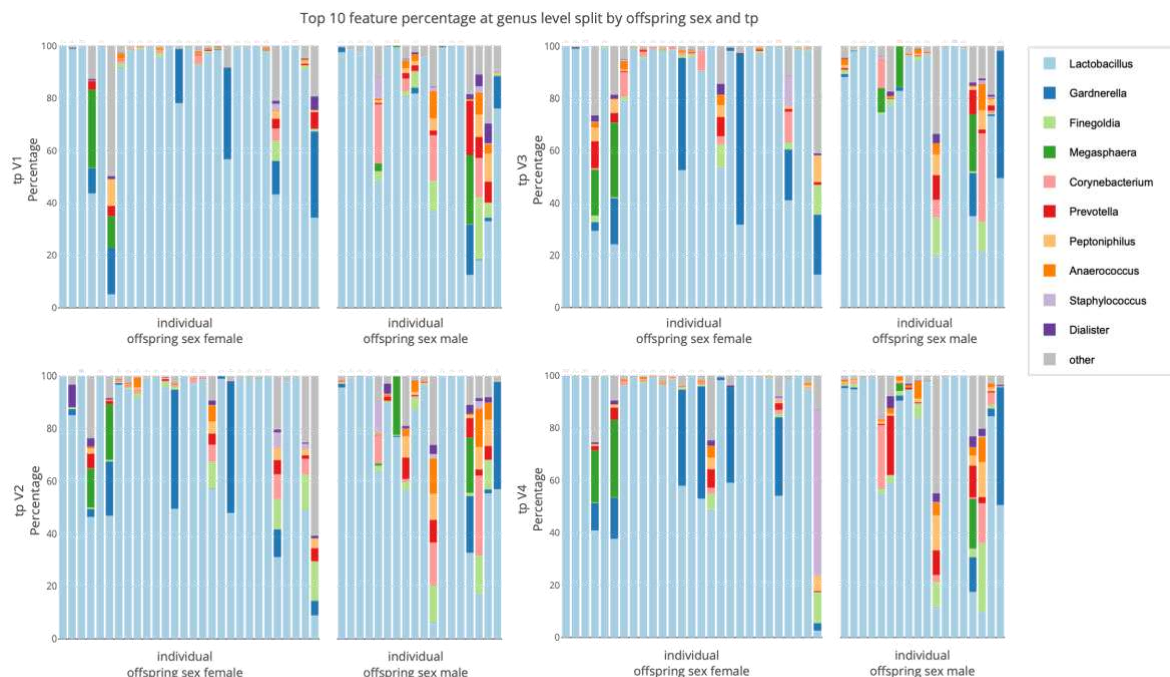
In Grafik K wird die Abundanz von *Lactobacillus* in Abhängigkeit vom mütterlichen Alter und den Messzeitpunkten dargestellt. Auf der x-Achse ist in aufsteigender Ordnung das Alter in Jahren angegeben, die y-Achse wurde auf log-transformierte Reads von *Lactobacillus* genormt.

Interpretation: Die *Lactobacillus* Abundanz (log-Reads) bleibt über alle Altersgruppe hinweg in allen vier Messzeitpunkten insgesamt hoch und stabil.

Dass die log-Reads in Bereichen zwischen 12-14 liegen deutet auf ein generell hohes *Lactobacillus* Vorkommen in allen Gruppen hin. Zwischen den Altersgruppen sind Unterschiede klein, kein Alter sticht mit besonders hohen oder niedrigen Werten hervor. Auch im zeitlichen Verlauf zeigen sich keine signifikanten Veränderungen oder ein klar zu- bzw. abnehmender Trend des *Lactobacillus*-Vorkommens, auch wenn es Schwankungen und einzelne Ausreißer nach unten gibt. Was jedoch beobachtet werden kann, ist dass die Abundanz größeren Schwankungen in den Altersgruppen zwischen 35 und 41 Jahren unterliegt.

Intrauterine fetale Hormonproduktion

Forschungsfrage 3: Beeinflusst die intrauterine Hormonproduktion des Fötus geschlechtsspezifisch die Dominanz von *Lactobacillus* im Laufe der Schwangerschaft?



Grafik K: Die zehn häufigsten Bakterien-Gattungen in Abhängigkeit des Kindsgeschlechts und der Messzeitpunkte V1-V4

In der Grafik J sind die x-Achsen nach Geschlecht des ungeborenen Fötus aufgeteilt, um eine Vergleichbarkeit der vaginalen Mikrobiom-Komposition nach Geschlecht und Messzeitpunkt zu schaffen.

Interpretation: Beim Vergleich der vaginalen Mikrobiome der 28 Mütter weiblicher mit den 28 Müttern männlicher Föten, fällt auf, dass die vaginalen Mikrobiome von Müttern männlicher Föten tendenziell anders zusammengesetzt sind. Während bei den Müttern weiblicher Föten die *Lactobacillus* Dominanz zum Ende der Schwangerschaft hin kontinuierlich sinkt, erreicht sie bei jenen männlicher Föten bereits zu V2 einen Tiefpunkt und nähert sich mit dem Ende der Schwangerschaft den entsprechenden Werten der Mütter weiblicher Föten an.

Tabelle E: Kontingenztafel mit *Lactobacillus*-Werten $> / \leq 80$ nach Kindsgeschlecht aufgeteilt

		Mütter weiblicher Föten n = 28	Mütter männlicher Föten n = 18
V1	> 80 %	6	6
	≤ 80 %	22	12
V2	> 80 %	8	8
	≤ 80 %	20	10
V3	> 80 %	8	7
	≤ 80 %	20	11
V4	> 80 %	9	6
	≤ 80 %	19	12

Tabelle F: Kontingenztafel mit *Lactobacillus*-Werten $> / \leq 50$ nach Kindsgeschlecht aufgeteilt

		Mütter weiblicher Föten n = 28	Mütter männlicher Föten n = 18
V1	> 50 %	4	5
	≤ 50 %	24	13
V2	> 50 %	7	3
	≤ 50 %	21	15
V3	> 50 %	5	4
	≤ 50 %	23	14
V4	> 50 %	4	3
	≤ 50 %	24	15

Um den Zusammenhang der Korrelation zwischen Kindsgeschlecht (w/m) und der davon abhängigen intrauterinen Hormonproduktion und einer reduzierten *Lactobacillus* Dominanz ($\leq 80\%$ / $\leq 50\%$) zu analysieren, sollte zuerst der Unterschied der Gruppen analysiert wird. Dies gelang über das Ermitteln der Odds-Ratio. Hierfür wurde die Formel $OR = \frac{a \times d}{b \times c}$ verwendet. Als Grundlage diente eine 2x2 Kontingenztafel, für den Vergleich zweier binärer Größen⁸. Die Ergebnisse der durchgeführten Berechnungen zeigen sich in Tabelle I:

Ergebnisse:

Tabelle G: Odds-Rationes für $\leq 80\%$ *Lactobacillus* bzw $\leq 50\%$ *Lactobacillus* zu den Messzeitpunkten V1-V4

Odds-Ratio	$\leq 80\%$ <i>Lactobacillus</i>	$\leq 50\%$ <i>Lactobacillus</i>
V1	0,5	0,4
V2	0,5	1,7
V3	0,6	0,8
V4	0,9	0,8

Ergebniswerte nahe bei 0 zeigen eine Tendenz dafür, dass Mütter männlicher Föten häufiger eine niedrigere *Lactobacillus* Dominanz haben, während Ergebniswerte nahe an 2 diese Tendenz für Mütter weiblicher Föten aufzeigen.

Interpretation: Viele errechnete OR waren nahe bei 1, was darauf hindeutet, dass kein signifikanter Unterschied besteht. Mütter männlicher Föten haben lediglich eine schwache Tendenz häufiger Mikrobiome mit $\leq 80\%$ *Lactobacillus* zu haben.

Im Folgenden wurde der Fisher's Exact Test für 2x2 verwendet. Dadurch konnte die Wahrscheinlichkeit berechnet werden, die erhobenen Ergebnisse zu beobachten, wenn es in Wirklichkeit keinen Unterschied zwischen den Gruppen gäbe. Nullhypothese H_0 = Das fetale Geschlecht hat keinen Einfluss auf die *Lactobacillus* Dominanz.

⁸ Tabelle B, C unter „Material und Methoden“

Folgende Werte wurden unter Verwendung der Software RStudio-2025.09.2-418 errechnet:

Tabelle H: Ergebnistabelle des Fisher's Exact Tests für 2x2

	≤80 %	≤50 %
V1	p-Wert = 0.49 95%-Konfidenzintervall = 0.12 2.57 Odds-Ratio = 0.55	p-Wert = 0.2836 95%-Konfidenzintervall = 0.07 2.45 Odds-Ratio = 0.44
V2	p-Wert = 0.347 95%-Konfidenzintervall = 0.12 2.07 Odds-Ratio = 0.51	p-Wert = 0.72 95%-Konfidenzintervall = 0.31 11.50 Odds-Ratio = 1.65
V3	p-Wert = 0.5297 95%-Konfidenzintervall = 0.15 2.67 Odds-Ratio = 0.64	p-Wert = 0.721 95%-Konfidenzintervall = 0.14 4.55 Odds-Ratio = 0.77
V4	p-Wert = 1 95%-Konfidenzintervall = 0.23 4.13 Odds-Ratio = 0.95	p-Wert = 1 95%-Konfidenzintervall = 0.12 6.52 Odds-Ratio = 0.84

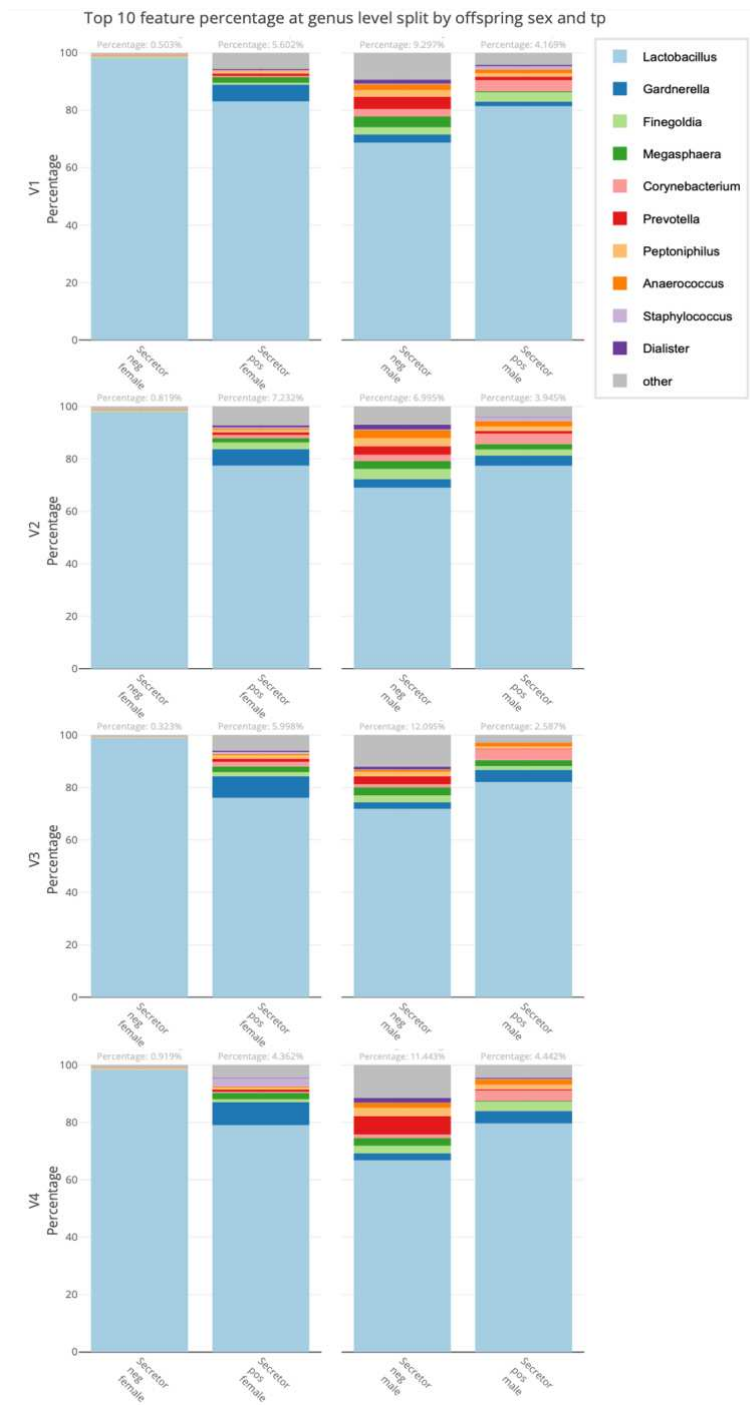
Der p-Wert gibt die Wahrscheinlichkeit an, die vorliegenden oder noch extremere Ergebnisse zu erhalten, wenn eigentlich keine Korrelation besteht. P-Werte < 0,05 gelten als statistisch signifikant, was bedeutet, dass die Nullhypothese verworfen und eine Korrelation angenommen werden könnte. P-Werte > 0,05 zeigen, dass kein statistisch signifikanter Unterschied der *Lactobacillus* Dominanz in Abhängigkeit des fetalen Geschlechts nachgewiesen werden kann.

Das 95%-Konfidenzintervall gibt den Bereich an, in dem mit 95% Wahrscheinlichkeit der echte Wert der Odds Ratio liegt. Konfidenzintervalle, die den Wert 1 umschließen zeigen, dass keine statistische Signifikanz vorliegt, da 1 einen fehlenden Zusammenhang bedeutet.

Interpretation: Die p-Werte zeigen, dass über alle Zeitpunkte hinweg kein signifikanter Unterschied im *Lactobacillus* Anteil besteht - weder für die 80 %-

noch für die 50 % Messstelle. Alle 95 % - Konfidenzintervalle umfassen den Wert 1 und sprechen demnach gegen eine statistische Signifikanz. Die schwankenden Odds Raten deuten auf eine hohe Unsicherheit hin.

Forschungsfrage 3a: Gibt es eine Korrelation zwischen dem Sekretor-Status, dem Kindsgeschlecht und der Zusammensetzung des Mikrobioms?



Grafik L: zeigt das vaginale Mikrobiom der Mütter zu den Messzeitpunkten V1-V4 der Schwangerschaft aufgegliedert nach Geschlecht und Sekretor-Status

Von links ausgehend werden dargestellt⁹:

- Weiblicher Fötus, Sekretor-negativ (6/46)
- Weiblicher Fötus, Sekretor-positiv (22/46)
- Männlicher Fötus, Sekretor-negativ (7/46)
- Männlicher Fötus, Sekretor-positiv (11/46)

In der Zusammenschau lassen sich einige Beobachtungen festhalten:

1. Diversität

Sekretor-negative Mütter weiblicher Föten haben ein fast ausschließlich von *Lactobacillus* dominiertes Mikrobiom, während in allen anderen Kategorien *Lactobacillus* nur zu 68 bis 80 % zur Bildung des vaginalen Mikrobioms beiträgt.

2. Sekretor-Status

Während bei den Müttern weiblicher Föten ein positiver Sekretor-Status mit einer verringerten *Lactobacillus* Dominanz zu korrelieren scheint, verhält es sich bei den Müttern männlicher Föten genau umgekehrt. Hier scheint ein positiver Sekretor-Status mit einer höheren *Lactobacillus* Dominanz einherzugehen, wobei der Effekt deutlich weniger eindeutig ist als bei den Müttern weiblich Föten.

3. Zweithäufigste Spezies

Betrachtet man die Spezies, die neben *Lactobacillus* das vaginale Mikrobiom besiedeln, zeigt sich, dass bei den Müttern weiblicher Föten mit positivem Sekretor-Status *Gardnerella* knapp 10 % der mikrobiellen Zusammensetzung ausmachen und somit das zweithäufigste Genus darstellen, während bei Müttern männlicher Föten und negativem Sekretor-Status *Prevotella* mit circa 2,4 % das zweithäufigste Genus ist. Gegen Ende der Schwangerschaft scheinen sich diese Tendenzen zu verstärken.

Gardnerella

Forschungsfrage 4: Was dominiert neben oder statt *Lactobacillus*?

Jene Frauen, die keine *Lactobacillus* Dominanz zeigten, hatten keine alleinige Dominanz einer anderen Gattung, sondern zeigten ein diverses Mikrobiom mit Co-

⁹ Bei zwei Föten fehlte entweder die Geschlechts- oder die Sekretor-Status Angabe der Mutter, sodass sie im Folgenden nicht aufgelistet sind.

Dominanz verschiedener Stämme, beispielsweise *Gardnerella*, *Megasphaera*, *Finegoldia*, *Corynebacterium* oder *Prevotella*.

Da *Gardnerella* in der Literatur vielfach mit Geburtskomplikationen wie Frühgeburtlichkeit in Verbindung gebracht wird, wurden die Metadaten jener Frauen mit hohen *Gardnerella* Anteilen nach Auffälligkeit hin analysiert:

Bei drei Frauen (135, 176, 217) zeigte sich ein im Vergleich zu den anderen Schwangeren erhöhter *Gardnerella* Anteil, der über 30 % lag und somit neben *Lactobacillus* eine wichtige Rolle bei der Zusammensetzung des vaginalen Mikrobioms zu spielen schien.

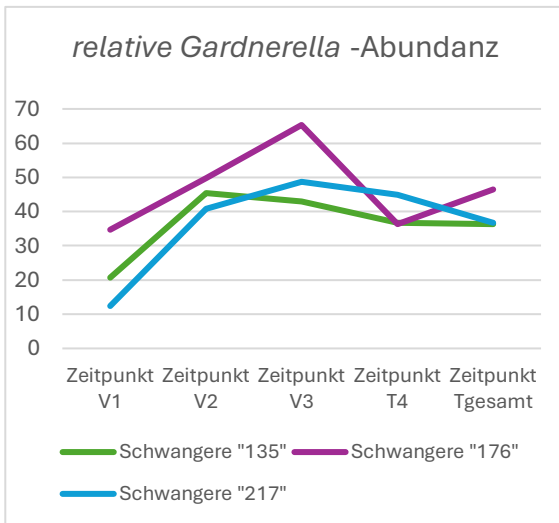
Im Verlauf der Schwangerschaft stieg bei allen drei Frauen der *Gardnerella* Anteil prozentuell an. Während der Schwangerschaft gab es jedoch keinen kontinuierlichen Anstieg, sondern Schwankungen der prozentuellen Zusammensetzung der *Gardnerella*- und *Lactobacillus*-Anteile am vaginalen Mikrobiom.

Tabelle I: *Gardnerella*-Anteil in Prozent von drei ausgewählten Schwangeren zu den Messzeitpunkten V1-V4 und mit Durchschnittswert "gesamt"

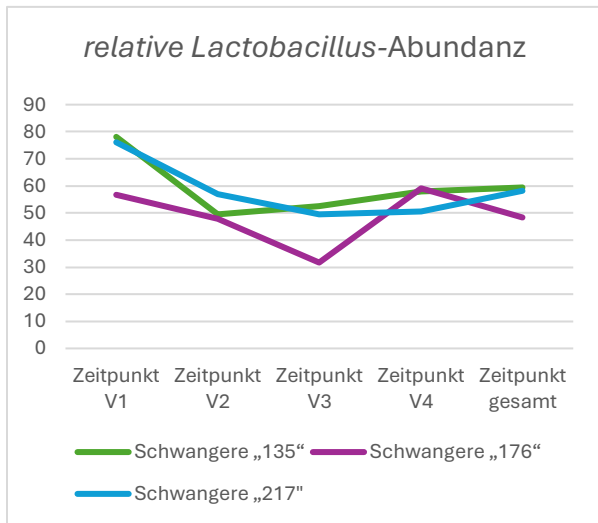
<i>Gardnerella</i> -Anteil in Prozent	Schwangere „135“	Schwangere „176“	Schwangere „217“
V1	20,7	34,7	12,4
V2	45,4	49,7	40,8
V3	43,0	65,3	48,7
V4	36,7	36,4	44,9
gesamt	36,4	46,5	36,7

Tabelle J: *Lactobacillus*-Anteil in Prozent von drei ausgewählten Schwangeren zu den Messzeitpunkten V1-V4 und mit Durchschnittswert "gesamt"

<i>Lactobacillus</i> -Anteil in Prozent	Schwangere „135“	Schwangere „176“	Schwangere „217“
V1	78,1	56,7	76,1
V2	49,5	47,9	57,0
V3	52,6	31,7	49,5
V4	57,9	59,1	50,6
gesamt	59,5	48,8	58,3



Grafik N: relative Gardnerella-Abundanz in % von drei ausgewählten Schwangeren zu den Messzeitpunkten V1-V4



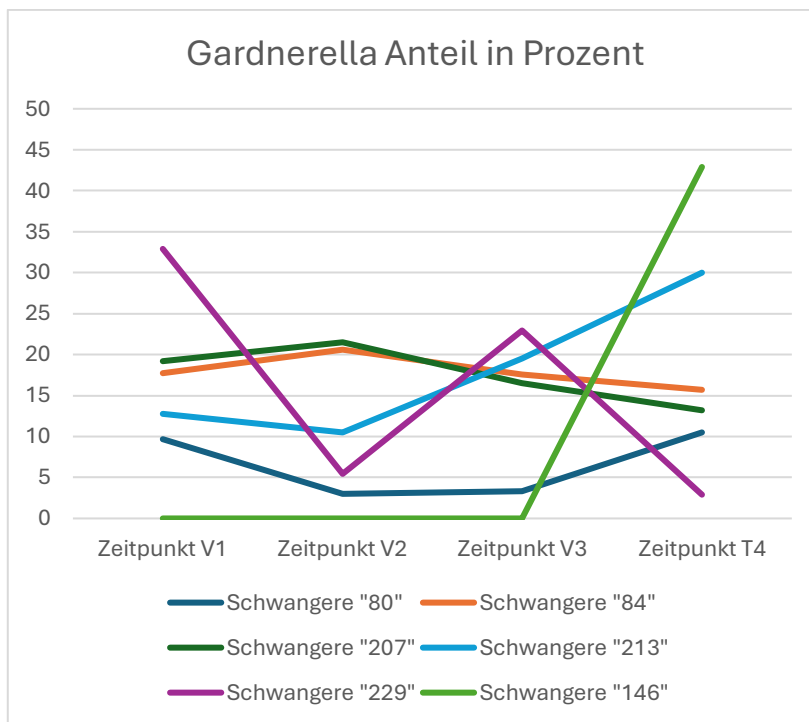
Grafik M: relative Lactobacillus-Abundanz in % von drei ausgewählten Schwangeren zu den Messzeitpunkten V1-V4

Die Auswertung der Metadaten der drei Schwangeren ergaben keine signifikanten Auffälligkeiten.

Auch bei sechs weiteren Frauen, konnte *Gardnerella* eine relevante Beteiligung an der Bildung des vaginalen Mikrobioms zugeschrieben werden - definiert durch einen *Gardnerella* Anteil von über 10 % zu mindestens einem Messzeitpunkt.

Tabelle K: Gardnerella-Anteil in Prozent in Abhängigkeit von den Messzeitpunkten

Gardnerella-Anteil in Prozent	Schwangere „80“	Schwangere „84“	Schwangere „207“	Schwangere „213“	Schwangere „229“	Schwangere „146“
V1	9,7	17,7	19,2	12,8	32,9	-
V2	3,0	20,6	21,5	10,5	5,4	-
V3	3,3	17,6	16,5	19,5	22,9	-
V4	10,5	15,7	13,2	30,0	2,9	42,9



Grafik O Gardnerella-Anteil in Prozent und zu allen Messzeitpunkte V1-V4

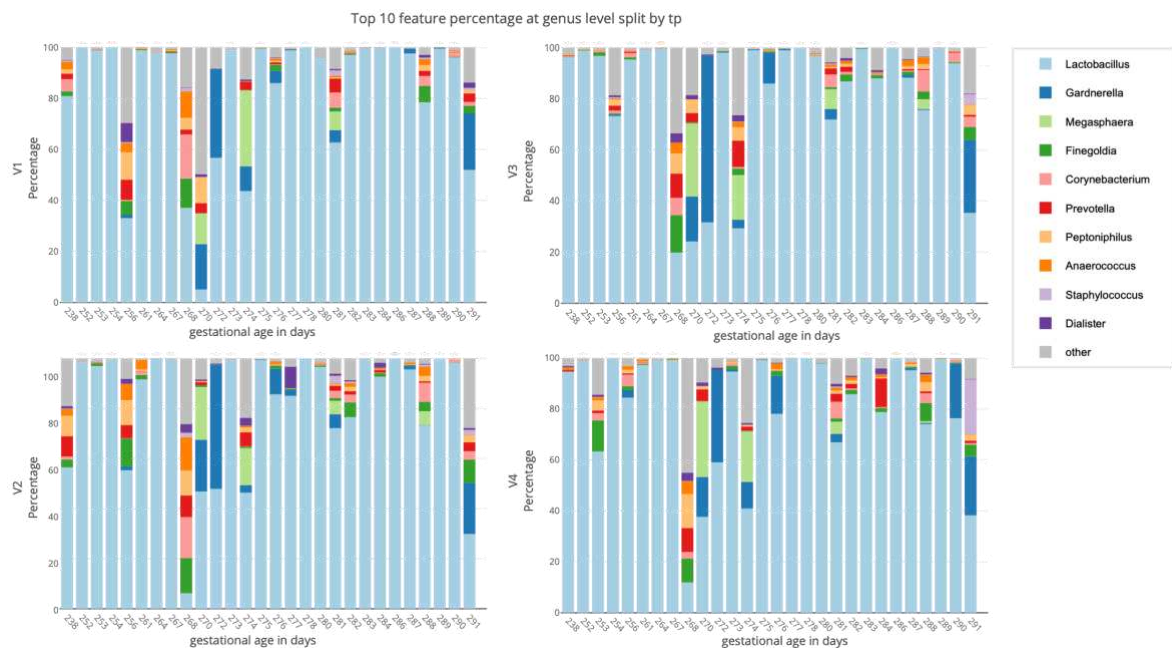
Betrachtet man die durchschnittlichen Werte der *Gardnerella* Anteile der neun Frauen mit relevanter Beteiligung am vaginalen Mikrobiom im Verlauf, zeigt sich insgesamt eine Steigerung des *Gardnerella* Anteils, mit Abfall kurz vor der Entbindung (V1: 20,0 % V2: 24,6 %, V3: 29,6 %, V4: 25,9 %).

Der BMI-Mittelwert der gesamten Kohorte lag bei 23,9. Der BMI-Mittelwert jener Frauen >10 % *Gardnerella* Anteil¹⁰ bei 26,6. Daran lässt sich erkennen, dass jene Frauen mit einer erhöhten *Gardnerella* Beteiligung beim Aufbau des vaginalen Mikrobioms tendenziell höhere BMI-Werte haben.

¹⁰ 135, 176, 217, 80, 84, 207, 213, 229, 146

Frühgeburlichkeit

Forschungsfrage 5: Gibt es eine Korrelation zwischen dem Entbindungstag und Besiedlungsmuster des vaginalen Mikrobioms?



Grafik P: Die zehn häufigsten Bakterien-Gattungen in Abhängigkeit des Entbindungstages und der Messzeitpunkte V1-V4

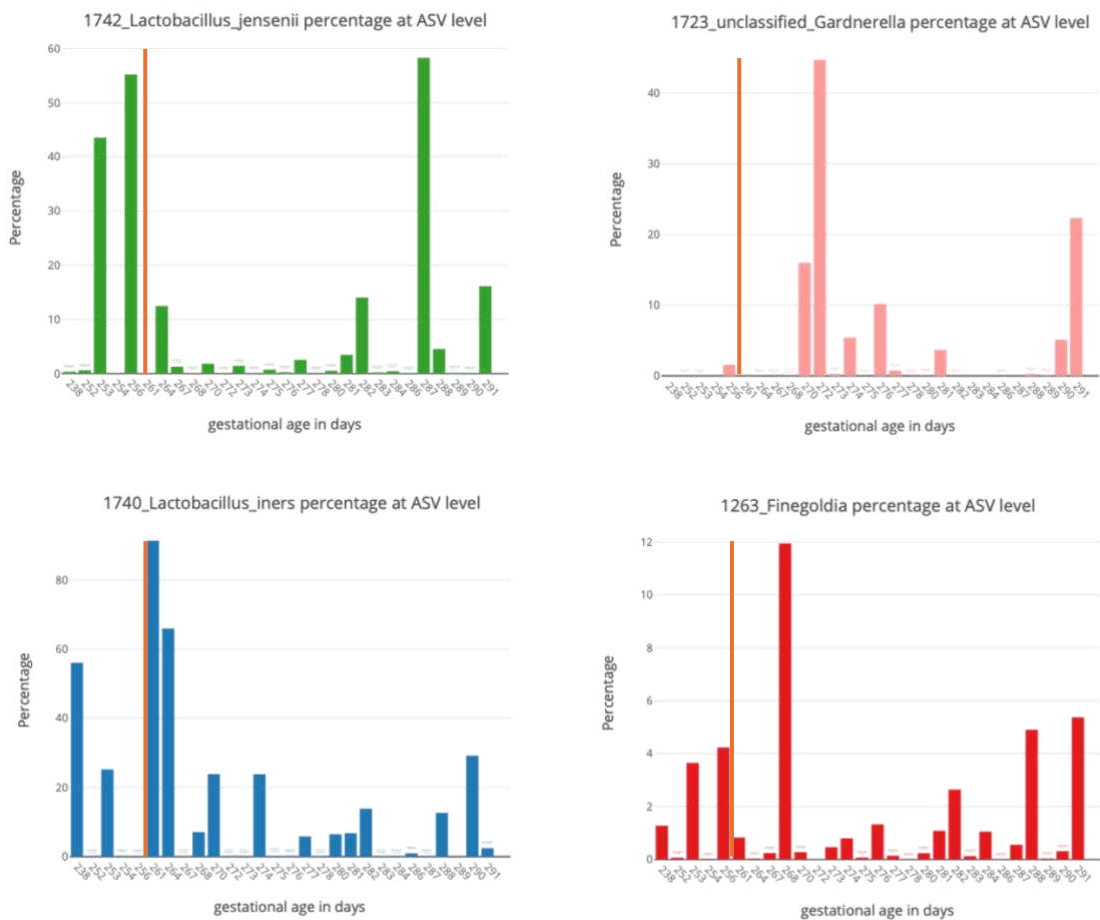
Die Grafik S zeigt die häufigsten Bakterien-Gattungen in Prozent auf der y-Achse in aufsteigender Reihenfolge nach Entbindungstag sortiert auf der x-Achse. Gegliedert ist sie in die vier Messzeitpunkte V1 bis V4.

Interpretation: Bei der Analyse möglicher Korrelationen zwischen der Muster des vaginalen Mikrobioms und dem Entbindungstag zeigten sich keine klaren Beobachtungen. Innerhalb der Kohorte mit Frühgeburten ($n = 5$) - Entbindung vor Gestationstag 260 - waren keine Häufungen von Mikrobiom-Kompositionen mit *Lactobacillus* ≤ 50 % zu beobachten.

Forschungsfrage 5a: Wie hoch ist der Prozentsatz der Mikrobiome mit *Lactobacillus* ≤ 50 % innerhalb der Termingerburten?

Innerhalb der Termingerburten hatten 21,7 % der Mütter ein Mikrobiom mit *Lactobacillus* ≤ 50 %. Angesichts der Tatsache, dass im Gesamtdurchschnitt 18,2 % der Frauen eine *Lactobacillus*-Dominanz ≤ 50 % zeigten, ist ihr vaginales Mikrobiom durchschnittlich *Lactobacillus* ärmer als das der Frauen, die frühgeburtlich entbunden haben.

Forschungsfrage 5b: Gibt es Unterschiede in den ASVs in Abhängigkeit des Entbindungszeitpunktes?



Grafik Q : Prozentuelle Anteile ausgewählter ASVs, die den Spezies *Lactobacillus jensenii*, *Lactobacillus iners* und den Gattungen *Gardnerella* und *Finegoldia* taxonomisch zugeordnet wurden.

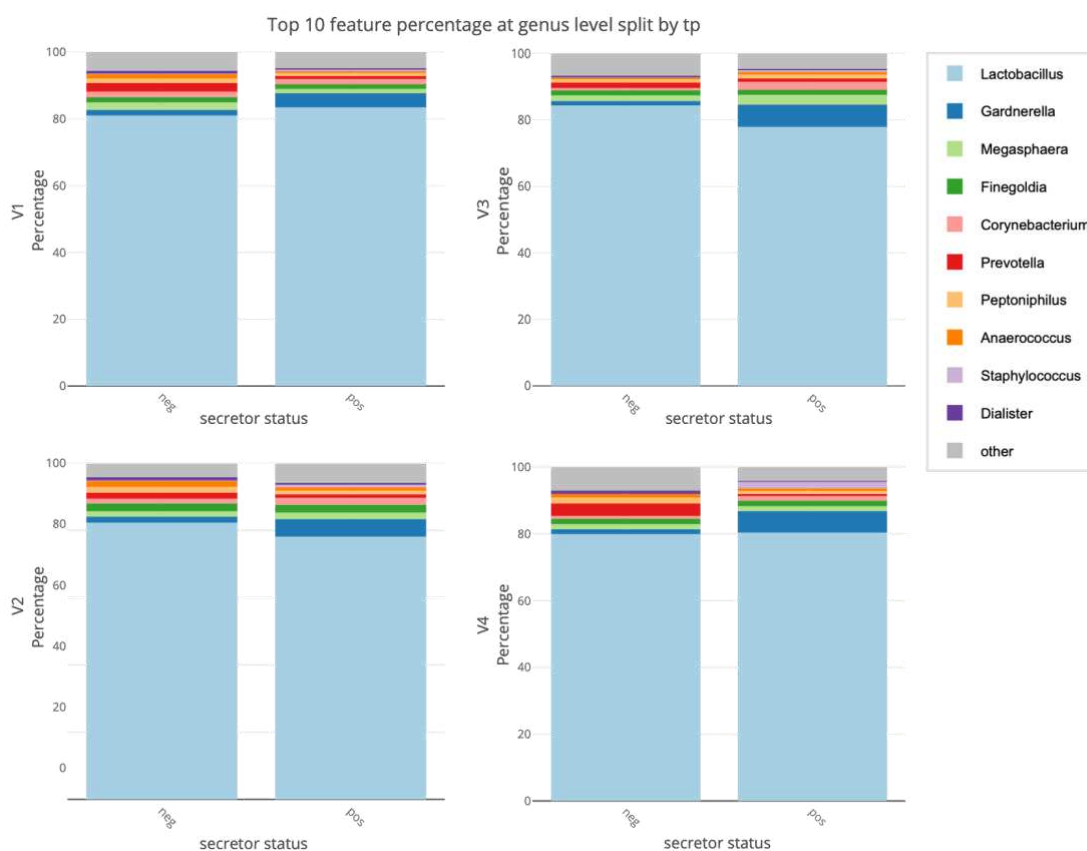
Der Auswahl dieser vier ASVs begründet sich in deren relativ hohen Abundanzen im Datensatz. Bezüglich *Gardnerella* finden sich in der Literatur viele Hinweise auf eine Assoziation zwischen erhöhten Abundanzen von *Gardnerella* und Frühgeburtlichkeit.

Interpretation: Für das ASV 1742_ *Lactobacillus jensenii* zeigten sich einzelne hohe Abundanzen (z.B. >40 %) in Korrelation mit frühgeburtlichen Entbindungen, aber auch ein geringes Vorkommen bei termingeburtlichen sowie eine einzelne Person mit hoher Abundanz dieses ASVs. Deshalb ist kein linearer Zusammenhang zwischen diesem ASV und dem Entbindungstag anzunehmen. Die ASVs 1740_ *Lactobacillus iners* und 1263_ *Finegoldia* finden sich fast im ganzen Spektrum der Entbindungstage und scheinen tendenziell etwas eher mit früheren

termingerechten Entbindungstagen vergesellschaftet zu sein. Innerhalb der frühgeburtlichen Gruppe zeigen sie niedrige bis mittelwertige Abundanzen und keine deutlichen Unterschiede im Vergleich zur termingeburtlichen Gruppe. Das 1723_unclassified_Gardnerella ASV zeigte fast keine Abundanz bei den Frauen, die frühgeburtlich entbunden haben. Bei den termingeburtlichen Entbindungen gab es vereinzelte Frauen mit sehr hohen Abundanzen dieses ASVs.

Der Sekretor-Status

Forschungsfrage 6: Unterscheidet sich die *Lactobacillus* Dominanz in Abhängigkeit des Sekretor-Status?



Grafik R: Die zehn häufigsten Bakterien-Gattungen in Abhängigkeit des Sekretor-Status und der vier Messzeitpunkte V1-V4

Grafik R dient zum Vergleich der Veränderungen des vaginalen Mikrobioms im Laufe der Schwangerschaft in Abhängigkeit des Sekretor-Status.

Interpretation: In beiden Gruppen zeigt sich eine hohe *Lactobacillus* Dominanz. Es fallen jedoch Unterschiede bezüglich der anderen Gattungen, die neben *Lactobacillus* an der mikrobiellen Komposition beteiligt sind auf. Während Sekretor-negative Frauen tendenziell eine Beteiligung von *Prevotella* am

vaginalen Mikrobiom zeigen, haben Sekretor-positive Frauen höhere relative Abundanzen von *Gardnerella*.

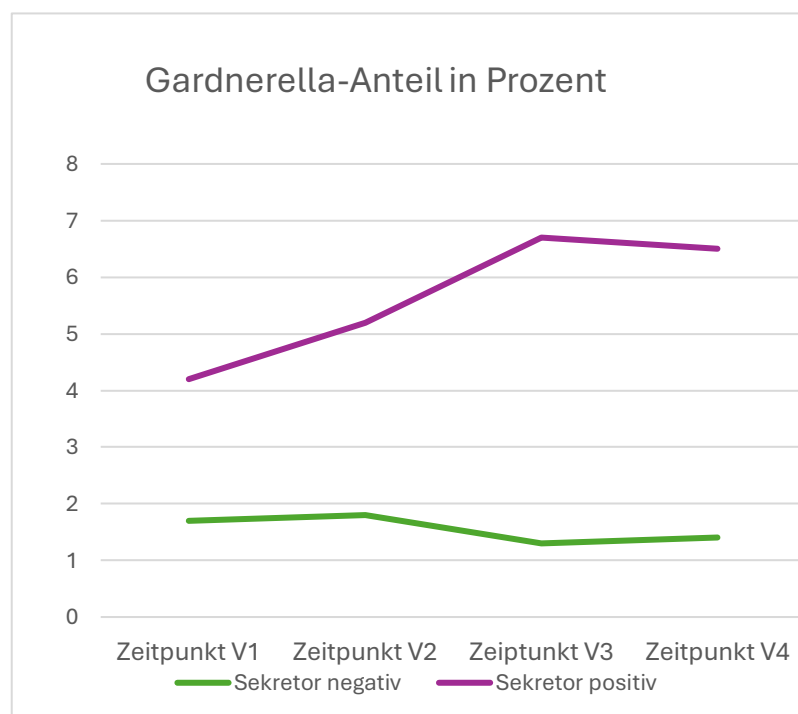
Forschungsfrage 6a: Welche Spezies spielen neben *Lactobacillus* in Abhängigkeit vom Sekretor-Status eine Rolle bei der Komposition des vaginalen Mikrobiom?

Gardnerella in Abhängigkeit des Sekretor-Status

Die Tendenz, dass Sekretor-positive Frauen einen vergleichsweise höheren *Gardnerella* Anteil der Mikrobiom-Komposition haben, zeigt sich bei allen vier Messzeitpunkten und ist zum Ende der Schwangerschaft (V4) deutlicher als zu Beginn (V1).

Tabelle L: *Gardnerella*-Anteil in Prozent in Abhängigkeit des Sekretor-Status und der Messzeitpunkte V1-V4

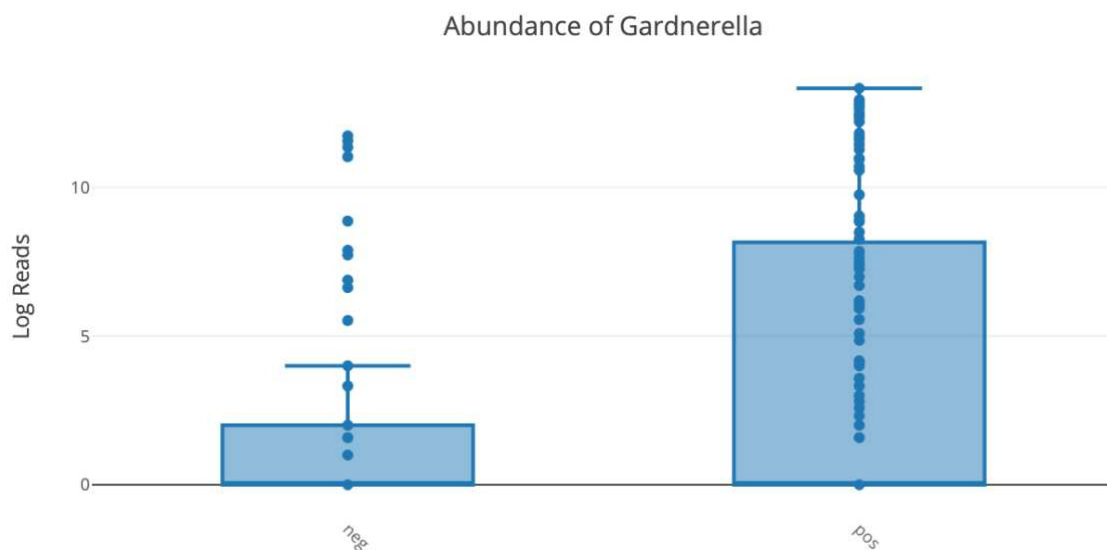
<i>Gardnerella</i> -Anteil in Prozent	Sekretor negativ	Sekretor positiv
V1	1,7	4,2
V2	1,8	5,2
V3	1,3	6,7
V4	1,4	6,5
Vgesamt (durchschnittlich)	1,6	5,6



Grafik S: *Gardnerella*-Anteil in Prozent in Abhängigkeit des Sekretor-Status und der Messzeitpunkte

Vergleicht man die Durchschnittswerte der relativen Abundanzen von *Gardnerella* zwischen den Sekretor-Gruppen, sieht man, dass der Anteil bei Sekretor-positiven ca. 3,5-mal so hoch ist als bei Sekretor-negativen Schwangeren.

Bei der grafischen Analyse der *Gardnerella* Anteile mittels log-transformierten Reads wird jede Schwangere als einzelnen Punkt dargestellt (Boxplot). So erkennt man, dass die Streuung innerhalb der Sekretor-positiven Kohorte größer ist als innerhalb der Sekretor-negativen. Ebenso sind die Mediane in der Sekretor-positiven Gruppe höher und die Streuung ist größer, was bedeutet, dass in dieser Gruppe mehr Frauen mittlere bis höhere Abundanzen für *Gardnerella* haben. Unter den Sekretor-negativen gibt es einzelne Ausreißer mit vergleichsweise hohen Werten für *Gardnerella*.



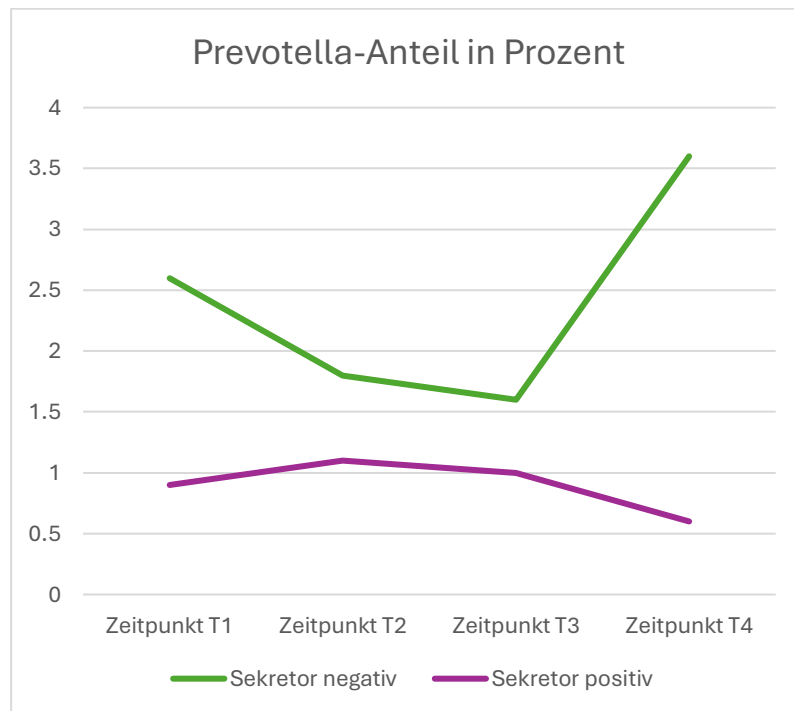
Grafik T: log-transformierte Reads von *Gardnerella* in Abhängigkeit des Sekretor-Status

Prevotella in Abhängigkeit des Sekretor-Status

In Hinblick auf die *Prevotella* Anteile im vaginalen Mikrobiom zeigen sich gegenteilige Tendenzen. Hier scheinen Sekretor-negative Frauen eine stärkere Besiedelung aufzuweisen. In der untersuchten Kohorte waren die relativen Abundanzen von *Prevotella* der Sekretor-negativen Frauen ca. 2,7-mal so hoch als der Sekretor-positiven Frauen.

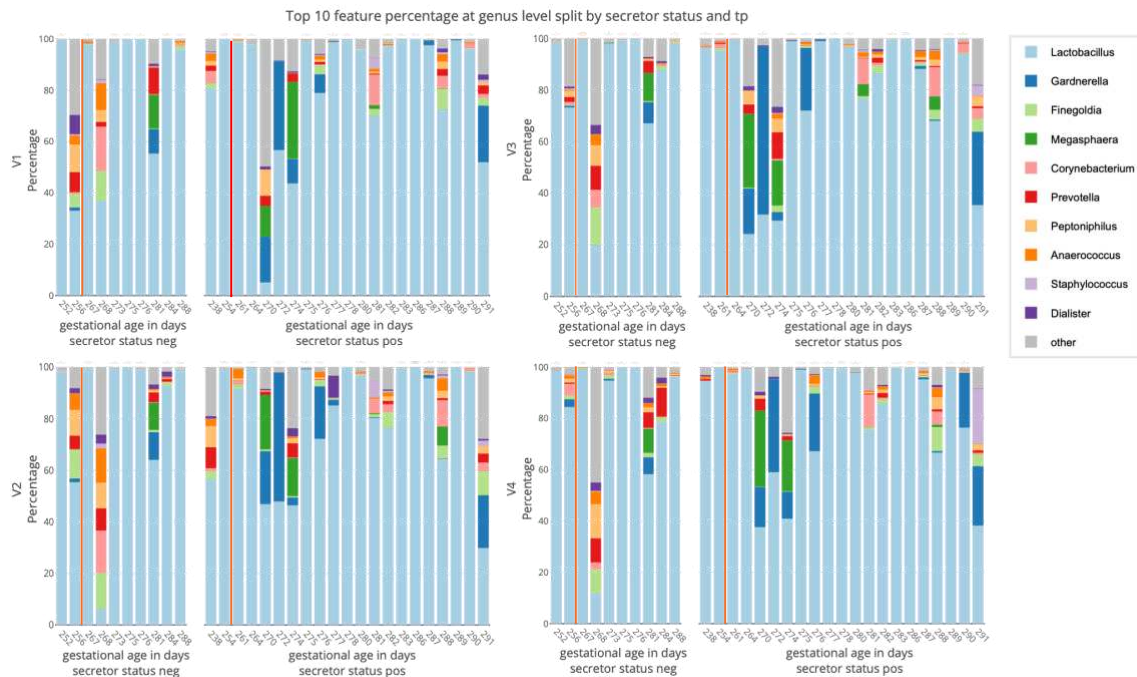
Tabelle M: Prevotella-Anteil in Prozent in Abhängigkeit des Sekretor-Status und der Messzeitpunkte V1-V4

Prevotella-Anteil in Prozent	Sekretor negativ	Sekretor positiv
V1	2,6	0,9
V2	1,8	1,1
V3	1,6	1,0
V4	3,6	0,6
Vgesamt (durchschnittlich)	2,4	0,9



Grafik U: Prevotella-Anteil in Prozent in Abhängigkeit des Sekretor-Status und der Messzeitpunkte

Forschungsfrage 6b: Entbinden Sekretor-negative Frauen mit verringerter *Lactobacillus* Dominanz früher?



Grafik V: Die zehn häufigsten Bakterien-Gattungen in Abhängigkeit des Sekretor-Status, des Entbindungstages und der Messzeitpunkte V1-V4

Die Grafik V zeigt vergleichend die Mikrobiom-Kompositionen Sekretor-negativer und Sekretor-positiver Frauen in Abhängigkeit des Entbindungstages (x-Achse) und der vier Messzeitpunkte.

Interpretation: Beim Vergleich der Sekretor-Gruppen bezüglich des Entbindungstages zeigte sich, dass innerhalb der Sekretor-negativen Frauen 15,4 % (2/13) und innerhalb der Sekretor-positiven Frauen 6 % (2/33) vorzeitig entbunden haben. Bei zwei Sekretor-positiven Frauen fehlte die Angabe zum Entbindungstag. Die Analyse möglicher Korrelationen zwischen der Zusammensetzung der Besiedelung des vaginalen Mikrobioms und dem Entbindungstag konnte keine linearen Beobachtungen zeigen. Eine der beiden Sekretor-negativen Frauen mit frühgeburtlicher Entbindung zeigt bei Messzeitpunkt V1 und V2 ein Mikrobiom mit verringerten *Lactobacillus* Anteilen (V1: *Lactobacillus* 33,0 %, *Gardnerella* 1,3 %, *Finegoldia* 5,4 %, *Prevotella* 7,9 %, *Corynebakterium* 0,5 % und V2: *Lactobacillus* 55,4 %, *Gardnerella* 1,5 %, *Finegoldia* 11,1 %, *Prevotella* 5,2 %) jedoch stabilisiert sich die *Lactobacillus* Dominanz im Verlauf der Schwangerschaft und die Untersuchung der häufigsten

ASVs zeigten keine Auffälligkeiten. Bezüglich *Megasphaera* fällt auf, dass es nur in einigen wenigen Proben vorkommt, aber in jedem Fall mit *Gardnerella* und *Prevotella* vergesellschaftet war.

Zur Prüfung der Signifikanz des Zusammenhangs zwischen dem Sekretor-Status und Frühgeburtslichkeit wurde der Fisher's Exact Test durchgeführt:

Tabelle N.: Kontingenztafel für den Zusammenhang zwischen Sekretor-Status und Frühgeburt bzw. Termingeburt

Kontingenztafel	Sekretor-negativ n = 13	Sekretor-positiv n = 33
Termingeburt	11	31
Frühgeburt	2	2

Ergebnisse: Für die Odds-Ratio wurde ein Wert von $\approx 2,74$ errechnet. Der ermittelte p-Wert war mit 0,57 nicht signifikant. Das 95 %-Konfidenzintervall umfasste den Bereich von 0,18 - 42,2 womit der Wert 1 umfasst ist. Sowohl der p-Wert, als auch das Konfidenzintervall zeigen an, dass der Zusammenhang nicht statistisch signifikant ist.

Forschungsfrage 6c: Gibt es eine Korrelation zwischen dem BMI, der Gewichtszunahme in der Schwangerschaft und dem Sekretor-Status?

Um herauszufinden, ob sich Frauen mit unterschiedlichem Sekretor-Status bezüglich ihres BMIs und der Gewichtszunahme in der Schwangerschaft unterscheiden, wurden biostatistische Analyseverfahren verwendet. Die drei untersuchten Parameter waren der maternale BMI vor der Schwangerschaft (ppBMI), der maternale BMI zum Zeitpunkt der Geburt und die durchschnittliche Gewichtszunahme in der Schwangerschaft. Für alle drei Parameter wurden Mittelwert und Standardabweichung bestimmt. Ziel der Analyse war die Herausarbeitung potenzieller Unterschiede zwischen den Gruppen für diese Parameter. Der Mittelwert und die Standardabweichung wurden ermittelt, um die unterschiedlich großen Gruppen vergleichbarer zu machen (Mittelwerte) und zu prüfen, wie groß die Varianz innerhalb der Gruppe ist (Standardabweichung).

Tabelle O: Mittelwerte und Standardabweichungen für die Parameter prägravid BMI, BMI bei Geburt und Gewichtszunahme in der Schwangerschaft. Die Vergleichsgruppen sind in Abhängigkeit des Sekretorstatus.

Sekretor-Status	Durchschnittlicher prägravid (pp)BMI	Durchschnittlicher BMI bei Geburt	Durchschnittliche Gewichtszunahme in der Schwangerschaft
positiv (n = 35)	23,2 ± 4,6	28,5 ± 4,9	13,8 kg ± 5,7
negativ (n = 13)	26,0 ± 8,4	29,9 ± 7,9	11,1 kg ± 4,0

Ergebnisse: Der durchschnittliche ppBMI und die Streuung sind in der Gruppe Sekretor-negativer Frauen durchschnittlich höher als bei den Sekretor-positiven Frauen. Sekretor-negative Frauen haben vor der Schwangerschaft durchschnittlich einen BMI im Übergewichtsbereich, während der durchschnittliche BMI Sekretor-positiver Frauen im Normbereich liegt.

Auch der BMI bei Geburt und die Streuung waren in der Sekretor-negativen Gruppe erhöht, jedoch war die Differenz zwischen den Vergleichsgruppen geringer als beim ppBMI. Mehr Gewicht nahmen in der Schwangerschaft die Sekretor-positiven Frauen zu, wobei hier die Streuung größer war als bei den Sekretor-negativen. Für den Vergleich der unabhängigen Gruppen mit großer Varianz und unterschiedlicher Stichprobengröße wurde der Welch-t-Test gewählt.

Ergebnisse des Welch-t-Tests:

Tabelle P: Ergebnistabelle für potenzielle Unterschiede zwischen den Sekretor-Gruppen bezüglich ppBMI, BMI bei Geburt und Gewichtszunahme während der Schwangerschaft

Unterschiede zwischen den Sekretor-Gruppen	prägravid BMI	BMI bei Geburt	Gewichtszunahme während der Schwangerschaft
Standardfehler (SE) der Mittelwertsdifferenz	2,5	2,3	1,5
t-Wert	1,6	0,8	1,8
Freiheitsgrade <i>df</i> (Welch-Satterthwaite-Formel)	14,7	14,8	30,7
p-Wert	0,13	0,44	0,08

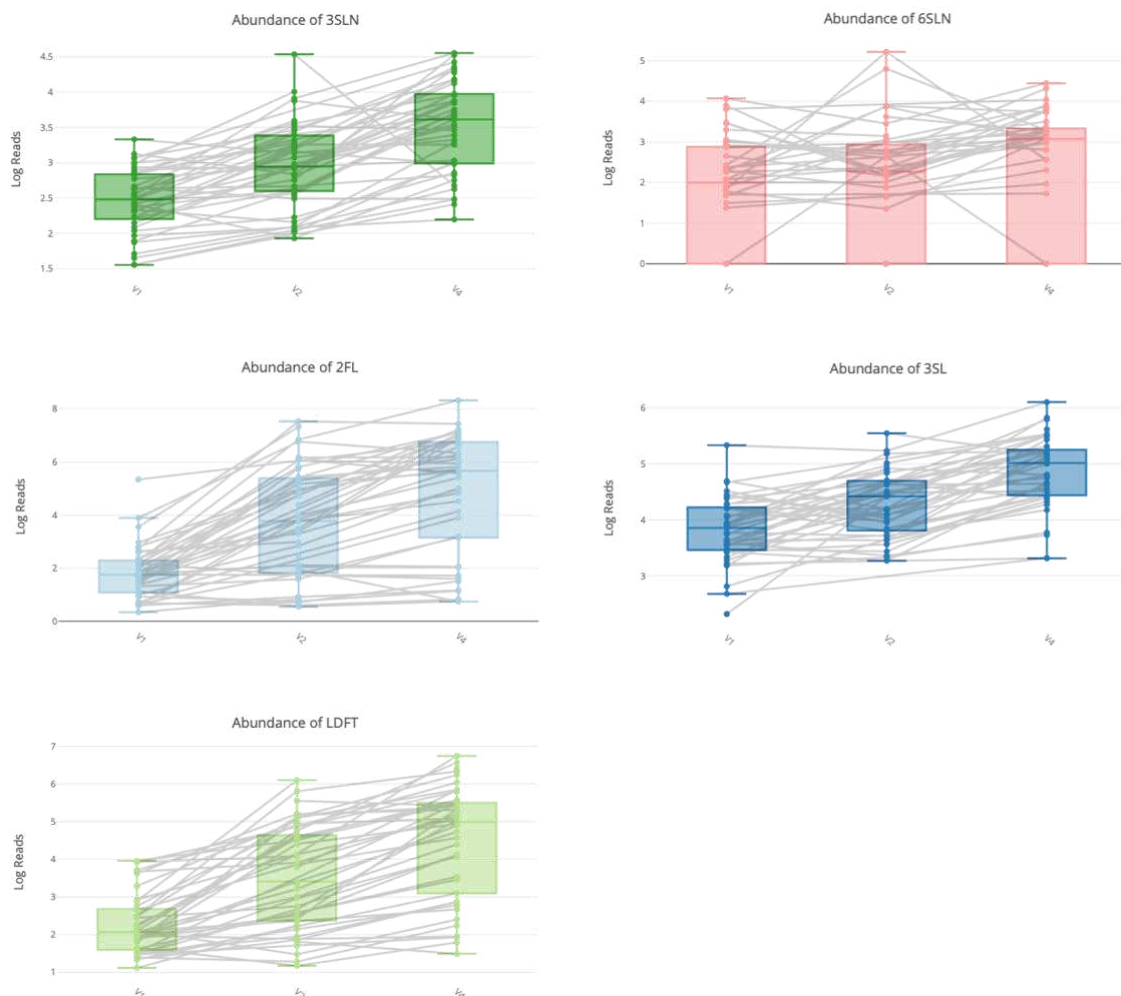
Interpretation: Alle errechneten p-Werte waren > 0,05, sodass von keinem statistisch signifikanten Zusammenhang beim Vergleich der Sekretor-Gruppen hinsichtlich ihres prägravid BMI, BMIs bei Geburt und der Gewichtszunahme während der Schwangerschaft. Dennoch ist der p-Wert, der vergleichenden

Analysen der Gewichtszunahmen so nahe an der statistischen Signifikanz, dass von einer tendenziell erhöhten Gewichtszunahme während der Schwangerschaft bei Sekretor-positiven Frauen im Vergleich zu Sekretor-negativen Frauen gesprochen werden kann.

Humane Milch-Oligosaccharide

Forschungsfrage 7: Inwiefern verändern sich Komposition und Konzentration der HMOs in Abhängigkeit des Gestationsalter bei der untersuchten Kohorte?

Zusätzlich zu den Mikrobiomdaten der Vaginalabstriche wurden auch HMOs in den Urinproben der Frauen gemessen. Diese Daten zeigen eine sehr klare Zunahme einzelner HMOs im Laufe der Schwangerschaft.

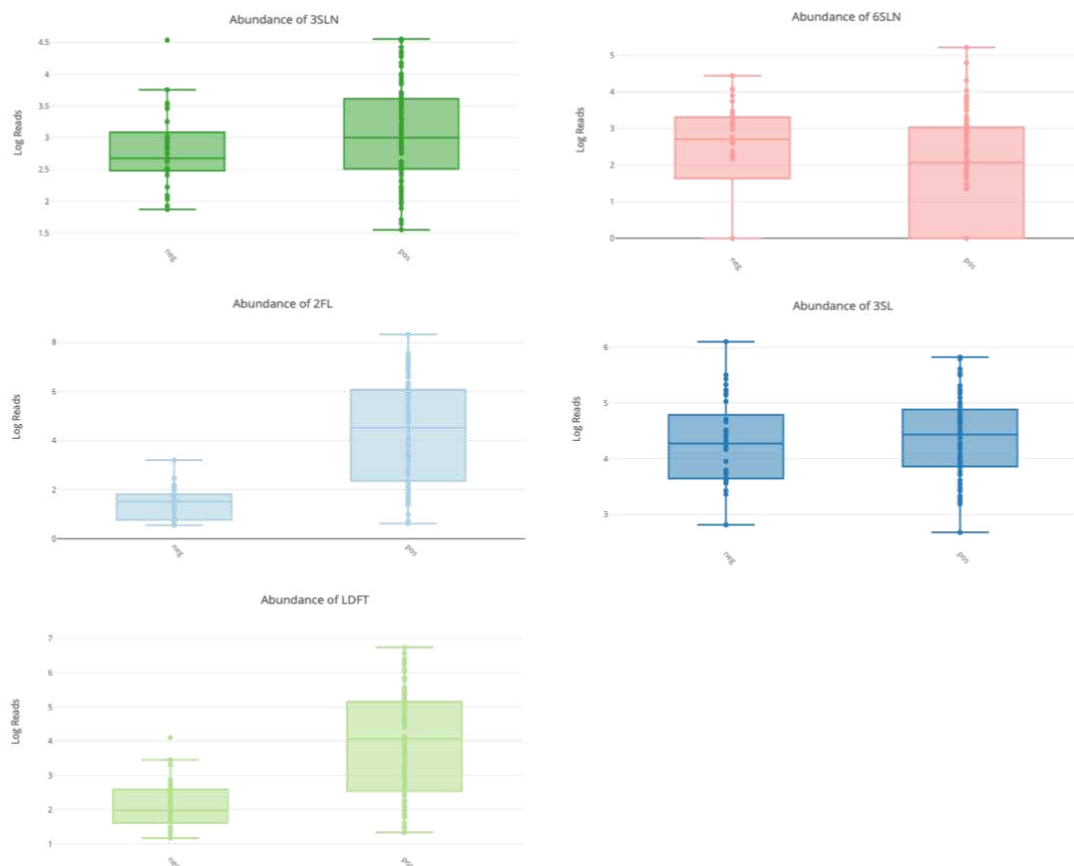


Grafik W: Fünf Boxplots zeigen die Abundanzen der HMOs 3'SLN, 6'SLN, 2'FL, 3'SL und LDFT in Abhängigkeit der Messzeitpunkte V1, V2, V4

Die Grafik W zeigt inwiefern sich die Mengen der einzelnen humanen Milch-Oligosaccharide (3'SLN, 6'SLN, 2'FL, 3'SL und LDFT), die über den Urin ausgeschieden wurden im Laufe der Schwangerschaft verändern. Jede graue Linie steht für die Daten einer schwangeren Frau. Die y-Achse ist in logarithmierten Reads skaliert.

Interpretation: Bei allen HMOs sieht man einen kontinuierlichen Anstieg der Medianwerte im Laufe der Schwangerschaft. Die geringste Erhöhung war für 6'SLN-HMOs messbar, hier zeigen einige individuellen Linien auch horizontale oder fallende Verläufe in der Schwangerschaft. Bei 2'FL und LDFT liegt eine relativ breite Streuung der Werte vor - einige Frauen haben besonders hohe Werte, andere eher niedrige. 3'SL zeigt die geringste Streuungsbreite und scheint in der Kohorte relativ homogen zuzunehmen.

Forschungsfrage 8: Inwiefern beeinflusst der Sekretorstatus die Abundanzen der HMOs?



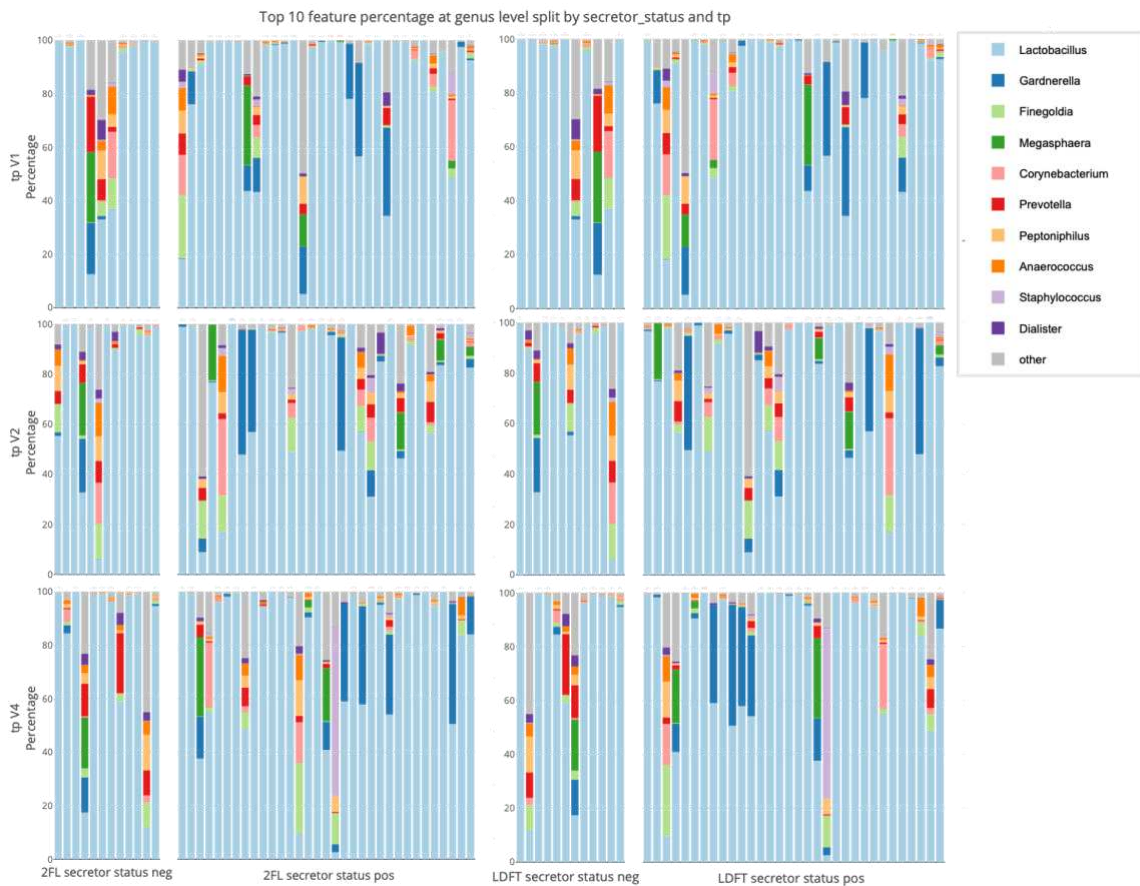
Grafik X: Abundanzen der HMOs 3'SLN, 6'SLN, 2'FL, 3'SL, LDFT in Abhängigkeit des Sekretor-Status

Die Grafik X vergleicht die logarithmierten Werte der gemessenen HMO-Daten in Abhängigkeit vom Sekretor-Status.

Interpretation: Es ist deutlich zu sehen, dass sich die HMO-Profile in Abhängigkeit vom Sekretor-Status unterscheiden. Sekretor-negative Frauen zeigen im Vergleich höhere Mediane für 6'SLN, während Sekretor-positive Frauen höhere Abundanzen für 3'SLN und deutliche höhere Mediane für 2'FL und LDFT zeigen. Die Abundanzen der 3'SL-HMOs scheinen vom Sekretor-Status unabhängig zu sein. Insgesamt ist die Streuung der Werte in der Sekretor-positiven Gruppe bei allen HMOs außer 3'SL größer.

Da innerhalb der HMO-Abundanzen für 2'FL und LDFT die größten Unterschiede beobachtet werden konnten, werden im Folgenden potenzielle Auswirkungen auf die Muster des Mikrobioms analysiert:

Forschungsfrage 9: Gibt es eine Korrelation zwischen den Abundanzen der HMOs 2'FL und LDFT und der Zusammensetzung des vaginalen Mikrobioms?



Grafik Y: Die zehn häufigsten Bakterien-Gattungen sortiert nach dem Sekretor-Status, den Messzeitpunkten V1, V2 und V4 und in aufsteigenden 2'FL- HMO- Konzentrationen links bzw. LDFT-Konzentrationen rechts

Die Grafik Y besteht aus zwei Grafiken: Die linke Grafik untersucht die Muster des vaginalen Mikrobioms in Abhängigkeit des Sekretor-Status und - in von links nach rechts aufsteigenden Konzentrationen - sortierten 2'FL-Vorkommen. Die rechte Grafik untersucht die gleichen Parameter für aufsteigende Konzentrationen von LDFT.

Interpretation: Bei der grafischen Überblicksanalyse zeigen sich keine signifikanten Veränderungen des vaginalen Mikrobioms mit steigender 2'FL- bzw. LDFT Konzentration. Vergleicht man die Profile in Abhängigkeit der HMOs zeigen sich große Ähnlichkeiten in der Zusammensetzung, unabhängig des Sekretor-Status. Auch unter der Berücksichtigung, dass die Balken in steigenden Konzentrationen sortiert sind, ergeben sich aus der visuellen Analyse keine Auffälligkeiten.

Diskussion: Beantwortung der Forschungsfragen, Vergleichen- de, Erläuterungen

Die vorliegende Forschungsarbeit widmete sich der Frage, inwiefern sich das vaginale Mikrobiom im Laufe der Schwangerschaft unter Berücksichtigung spezifischer Metadaten und dem Vorkommen der humanen Milch-Oligosaccharide verändert. Da das vaginale Mikrobiom typischerweise von Bakterien der Gattung *Lactobacillus* dominiert wird (51), wurde zuerst untersucht, ob sich in der Kohorte eine *Lactobacillus* Dominanz findet und ob sich diese im Laufe der Schwangerschaft verstärkt (Forschungsfrage 1). Es zeigten sich in der untersuchten Kohorte bei den meisten Frauen stabil hohe Werte für *Lactobacillus* zu allen Messzeitpunkten, weshalb durchschnittlich von einer *Lactobacillus* Dominanz bei der Besiedelung des vaginalen Mikrobioms gesprochen werden kann. Erklärbar ist dieses Phänomen durch die vielfach in der Literatur beschrieben begünstigenden Wachstumsbedingungen für *Lactobacillus* während der Schwangerschaft. Durch die kontinuierlich steigende Produktion von Östrogen in der Schwangerschaft wird die Einlagerung von Glykolen in die vaginalen Epithelien gefördert, das *Lactobacillus* als Nahrungsquelle dient (69,117). Eine durchschnittliche Zunahme dieser *Lactobacillus* Dominanz im Schwangerschaftsverlauf zeigte sich nicht, obwohl dies aufgrund der steigenden Östrogenkonzentrationen anzunehmen war (117). Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass sich innerhalb der *Lactobacillus* Gattung die relativen Abundanzen zum Vorteil jener Spezies verschieben, die besonders günstig für den Erhalt der Schwangerschaft sind. Die Analysen dieser Arbeit bewegten sich überwiegend auf Gattungsebene, sodass die genaue Differenzierung der relativen Abundanzen einzelner *Lactobacillus* Spezies nicht untersucht wurde. Eine andere mögliche Erklärung könnte sein, dass die *Lactobacillus* Abundanzen zu Beginn der Schwangerschaft in der untersuchten Kohorte bereits so hoch waren, dass für den protektiven Effekt durch die *Lactobacillus* Besiedelung keine weitere Erhöhung nötig war, sondern der Erhalt der bestehenden Dominanz genügte.

Als nächstes wurde ein potenzieller Zusammenhang zwischen der Zusammensetzung des vaginalen Mikrobioms und einer Erhöhung des prägravidem Body-Mass-Index untersucht (Forschungsfrage 1a). Aufgrund von Beobachtungen, dass sich mit dem Körpergewicht die *Lactobacillus* Dominanz verändert (87), wurde erwartet, dass Frauen mit einem normgewichtigen BMI-Wert die höchsten *Lactobacillus* Dominanzen zeigen würden. In der untersuchten Kohorte konnte eine Korrelation zwischen einem erhöhtem BMI und einer verringerten *Lactobacillus* Dominanz beobachtet werden. Dieser Effekt trat bereit ab einem BMI von > 22 ein, der per definitionem als normalgewichtig gilt. Weiters wurde beobachtet, dass ein relevanter *Gardnerella* Anteil - definiert als $> 10\%$ relative Abundanz - an der vaginalen Mikrobiom-Komposition erst ab einem BMI von $> 21,5$ beobachtet werden konnte. Die höchste *Lactobacillus* Dominanz zeigten Frauen mit einem BMI zwischen 17,9 - 21,5. Die Ergebnisse entsprechen nur teilweise den Erwartungen: die Tendenz zu verringerten *Lactobacillus* Anteilen mit steigendem BMI konnte bestätigt werden (118), jedoch schienen die gewichtsspezifischen Einflüsse bereits bei noch normwertigen BMI zu beginnen. Vermutlich ist der Body-Mass-Index als Marker für die metabolische Situation nicht aussagekräftig genug und die Grenzen ab wann der BMI einen Einfluss auf das vaginale Mikrobiom hat, sind fließend. Eine potenzielle Erklärung, warum adipöse Frauen ein diverseres Mikrobiom haben, könnte der erhöhte Anteil proinflammatorischer Zytokine im Vaginalbereich bei adipösen Frauen sein. Die Erhöhung der bakteriellen Diversität scheint mit spezifischen Interleukinen assoziiert zu sein (87). Eine weitere Erklärung könnten Veränderungen im Hormonhaushalt übergewichtiger und adipöser Frauen sein: durch verringerte Östrogenspiegel würde folglich weniger Glykogen in den vaginalen Epithelzellen gespeichert werden und die Wachstumsbedingungen für *Lactobacillus* wären erschwert. Dadurch würde der pH-Wert steigen und die Besiedelung potenziell pathogener Bakterien begünstigt.

Bei der Untersuchung von Co-Faktoren auf die Korrelation zwischen BMI und Mikrobiom-Muster wurden Gestationsalter und Sekretor-Status geprüft (Forschungsfrage 1aa). Die erwarteten Effekte, dass sich mit zunehmendem Gestationsalter die Unterschiede in den *Lactobacillus* Anteilen verringern würden und ein positiver Sekretor-Status die Korrelation verstärken würde, konnten nicht

beobachtet werden. Erwartet wurde eine potenzielle Verringerung der Unterschiede in den *Lactobacillus* Anteilen, da die Schwangerschaft durch die massiv erhöhten Östrogenspiegel Differenzen in den Ausgangshormonspiegeln vermindern würde. Ein negativer Sekretor-Status dagegen könnte die Effekte verstärken, da höhere Durchschnitts-BMI-Werte in dieser Gruppe eine Korrelation vermuten lassen (119) und ein negativer Sekretor-Status häufig mit einer erhöhten Diversität des vaginalen Mikrobioms korreliert (96). Innerhalb der untersuchten Kohorte zeigten sich weder für das Gestationsalter noch für den Sekretor-Status ein Einfluss auf die Korrelation zwischen BMI und Mikrobiomdiversität. Vermutlich gibt es andere relevante Co-Faktoren wie die Ernährung und Lebensstil, endokrine und/oder metabolische Faktoren, die in dieser Arbeit jedoch nicht berücksichtigt wurden. Zur Spezifizierung der Veränderungen des vaginalen Mikrobioms in Abhängigkeit des prägraviden BMI wurden einzelne Amplicon Sequencing Variants (ASVs) von *Fingoldia*, *Gardnerella*, *Lactobacillus iners* und *Lactobacillus jensenii* untersucht (Forschungsfrage 1b). Da ein gesundes vaginales Mikrobiom von *Lactobacillus* Spezies dominiert wird (51), wurde erwartet, dass die ASVs dieser Spezies häufiger in der niedriggewichtigen BMI-Gruppe vorkommen würden, während für die *Gardnerella* und *Fingoldia* taxonomisch zugeordneten ASVs höhere Abundanzen in der höhergewichtigen BMI-Gruppe erwartet wurden. Für die ASVs von *Lactobacillus iners* und *Lactobacillus jensenii* zeigte sich keine Korrelation mit dem BMI, während *Gardnerella* und *Fingoldia* proportional zur Erhöhung des BMIs tendenziell häufiger vorkamen. Die fehlende Korrelation der *Lactobacillus* Spezies könnten dadurch erklärt werden, dass diese Spezies möglicherweise innerhalb der Gattung *Lactobacillus* eher robustere Spezies sind, die auch in diverseren Mikrobiom-Kompositionen überleben können. In diesem Fall würden erst andere Spezies der Gattung *Lactobacillus* verdrängt. Es würde demnach bei zunehmender Diversität nicht nur die *Lactobacillus* Dominanz, sondern die Diversität von *Lactobacillus* auf Speziesebene reduziert werden. Vermutlich könnte man bei der Untersuchung anderer ASVs - beispielsweise von *L. crispatus*, *L. vaginalis* oder *L. gasseri* Tendenzen beobachten. Dass die ASVs, die taxonomisch *Gardnerella* und *Fingoldia* zugeordnet wurden proportional zum BMI stiegen, erscheint plausibel. Die Korrelation zwischen erhöhter mikrobieller Diversität bei steigendem BMI für die Kohorte wurde bereits beobachtet und

beschrieben. Bei sinkender *Lactobacillus* Dominanz nimmt die Milchsäureproduktion ab (50), wodurch der vaginale pH-Wert basischer wird. Bakterien wie *Gardnerella* und *Fingoldia* - denen pathogene Eigenschaften zugeschrieben werden - können in einem weniger sauren Milieu besser wachsen (120).

Nach der Untersuchung der Korrelation des BMIs mit der Mikrobiomzusammensetzung folgte die Untersuchung einer Korrelation zwischen dem Ausmaß der mütterlichen Gewichtszunahme während Schwangerschaft und des mikrobiellen Musters (Forschungsfrage 1c). Nachdem bereits ein potenzieller Zusammenhang zwischen einer exzessiven Gewichtszunahme und einer niedrigen α -Diversität beschrieben ist (88), wurden ähnliche Tendenzen in der untersuchten Kohorte erwartet. Dies wäre dadurch zu erklären, dass ein erhöhter BMI mit verringerten *Lactobacillus* Anteilen des Mikrobioms assoziiert sind (87). Es zeigten sich jedoch keine klar linearen Tendenzen, weshalb für die untersuchte Kohorte von einer fehlenden Korrelation zwischen dem Ausmaß der Gewichtszunahme und der mikrobiellen Zusammensetzung ausgegangen werden muss. Dies könnte dadurch erklärbar sein, dass Frauen, die einen erhöhten prägraviden BMI aufweisen, während der Schwangerschaft dazu geraten wird weniger Gewicht zuzunehmen (110). Weiters wurden die vaginalen Mikrobiom-Kompositionen auf potenzielle Assoziationen bestimmter Gattungen mit einer erhöhten Gewichtszunahme analysiert (Forschungsfrage 1cc). Hierbei konnte festgestellt werden, dass Frauen, die weniger Gewicht in der Schwangerschaft zunahmten, tendenziell höhere *Gardnerella* Abundanzen im Mikrobiom zeigten. Bei einem der vier Messzeitpunkte war dieser Zusammenhang statistisch signifikant. Für *Corynebacterium* konnten keine signifikanten Zusammenhänge gezeigt werden, jedoch die Tendenz zu einer Assoziation mit erhöhter Gewichtszunahme während der Schwangerschaft. Bei der Analyse auf ASV-Ebene zeigen sich für *Gardnerella* und *Corynebacterium* ähnliche Tendenzen, die hier untersuchten *Fingoldia*-zugeordneten ASVs zeigten keine lineare Korrelation. Da Frauen mit einem erhöhten ppBMI durchschnittlich weniger Gewicht in der Schwangerschaft zunahmten, sind die Ergebnisse passend zum Befund, dass *Gardnerella* ab einem BMI > 21,5 häufiger zu finden ist. Bezüglich einer Assoziation von *Corynebacterium* mit der Gewichtszunahme in der

Schwangerschaft gibt es bisher wenig Daten, wodurch eine Interpretierbarkeit der gefundenen schwachen Tendenzen erschwert ist. Bezüglich einer Assoziation zwischen *Finegoldia* und einer potenziellen Gewichtszunahme ist die Datenlage bislang unvollständig, das häufigste gefundene mit *Finegoldia* assoziierte ASV lässt keinen Zusammenhang vermuten.

Bezüglich des mütterlichen Alters als möglicher Einflussfaktor auf die vaginalen Mikrobiommuster, wurde erwartet, dass mit steigendem Alter die *Lactobacillus* Dominanz sinken würde (Forschungsfrage 2) (90,91). In der untersuchten Kohorte konnte sich diese Vermutung nicht bestätigen - im Gegenteil, die ältesten Frauen (44 und 45 Jahre alt) zeigten sehr stabile Mikrobiome. Hier scheinen andere Co-Faktoren einen bedeutenderen Einfluss auf die mikrobielle Zusammensetzung zu haben. Da sich die Interpretation jedoch primär auf die Daten von zwei Frauen stützt, ist eine naheliegende Erklärung, dass die Ergebnisse aufgrund der zu kleinen Stichprobe nicht repräsentativ sind. Möglicherweise wurden zufällig ältere Frauen untersucht, die ein überdurchschnittlich *Lactobacillus* reiches Mikrobiom hatten, während andere Frauen ihres Alters höhere Abundanzen anderer Spezies gezeigt hätten.

Weiters wurde untersucht, ob sich die Schwankungen in der *Lactobacillus* Dominanz in Abhängigkeit des maternalen Alters unterscheiden (Forschungsfrage 2a). Erwartet wurde, dass bei Schwangeren höheren Alters stärkere Schwankungen auftreten als bei jüngeren (91,92). Hier konnte keine klare Tendenz festgestellt werden. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass die Anzahl von vier Messzeitpunkten pro Schwangerer nicht ausreichend waren, um kleine Schwankungen in der *Lactobacillus* Dominanz zu detektieren.

Da die fetale Hormonproduktion bereits intrauterin beginnt, wurden geschlechtsspezifische Unterschiede auf die *Lactobacillus* Dominanz vermutet (Forschungsfrage 3)(93,94). Aufgrund der wachstumsfördernden Effekte auf *Lactobacillus* durch Östrogen (79) - das bei Frauen, die mit einem weiblichen Fötus schwanger sind um ca. 9 % erhöht ist (95) - wurde erwartet, dass diese Mütter eine erhöhte *Lactobacillus* Dominanz zeigen würden. In der Auswertung zeigte sich dazu passend eine schwache, nicht signifikante Tendenz zu veränderten

mikrobiellen Mustern bei Müttern männlicher Föten. Möglicherweise war die untersuchte Kohorte zu klein, um ein signifikantes Ergebnis zu erhalten, auch wenn Korrelationen bestehen.

Im Weiteren wurde eine potenzielle Korrelation zwischen dem Sekretor-Status, dem fetalen Geschlecht und der *Lactobacillus* Dominanz des Mikrobioms untersucht, um die HMO-abhängigen Effekte besser zu verstehen (Forschungsfrage 3a). Da sich in Abhängigkeit des Sekretor-Status die HMOs und damit das Nahrungsangebot für die Bakterien verändert, wurden Unterschiede in der mikrobiellen Besiedelung sowohl in Abhängigkeit des Geschlechts als auch in Abhängigkeit des Sekretor-Status vermutet. Da für Sekretor-positive Frauen aufgrund ihres HMO-Profiles eine Assoziation mit anderen Gattung als *Lactobacillus* beschrieben ist (69) wurde bei ihnen eine verminderte *Lactobacillus* Dominanz erwartet. Aufgrund des potenziellen Effekts der intrauterinen Hormonproduktion (93,94), wurde für Sekretor-positive Mütter männlicher Föten die geringsten *Lactobacillus* Werte erwartet, während Sekretor-positive Mütter weiblich Föten demnach die höchste Tendenz für eine *Lactobacillus* Dominanz zeigen müssten. Tatsächlich zeigten sich dazu passende Ergebnisse: Sekretor-negative Mütter weiblicher Föten zeigten durchschnittlich das Mikrobiom mit der höchsten Abundanzen von *Lactobacillus*. Innerhalb der anderen Gruppen waren die Ergebnisse nicht derart eindeutig zu bewerten. Auffällig war auch, dass die Mütter weiblicher Föten häufiger eine Besiedelung mit *Gardnerella* zeigten, während bei den Müttern männlicher Föten tendenziell eher *Prevotella* eine Rolle bei der mikrobiellen Komposition spielte. Möglicherweise könnte sich demnach die intrauterine Hormonproduktion auch auf andere Spezies auswirken und somit die Mikrobiomzusammensetzung beeinflussen.

Im Weiteren wurde untersucht, welche Rolle *Gardnerella* neben *Lactobacillus* spielt und welche korrelativen Veränderungen bei einem erhöhten *Gardnerella*-Vorkommen in den Metadaten zu finden sind (Forschungsfrage 4). *Gardnerella* wird mit einem erhöhten Risiko für Infektionserkrankungen wie bakteriellen Vaginosen und Frühgeburtlichkeit in Verbindung gebracht (31). Da Infektionserkrankungen ein Ausschlusskriterien für die Studie waren, wurden die

Metadaten nach anderen auffälligen Veränderungen hin untersucht. Dabei zeigte sich, dass Frauen mit einem *Gardnerella*-Anteil $>10\%$ am vaginalen Mikrobiom durchschnittlich höhere BMI-Werte zeigten. Eine potenzielle Erklärung für dieses Phänomen könnte sein, dass die veränderte Stoffwechsellage übergewichtiger Frauen die Wachstumsbedingungen für *Gardnerella* begünstigt (87).

Da ein erhöhtes Auftreten von *Gardnerella* und somit eine verringerte *Lactobacillus* Dominanz in der Literatur mit einem erhöhten Risiko für Frühgeburtlichkeit assoziiert ist (81), wurde eine Korrelation zwischen der Diversität des vaginalen Mikrobioms und dem Entbindungstag vermutet (Forschungsfrage 5). Es sollte auch spezifisch gezeigt werden, wie hoch der Prozentsatz jener Frauen mit *Lactobacillus* Anteilen $\leq 50\%$ ist, die termingeburtlich entbunden haben, um zu sehen, welche Kompositionen mit einer normalen Schwangerschaftslänge vereinbar sind (Forschungsfrage 5a). Es konnte keine Korrelation zwischen einem *Lactobacillus* Anteil $\leq 50\%$ und Frühgeburtlichkeit festgestellt werden. Innerhalb der Termingeburten hatten circa 1/5 der Frauen ein Mikrobiom, das $\leq 50\%$ *Lactobacillus* zeigte. Eine Erklärung könnte die schlechte Vergleichbarkeit der Gruppen sein - während fünf Frauen frühgeburtlich entbanden, waren es innerhalb der termingeburtlichen Kohorte 42, was die Verwertbarkeit der ermittelten Ergebnisse deutlich einschränkt, da ein Zufallseffekt wahrscheinlich ist. Vermutlich war die Stichprobe aufgrund der kleinen Größe nicht repräsentativ. Eine andere Erklärung könnte sein, dass der Entbindungszeitpunkt nicht direkt mit der *Lactobacillus* Dominanz korreliert, sondern primär mit Infektionserkrankungen. Diese Infektionserkrankungen entstehen zwar häufiger bei Frauen mit reduzierter *Lactobacillus* Dominanz, jedoch scheint es keine zwingende Korrelation zu geben. Da Infektionserkrankungen ein Ausschlusskriterium für Aufnahme in die Untersuchungskohorte waren, scheint die reduzierte *Lactobacillus* Dominanz bei den Frauen in der termingeburtlichen Kohorte keine Effekte auf die Schwangerschaftsdauer gehabt zu haben.

Auch bei der Analyse der häufigsten ASVs in Abhängigkeit des Schwangerschaftsalters bei Geburt, konnten keine signifikanten Zusammenhänge beobachtet werden. (Forschungsfrage 5b). Bezüglich *Megasphaera* fiel auf, dass sie nur sporadisch auftrat und demnach vermutlich eher nicht Teil des typischen

Kernmikrobioms ist. Wenn *Megasphaera* an der mikrobiellen Komposition beteiligt war, waren es stets Mikrobiome mit reduzierter *Lactobacillus* Dominanz und einer zeitgleich relativ erhöhten Abundanzen von *Gardnerella* und *Prevotella*. Diese Mikrobiom-Komposition scheint demnach günstig für das Wachstum von *Megasphaera* zu sein. Über *Megasphaera* - eine Gattung, die primär aus dem Darmmikrobiom bekannt ist - besitzt die Fähigkeit, Laktat zu verstoffwechseln (121). Falls die primär vaginal vorkommenden Spezies der Gattung *Megasphaera* ebenfalls zur Verstoffwechslung von Laktat imstande wären und somit den vaginalen pH-Wert anheben könnten, würde *Megasphaera* möglicherweise eine Schlüsselrolle bei der Transition eines vaginalen Mikrobioms mit *Lactobacillus* Dominanz zu einer erhöhten mikrobiellen Diversität besitzen.

Als nächstes wurde untersucht, ob der Sekretor-Status sich auf die Tendenz zur *Lactobacillus* Dominanz auswirkt (Forschungsfrage 6). Aufgrund der sich in Abhängigkeit des Sekretor-Status unterscheidenden HMO-Kompositionen und bakteriellen Nährstoffangebote, könnte die mikrobielle Besiedelung beeinflusst werden (96,97). Es wurde demnach erwartet, dass sich die Unterschiede in der mikrobiellen Komposition in Abhängigkeit des Sekretor-Status zeigen würden. In der untersuchten Kohorte unterschied sich die *Lactobacillus* Dominanz zwischen den Sekretor-Gruppen nicht wesentlich. Eine Differenz konnte jedoch bei den neben *Lactobacillus* vorkommenden Gattungen beobachtet werden (Forschungsfrage 6a). Während bei Sekretor positiven 3,5-mal so viel *Gardnerella* gefunden wurde, zeigte sich bei Sekretor-negativen 2,7-mal so viel *Prevotella* im Aufbau des vaginalen Mikrobioms. Es liegt also nahe, dass zumindest einige *Gardnerella* Spezies die Sekretor-abhängigen HMOs (2F' und LNFPI) gut verstoffwechseln können, während *Prevotella* möglicherweise eine bessere Metabolisierung der für Sekretor-negative Frauen typischen HMOs zeigt (3'FL, LNFPII und LNT) (97). Ob die unterschiedlichen Mikrobiom-Kompositionen sich in Abhängigkeit des Sekretor-Status auf die Schwangerschaftsdauer auswirken, wurde mit der Erwartung untersucht, dass Sekretor-negative Frauen aufgrund ihrer Mikrobiombesiedelung tendenziell früher entbinden (Forschungsfrage 6b). In der untersuchten Kohorte konnte diesbezüglich kein statistisch signifikanter Zusammenhang gefunden werden, jedoch zeigte sich eine Tendenz in diese

Richtung. Auch in der Literatur finden sich Hinweise, dass die Kombination aus Sekretor-Negativität und fehlender *Lactobacillus* Dominanz zu Mikrobiom-Komposition führen können, die mit einem erhöhten Risiko für Frühgeburtlichkeit einhergehen (96).

Im Folgenden wurde eine potenzielle Korrelation zwischen dem BMI, der Gewichtszunahme in der Schwangerschaft und dem Sekretorstatus geprüft (Forschungsfrage 6c). Erwartet wurde ein möglicher Effekt durch die vom Sekretor-Status abhängigen unterschiedlichen HMO-Kompositionen auf die Stoffwechsellage. Es zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang, jedoch eine Tendenz zu einer höheren Gewichtszunahme bei Sekretor-positiven Frauen. Eine potenzielle Erklärung hierfür könnte sein, dass die Frauen in dieser Gruppe einen niedrigeren Ausgangs-BMI hatten (23,2) als in der Vergleichsgruppe (26), weshalb eine höhere Gewichtszunahme geplant und somit aktiv bestimmt war.

Es ist bereits bekannt, dass sich die Komposition und Konzentration der HMO-Profile in Abhängigkeit des Gestationsalter verändern (37,38). Für die Untersuchungskohorte wurde deshalb erwartet, eine Zunahme aller fünf HMOs im Verlauf der Schwangerschaft zu beobachten. Weiters wurde für 2'FL und LDFT die höchste Zunahme zwischen dem ersten und dem 2. Untersuchungszeitpunkt erwartet (39) (Forschungsfrage 7). Bei der Analyse zeigte sich ein Anstieg aller HMOs, wobei die Abundanzen von 2'FL und LDFT am meisten stiegen, während 6'SLN kaum vermehrt im Urin gefunden werden konnte. Die interindividuelle Streuung war für 2'FL und LDFT besonders groß, während 3'SL die kleinsten Streuungswerte zeigten. Die große Streuung ist vermutlich dadurch zu erklären, dass 2'FL und LDFT Sekretor-abhängig sezerniert werden, weshalb die Differenz der Abundanzen in Abhängigkeit des Sekretor-Status groß ist. 3'SL zeigt vermutlich deshalb homogene Werte, da es nicht Sekretor-abhängig sezerniert wird (111). Wie genau der Sekretor-Status sich auf die Abundanzen der HMOs auswirkt, wurde im Folgenden untersucht (Forschungsfrage 8). Hier wurde erwartet, dass 2'FL und LDFT als Sekretor-abhängige HMOs bei Sekretor-positiven Frauen vorkommen, bei Sekretor-negativen jedoch nicht (111). Im Ergebnis zeigten sich zwar für Sekretor-positive Frauen eindeutig höhere Werte für 2'FL und LDFT, jedoch kamen die

Sekretor-abhängigen HMOs auch bei Sekretor-negativen Frauen vor. Erklärbar wäre das möglicherweise dadurch, dass nicht alle als Sekretor-negativ definierten Schwangeren keine Enzymaktivität zeigen, sondern einige eine geringe Restaktivität der α -1,2-Fucosyltransferase haben(122).

Zuletzt wurden die Auswirkungen der HMOs auf das Mikrobiom in Abhängigkeit des Sekretorstatus geprüft - es sollte untersucht werden, ob die Frauen mit positivem Sekretor-Status und damit deutlich höheren Mengen an 2'FL und LDFT eine andere mikrobielle Komposition hatten wie jene Frauen mit nur geringen Mengen dieser HMOs (Forschungsfrage 9). Erwartet wurde ein Unterschied, der demnach einen Hinweis dafür geben würde, dass durch die HMOs nicht nur postnatal das kindliche Darmmikrobiom (28,35,112), sondern auch pränatal das vaginale Mikrobiom beeinflussen. Es wurde auch erwartet, dass bei niedrigeren 2'FL-Werten weniger *Lactobacillus* und mehr *Gardnerella* oder *Prevotella* vorkommen würden.

Hier zeigten sich keine signifikanten Auswirkungen auf das Mikrobiom, weder für 2'FL noch für LDFT konnten klare Unterschiede in Abhängigkeit des Sekretorstatus gesehen werden. Alle drei Gattungen zeigen sich unabhängig der untersuchten Parameter als Bestandteile des Mikrobioms. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass die Effekte der humanen Milch-Oligosaccharide auf das vaginale Mikrobiom zu klein sind, um sie neben den anderen vielfältigen Einflussfaktoren signifikant beobachten zu können. Möglicherweise war die Prüfung eines Effekts auf die zehn häufigsten vaginalen Mikrobiom-Gattungen zu oberflächlich und weitere, spezifischere Analysen beispielsweise auf Spezies Ebene könnten potenzielle Korrelationen zeigen.

Kritische Reflexion; Einschränkungen zu Inhalt und Methode

Der bedeutendste Kritikpunkt an dieser Arbeit ist vermutlich der Umfang der untersuchten Kohorte. Mit 48 Schwangeren war diese sehr klein, um das vaginale Mikrobiom zu untersuchen. Dadurch ist die statistische Power der Test eingeschränkt und statistisch signifikante Zusammenhänge konnten möglicherweise nicht erkannt werden. Häufig wurde die kleine Untersuchungskohorte zur Prüfung des Einflusses der Metadaten in noch kleinere Gruppen unterteilt - nach dem Geschlecht des Fötus (18 männliche, 28 weibliche),

dem Sekretorstatus (35 Sekretor-positive, 13 Sekretor negativ) oder nach Schwangerschaftsdauer (fünf Frühgeburten, 42 Termingeburten). Da die Vergleichsgruppen unterschiedlich groß waren, müsste ein Unterschied demnach sehr groß sein, um detektierbar zu sein. Es ist bereits bekannt, dass es viele Einflussfaktoren auf das vaginale Mikrobiom gibt und größere Kohorte nötig sind, um trotz der großen interindividuellen Unterschiede potenzielle Einflussfaktoren beurteilen können (123). Es wurden zwar umfangreich versucht mögliche Einflussfaktoren durch die strenge Wahl der Ein- und Ausschlusskriterien zu verringern, jedoch könnten nicht erhobene Faktoren wie Sexualverhalten, Ernährungsverhalten oder Hormonstatus einen Einfluss haben. Die Frauen wurden zu je vier Messzeitpunkten untersucht, um den Einfluss der interindividuellen Unterschiede zu verringern. Dies könnte jedoch nicht ausreichend gewesen sein, um mögliche Assoziationen mit Signifikanz zu detektieren. Beispielsweise konnten so intraindividuelle Schwankungen möglicherweise nicht ausreichend gemessen werden. Es ist bekannt, dass die *Lactobacillus* Dominanz älterer Frauen stärker schwankt als die jüngerer Vergleichspersonen (92). Dies konnte in der untersuchten Kohorte nicht beobachtet werden. Einige Metadaten wichen von den Durchschnittswerten der österreichischen Bevölkerung ab (101), beispielsweise wurden in der untersuchten Kohorte überdurchschnittlich viele Mädchen geboren und auch die Zahl der Frühgeburten war überdurchschnittlich hoch. Weiters wurden die meisten grafischen Analysen auf Genera-Ebene ausgeführt, wobei nur die zehn am häufigsten vorkommenden Gattungen berücksichtigt wurden. Veränderungen der relativen Abundanzen auf Spezies-Ebene wurden kaum untersucht. Da unterschiedlichen Spezies unterschiedliche Funktionen zugeschrieben werden, wäre eine detailliertere Analyse wünschenswert (55).

Implikationen für Theorie und Praxis

Da sich keine signifikanten Ergebnisse, sondern nur Tendenzen zeigen ließen, sollten diese Arbeit dazu motivieren, die vaginale Mikrobiomforschung zu intensivieren und die potenziellen Auswirkungen dieses auf den individuellen Schwangerschaftsverlauf zu untersuchen. Die Ergebnisse zeigen, dass die Einflussfaktoren auf das Mikrobiom multiple und komplex sind und einen stark individualisierten Zugang erfordern. Sollten sich in Zukunft HMO-abhängige

Veränderungen des vaginalen Mikrobioms zeigen, könnte hier ein therapeutischer Ansatzpunkt sein. Ein gesundes vaginales Mikrobiom ist nicht nur wichtig für die Mütter, sondern auch für den Verlauf und Schwangerschaftsausgang (123). Ein besseres Verständnis über potenziell pathogene bzw. gesundheitserhaltende Mikrobiom-Kompositionen könnte somit zur Senkung der Frühgeburtlichkeitsrate beitragen und die Prävalenz für vaginale Infektionserkrankungen senken. Differenzen in den Sekretor-abhängigen HMO-Profilen könnten durch gezielte Anreicherung der frühkindlichen Kost ausgeglichen werden, um eine optimale Besiedelung des Darmmikrobioms zu erzielen und damit korrelierende Störungen der Immunsystementwicklung vorzubeugen.

Ausblick und Anregungen für weiterführende Arbeiten

Die Durchführung einer groß angelegten Studie mit einer deutlich größeren Kohorte (beispielsweise 200 Personen) und einer besseren Vergleichbarkeit mit mehr Messzeitpunkten, vor allem in den ersten Wochen und zum Ende der Schwangerschaft hin. Bezüglich der HMOs werden Messzeitpunkte in der 14. Bis 22. Schwangerschaftswoche sinnvoll, da in der Zeit der höchste Anstieg Sekretor-abhängiger HMOs (2'FL, LDFT) beschrieben ist erwartet (39). Hier wäre zudem eine Korrelation zwischen Mikrobiom und HMOs sinnvoll - beispielsweise über eine Heatmap; Um die Effekte der steigenden Östrogenproduktion in der Schwangerschaft auf die *Lactobacillus* Dominanz besser zu verstehen, könnte man in einer anderen Studie die spezifischen Abundanzen auf Spezies-Ebene (bspw. *Lactobacillus iners*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus jensii*) analysieren. Weiters wäre eine Kategorisierung der Frauen anhand ihres Körpergewichts sinnvoll, um für jede Gruppe Mittelwerte und Mediane der Abundanzen für die häufigsten Gattungen errechnen und daraus eine Heatmap und Boxplots erstellen. Um die Aussagekraft des BMIs zu verbessern könnte man zusätzlich noch spezifischere Methode zur Bestimmung der Körperkomposition verwenden, beispielsweise die Messung der Körperfettmasse. Eine fundiertere Analyse unter Berücksichtigung des weiblichen Hormonstatus wäre ebenfalls spannend - sowohl für eine mögliche Korrelation mit Übergewicht oder Adipositas, als auch für die Beurteilung der intrauterinen Hormonproduktion und deren Auswirkungen auf das vaginale Mikrobiom. Mikrobiome mit verminderter *Lactobacillus* Dominanz

könnten möglicherweise auf verschiedene Kompositionstypen und deren Pathogenität hin untersucht werden. Es scheint, als wäre ein diverses Mikrobiom nicht pauschal als Risikofaktor für Schwangerschaftskomplikationen zu bewerten, stattdessen bedarf es einer individuellen Beurteilung der mikrobiellen Gemeinschaft.

Literaturverzeichnis

1. El-Sayed A, Aleya L, Kamel M. Microbiota's role in health and diseases. *Environmental Science and Pollution Research*. 2021. doi:10.1007/s11356-021-14593-z
2. Kuziel GA, Rakoff-Nahoum S. The gut microbiome. *Current Biology*. 28. März 2022;32(6):R257–64. doi:10.1016/j.cub.2022.02.023 PubMed PMID: 35349808.
3. Sidhu M, Van Der Poorten D. The gut microbiome. *FOCUS 206 AFP*. 2017;46(4).
4. Sender R, Fuchs S, Milo R. Leading Edge Commentary Are We Really Vastly Outnumbered? Revisiting the Ratio of Bacterial to Host Cells in Humans [Internet]. doi:10.1016/j.cell.2016.01.013
5. Montalto M, D'Onofrio F, Gallo A, Cazzato A, Gasbarrini G. Intestinal microbiota and its functions. *Digestive and Liver Disease Supplements*. Juli 2009;3(2):30–4. doi:10.1016/S1594-5804(09)60016-4
6. Muniesa M, Jofre J. Identifying and analyzing bacteriophages in human fecal samples: What could we discover? *Future Microbiol*. 2014;9(7):879–86. doi:10.2217/fmb.14.47 PubMed PMID: 25156377.
7. Berg G, Rybakova D, Fischer D, Cernava T, Vergès MCC, Charles T, u. a. Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. *Microbiome*. BioMed Central Ltd; 2020. doi:10.1186/s40168-020-00875-0 PubMed PMID: 32605663.
8. Littman DR, Pamer EG. Role of the commensal microbiota in normal and pathogenic host immune responses. *Cell Host and Microbe*. 2011. S. 311–23. doi:10.1016/j.chom.2011.10.004 PubMed PMID: 22018232.
9. Ivanov II, Honda K. Intestinal commensal microbes as immune modulators. *Cell Host and Microbe*. 2012. S. 496–508. doi:10.1016/j.chom.2012.09.009 PubMed PMID: 23084918.
10. Scarpellini E, Ianiro G, Attili F, Bassanelli C, De Santis A, Gasbarrini A. The human gut microbiota and virome: Potential therapeutic implications. *Digestive and Liver Disease*. 1. Dezember 2015;47(12):1007–12. doi:10.1016/j.dld.2015.07.008 PubMed PMID: 26257129.
11. Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Paslier D Le, Yamada T, Mende DR, u. a. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*. 12. Mai 2011;473(7346):174–80. doi:10.1038/nature09944 PubMed PMID: 21508958.
12. Cheng M, Ning K. Stereotypes About Enterotype: the Old and New Ideas. *Genomics, Proteomics and Bioinformatics*. Beijing Genomics Institute; 2019. S. 4–12. doi:10.1016/j.gpb.2018.02.004 PubMed PMID: 31026581.
13. McGuckin MA, Lindén SK, Sutton P, Florin TH. Mucin dynamics and enteric pathogens. *Nat Rev Microbiol*. April 2011;9(4):265–78. doi:10.1038/nrmicro2538 PubMed PMID: 21407243.
14. Cebra JJ. Influences of microbiota on intestinal immune system development. *American Society for Clinical Nutrition*. 1999.
15. Blaut M, Clavel T. The Journal of Nutrition Effects of Probiotics and Prebiotics Metabolic Diversity of the Intestinal Microbiota: Implications for Health and Disease 1,2. *J. Nutr*. 2007. Report.
16. Iebba V, Totino V, Gagliardi A, Santangelo F, Cacciotti F, Trancassini M, u. a. Eubiosis and dysbiosis: the two sides of the microbiota SuMMARy. *New Microbiologica*. 2016. Report.

17. Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, u. a. Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora [Internet]. Report. Verfügbar unter: www.sciencemag.org/cgi/content/full/1110591/DC1
18. Hooper L V., Littman DR, Macpherson AJ. Interactions between the microbiota and the immune system. *Science*. American Association for the Advancement of Science; 2012. S. 1268–73. doi:10.1126/science.1223490 PubMed PMID: 22674334.
19. Belkaid YHTW. Role of the Microbiota in Immunity and Inflammation. 27. März 2014.
20. Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Fierer N, u. a. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 29. Juni 2010;107(26):11971–5. doi:10.1073/pnas.1002601107 PubMed PMID: 20566857.
21. Yatsunenko T, Rey FE, Manary MJ, Trehan I, Dominguez-Bello MG, Contreras M, u. a. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature*. 2012. S. 222–7. doi:10.1038/nature11053 PubMed PMID: 22699611.
22. Shabayek S, Abdellah AM, Salah M, Ramadan M, Fahmy N. Alterations of the vaginal microbiome in healthy pregnant women positive for group B Streptococcus colonization during the third trimester. *BMC Microbiol*. 1. Dezember 2022;22(1). doi:10.1186/s12866-022-02730-8 PubMed PMID: 36544085.
23. Petrova MI, Lievens E, Malik S, Imholz N, Lebeer S. Lactobacillus species as biomarkers and agents that can promote various aspects of vaginal health. *Frontiers in Physiology*. Frontiers Media S.A.; 2015. doi:10.3389/fphys.2015.00081
24. Haron S, Illier LH, Ugent OPN, Schenbach AAE, Rohn AAK, Onald R, u. a. ASSOCIATION BETWEEN BACTERIAL VAGINOSIS AND PRETERM DELIVERY OF A LOW-BIRTH-WEIGHT INFANT. Bd. 333. 1995. Report.
25. Jedes dritte Baby kam 2023 per Kaiserschnitt. Report.
26. Mitchell CM, Mazzoni C, Hogstrom L, Bryant A, Bergerat A, Cher A, u. a. Delivery Mode Affects Stability of Early Infant Gut Microbiota. *Cell Rep Med*. 22. Dezember 2020;1(9). doi:10.1016/j.xcrm.2020.100156 PubMed PMID: 33377127.
27. Martin R, Makino H, Yavuz AC, Ben-Amor K, Roelofs M, Ishikawa E, u. a. Early-Life events, including mode of delivery and type of feeding, siblings and gender, shape the developing gut microbiota. *PLoS One*. 1. Juni 2016;11(6). doi:10.1371/journal.pone.0158498 PubMed PMID: 27362264.
28. Marcobal A, Barboza M, Froehlich JW, Block DE, German JB, Lebrilla CB, u. a. Consumption of human milk oligosaccharides by gut-related microbes. *J Agric Food Chem*. 12. Mai 2010;58(9):5334–40. doi:10.1021/jf9044205 PubMed PMID: 20394371.
29. Stennett CA, Dyer Id T V, He X, Robinson CK, Ravelid J, Ghanem KG, u. a. A cross-sectional pilot study of birth mode and vaginal microbiota in reproductive-age women [Internet]. 2020. doi:10.1371/journal.pone.0228574
30. Amabebe E, Anumba DOC. The vaginal microenvironment: The physiologic role of Lactobacilli. *Frontiers in Medicine*. Frontiers Media S.A.; 2018. doi:10.3389/fmed.2018.00181 PubMed PMID: 29951482.
31. Chen X, Lu Y, Chen T, Li R. The Female Vaginal Microbiome in Health and Bacterial Vaginosis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. Frontiers Media S.A.; 2021. doi:10.3389/fcimb.2021.631972 PubMed PMID: 33898328.
32. Thurl S, Henker J, Siegel M, Tovar K, Sawatzki GG. Detection of four human milk groups with respect to Lewis blood group dependent oligosaccharides lacto-N-neotetraose; LNFP I-III, lacto-N-fucopentaoses I-III; LNDFH I-II, lacto-N-

- difucohexaoses I-II; LNH, lacto-N-hexaose; 2-F-LNH, 2-fucosyllacto-N-hexaose; 3-F-LNH, 3-fucosyllacto-N-hexaose; 2,3-DF-LNH, 2,3-difucoyllacto-N-hexaose. *Glycoconjugate Journal*. 1997. Report.
33. Azad MB, Robertson B, Atakora F, Becker AB, Subbarao P, Moraes TJ, u. a. Human Milk Oligosaccharide Concentrations Are Associated with Multiple Fixed and Modifiable Maternal Characteristics, Environmental Factors, and Feeding Practices. *Journal of Nutrition*. 1. November 2018;148(11):1733–42. doi:10.1093/jn/nxy175 PubMed PMID: 30247646.
 34. Ninonuevo MR, Park Y, Yin H, Zhang J, Ward RE, Clowers BH, u. a. A strategy for annotating the human milk glycome. *J Agric Food Chem*. 4. Oktober 2006;54(20):7471–80. doi:10.1021/jf0615810 PubMed PMID: 17002410.
 35. Duman H, Bechelany M, Karav S. Human Milk Oligosaccharides: Decoding Their Structural Variability, Health Benefits, and the Evolution of Infant Nutrition. *Nutrients*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2025. doi:10.3390/nu17010118 PubMed PMID: 39796552.
 36. Jantscher-Krenn E, Treichler C, Brandl W, Schönbacher L, Köfeler H, Van Poppel MNM. The association of human milk oligosaccharides with glucose metabolism in overweight and obese pregnant women. *American Journal of Clinical Nutrition*. 1. Dezember 2019;110(6):1335–43. doi:10.1093/ajcn/nqz202 PubMed PMID: 31504099.
 37. Jantscher-Krenn E. Evidence of human milk oligosaccharides in maternal circulation already during pregnancy: a pilot study. 4. November 2018;11.
 38. Coppa G V., Zampini L, Galeazzi T, Facinelli B, Ferrante L, Capretti R, u. a. Human milk oligosaccharides inhibit the adhesion to Caco-2 cells of diarrheal pathogens: *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, and *Salmonella fytis*. *Pediatr Res*. März 2006;59(3):377–82. doi:10.1203/01.pdr.0000200805.45593.17 PubMed PMID: 16492975.
 39. Craft KM, Townsend SD. The Human Milk Glycome as a Defense Against Infectious Diseases: Rationale, Challenges, and Opportunities. *ACS Infect Dis*. 9. Februar 2018;4(2):77–83. doi:10.1021/acsinfecdis.7b00209 PubMed PMID: 29140081.
 40. LoCascio RG, Ninonuevo MR, Freeman SL, Sela DA, Grimm R, Lebrilla CB, u. a. Glycoprofiling of bifidobacterial consumption of human milk oligosaccharides demonstrates strain specific, preferential consumption of small chain glycans secreted in early human lactation. *J Agric Food Chem*. 31. Oktober 2007;55(22):8914–9. doi:10.1021/jf0710480 PubMed PMID: 17915960.
 41. Marcobal A, Barboza M, Froehlich JW, Block DE, German JB, Lebrilla CB, u. a. Consumption of human milk oligosaccharides by gut-related microbes. *J Agric Food Chem*. 12. Mai 2010;58(9):5334–40. doi:10.1021/jf9044205 PubMed PMID: 20394371.
 42. Bidart GN, Rodríguez-Díaz J, Monedero V, Yebra MJ. A unique gene cluster for the utilization of the mucosal and human milk-associated glycans galacto-N-biose and lacto-N-biose in *Lactobacillus casei*. *Mol Microbiol*. 2014;93(3):521–38. doi:10.1111/mmi.12678 PubMed PMID: 24942885.
 43. Thongaram T, Hoeflinger JL, Chow JM, Miller MJ. Human milk oligosaccharide consumption by probiotic and human-associated bifidobacteria and lactobacilli. *J Dairy Sci*. 1. Oktober 2017;100(10):7825–33. doi:10.3168/jds.2017-12753 PubMed PMID: 28780103.
 44. Hirschmugl B, Brandl W, Csapo B, van Poppel M, Köfeler H, Desoye G, u. a. Evidence of human milk oligosaccharides in cord blood and maternal-to-fetal

- transport across the placenta. *Nutrients*. 1. November 2019;11(11). doi:10.3390/nu11112640 PubMed PMID: 31689898.
45. Ma B, Forney LJ, Ravel J. Vaginal microbiome: Rethinking health and disease. *Annu Rev Microbiol*. Oktober 2012;66:371–89. doi:10.1146/annurev-micro-092611-150157 PubMed PMID: 22746335.
 46. Ravel J, Gajer P, Abdo Z, Schneider GM, Koenig SSK, McCulle SL, u. a. Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 15. März 2011;108(SUPPL. 1):4680–7. doi:10.1073/pnas.1002611107 PubMed PMID: 20534435.
 47. Amabebe E, Anumba DOC. The vaginal microenvironment: The physiologic role of Lactobacilli. *Frontiers in Medicine*. Frontiers Media S.A.; 2018. doi:10.3389/fmed.2018.00181 PubMed PMID: 29951482.
 48. Boskey ER, Cone RA, Whaley KJ, Moench TR. Origins of vaginal acidity: High D/L lactate ratio is consistent with bacteria being the primary source. *Human Reproduction*. 2001;16(9):1809–13. doi:10.1093/humrep/16.9.1809 PubMed PMID: 11527880.
 49. Boskey ER, Telsch KM, Whaley KJ, Moench TR, Cone RA, Lincoln K, u. a. Acid Production by Vaginal Flora In Vitro Is Consistent with the Rate and Extent of Vaginal Acidification. *J. Paavonen, Scand. J. Infect. Dis. Suppl.* 1999. Report.
 50. Romero R, Hassan SS, Gajer P, Tarca AL, Fadrosch DW, Nikita L, u. a. The composition and stability of the vaginal microbiota of normal pregnant women is different from that of non-pregnant women. *Microbiome*. 3. Februar 2014;2(1). doi:10.1186/2049-2618-2-4 PubMed PMID: 24484853.
 51. Walther-António MRS, Jeraldo P, Berg Miller ME, Yeoman CJ, Nelson KE, Wilson BA, u. a. Pregnancy's stronghold on the vaginal microbiome. *PLoS One*. 4. Juni 2014;9(6). doi:10.1371/journal.pone.0098514 PubMed PMID: 24896831.
 52. Vásquez A, Jakobsson T, Ahrné S, Forsum U, Molin G. Vaginal Lactobacillus flora of healthy Swedish women. *J Clin Microbiol*. 1. August 2002;40(8):2746–9. doi:10.1128/JCM.40.8.2746-2749.2002 PubMed PMID: 12149323.
 53. Aagaard K, Riehle K, Ma J, Segata N, Mistretta TA, Coarfa C, u. a. A metagenomic approach to characterization of the vaginal microbiome signature in pregnancy. *PLoS One*. 13. Juni 2012;7(6). doi:10.1371/journal.pone.0036466 PubMed PMID: 22719832.
 54. Verstraelen H, Verhelst R, Claeys G, De Backer E, Temmerman M, Vaneechoutte M. Longitudinal analysis of the vaginal microflora in pregnancy suggests that *L. crispatus* promotes the stability of the normal vaginal microflora and that *L. gasseri* and/or *L. iners* are more conducive to the occurrence of abnormal vaginal microflora. *BMC Microbiol*. 2009;9. doi:10.1186/1471-2180-9-116 PubMed PMID: 19490622.
 55. Smith SB, Ravel J. The vaginal microbiota, host defence and reproductive physiology. *Journal of Physiology*. 15. Jänner 2017;595(2):451–63. doi:10.1113/JP271694 PubMed PMID: 27373840.
 56. Gupta S, Kakkar V, Bhushan I. Crosstalk between Vaginal Microbiome and Female Health: A review. *Microbial Pathogenesis*. Academic Press; 2019. doi:10.1016/j.micpath.2019.103696 PubMed PMID: 31449855.
 57. Torcia MG. Molecular Sciences Interplay among Vaginal Microbiome, Immune Response and Sexually Transmitted Viral Infections [Internet]. doi:10.3390/ijms20020266

58. Han Y, Liu Z, Chen T. Role of Vaginal Microbiota Dysbiosis in Gynecological Diseases and the Potential Interventions. *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Media S.A.; 2021. doi:10.3389/fmicb.2021.643422
59. Hyman RW, Fukushima M, Diamond L, Kumm J, Giudice LC, Davis RW. Microbes on the human vaginal epithelium [Internet]. 2005. Report. Verfügbar unter: www.psb.ugent.be
60. Verhelst R, Verstraelen H, Claeys G, Verschraegen G, Delanghe J, Van Simaey L, u. a. Cloning of 16S rRNA genes amplified from normal and disturbed vaginal microflora suggests a strong association between *Atopobium vaginae*, *Gardnerella vaginalis* and bacterial vaginosis [Internet]. 2004. Report. Verfügbar unter: <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/4/16>
61. Zhou X, Bent SJ, Schneider MG, Davis CC, Islam MR, Forney LJ. Characterization of vaginal microbial communities in adult healthy women using cultivation-independent methods. *Microbiology (N Y)*. 2004;150(8):2565–73. doi:10.1099/mic.0.26905-0 PubMed PMID: 15289553.
62. Bakterielle Vaginose. 2023. Report.
63. Chen C, Song X, Wei W, Zhong H, Dai J, Lan Z, u. a. The microbiota continuum along the female reproductive tract and its relation to uterine-related diseases. *Nat Commun*. 1. Dezember 2017;8(1). doi:10.1038/s41467-017-00901-0 PubMed PMID: 29042534.
64. Liu Z, Kong Y, Gao Y, Ren Y, Zheng C, Deng X, u. a. Revealing the interaction between intrauterine adhesion and vaginal microbiota using high-throughput sequencing. *Mol Med Rep*. 1. Mai 2019;49(5):4167–74. doi:10.3892/mmr.2019.10092 PubMed PMID: 30942434.
65. Hyman RW, Fukushima M, Jiang H, Fung E, Rand L, Johnson B, u. a. Diversity of the vaginal microbiome correlates with preterm birth. *Reproductive Sciences*. Jänner 2014;21(1):32–40. doi:10.1177/1933719113488838 PubMed PMID: 23715799.
66. Bakterielle Vaginose. 2023. Report.
67. Castro J, Machado D, Cerca N. Unveiling the role of *Gardnerella vaginalis* in polymicrobial Bacterial Vaginosis biofilms: the impact of other vaginal pathogens living as neighbors. *ISME Journal*. 1. Mai 2019;13(5):1306–17. doi:10.1038/s41396-018-0337-0 PubMed PMID: 30670827.
68. Pausan MR, Kolovetsiou-Kreiner V, Richter GL, Madl T, Giselbrecht E, Obermayer-Pietsch B, u. a. Human Milk Oligosaccharides Modulate the Risk for Preterm Birth in a Microbiome-Dependent and -Independent Manner. *mSystems*. 30. Juni 2020;5(3). doi:10.1128/msystems.00334-20
69. Patterson JL, Stull-Lane A, Girerd PH, Jefferson KK. Analysis of adherence, biofilm formation and cytotoxicity suggests a greater virulence potential of *Gardnerella vaginalis* relative to other bacterial-vaginosis-associated anaerobes. *Microbiology (N Y)*. 2010;156(2):392–9. doi:10.1099/mic.0.034280-0 PubMed PMID: 19910411.
70. Bradshaw CS, Sobel JD. Current Treatment of Bacterial Vaginosis-Limitations and Need for Innovation. *Journal of Infectious Diseases*. 15. August 2016;214:S14–20. doi:10.1093/infdis/jiw159 PubMed PMID: 27449869.
71. Sewankambo N, Gray RH, Wawer MJ, Paxton L, McNairn D, Wabwire-Mangen F, u. a. HIV-1 infection associated with abnormal vaginal flora morphology and bacterial vaginosis. *THE LANCET*. 1997. Report.
72. Swidsinski A, Verstraelen H, Loening-Baucke V, Swidsinski S, Mendling W, Halwani Z. Presence of a Polymicrobial Endometrial Biofilm in Patients with

- Bacterial Vaginosis. *PLoS One*. 8. Jänner 2013;8(1). doi:10.1371/journal.pone.0053997 PubMed PMID: 23320114.
73. Ravel J, Moreno I, Simón C. Bacterial vaginosis and its association with infertility, endometritis, and pelvic inflammatory disease. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. Mosby Inc.; 2021. S. 251–7. doi:10.1016/j.ajog.2020.10.019 PubMed PMID: 33091407.
 74. Gaudoin M, Rekha P, Morris A, Lynch J, Acharya U. Bacterial vaginosis and past chlamydial infection are strongly and independently associated with tubal infertility but do not affect in vitro fertilization success rates. Report.
 75. Mirmonsef P, Krass L, Landay A, Spear GT. The Role of Bacterial Vaginosis and Trichomonas in HIV Transmission Across The Female Genital Tract. 2012. Report.
 76. Atashili J, Poole C, Ndumbe PM, Adimora AA, Smith JS. Bacterial vaginosis and HIV acquisition: A meta-analysis of published studies. *AIDS*. 31. Juli 2008;22(12):1493–501. doi:10.1097/QAD.0b013e3283021a37 PubMed PMID: 18614873.
 77. Romero R, Hassan SS, Gajer P, Tarca AL, Fadrosh DW, Nikita L, u. a. The composition and stability of the vaginal microbiota of normal pregnant women is different from that of non-pregnant women. *Microbiome*. 3. Februar 2014;2(1). doi:10.1186/2049-2618-2-4 PubMed PMID: 24484853.
 78. Spear GT, French AL, Gilbert D, Zariffard MR, Mirmonsef P, Sullivan TH, u. a. Human α -amylase present in lower-genital-tract mucosal fluid processes glycogen to support vaginal colonization by *Lactobacillus*. *Journal of Infectious Diseases*. 1. Oktober 2014;210(7):1019–28. doi:10.1093/infdis/jiu231 PubMed PMID: 24737800.
 79. Brooks JP, Edwards DJ, Blithe DL, Fettweis JM, Serrano MG, Sheth NU, u. a. Effects of combined oral contraceptives, depot medroxyprogesterone acetate and the levonorgestrel-releasing intrauterine system on the vaginal microbiome. *Contraception*. 1. April 2017;95(4):405–13. doi:10.1016/j.contraception.2016.11.006 PubMed PMID: 27913230.
 80. DiGiulio DB, Callahan BJ, McMurdie PJ, Costello EK, Lyell DJ, Robaczewska A, u. a. Temporal and spatial variation of the human microbiota during pregnancy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1. September 2015;112(35):11060–5. doi:10.1073/pnas.1502875112 PubMed PMID: 26283357.
 81. Pereira MP, Jones S, Costin JM. Association of Polycystic Ovarian Syndrome (PCOS) With Vaginal Microbiome Dysbiosis: A Scoping Review. *Cureus*. 18. Juni 2024. doi:10.7759/cureus.62611
 82. Karvaly G, Kovács K, Gyarmatig M, Gerszi D, Nagy S, Jalal DA, u. a. Reference data on estrogen metabolome in healthy pregnancy. *Mol Cell Probes*. 1. April 2024;74:101953. doi:10.1016/J.MCP.2024.101953 PubMed PMID: 38432490.
 83. Ingram K, Eko EN, Nunziato J, Ahrens M, Howell B. Impact of obesity on the perinatal vaginal environment and bacterial microbiome: effects on birth outcomes. *J Med Microbiol*. 2024;73(8). doi:10.1099/jmm.0.001874 PubMed PMID: 39171766.
 84. Garg A, Ellis LB, Love RL, Grewal K, Bowden S, Bennett PR, u. a. Vaginal microbiome in obesity and its impact on reproduction. *Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology*. Bailliere Tindall Ltd; 2023. doi:10.1016/j.bpobgyn.2023.102365 PubMed PMID: 37399714.
 85. Brookheart RT, Lewis WG, Peipert JF, Lewis AL, Allsworth JE. Association between obesity and bacterial vaginosis as assessed by Nugent score. *Am J Obstet*

- Gynecol. 1. Mai 2019;220(5):476.e1-476.e11. doi:10.1016/j.ajog.2019.01.229 PubMed PMID: 30707966.
86. Raglan O, MacIntyre DA, Mitra A, Lee YS, Smith A, Assi N, u. a. The association between obesity and weight loss after bariatric surgery on the vaginal microbiota. *Microbiome*. 1. Dezember 2021;9(1). doi:10.1186/s40168-021-01011-2 PubMed PMID: 34049596.
 87. Kosinska-Kaczynska K, Zgliczynska M, Krawczyk D, Piatkowska M, Balabas A, Czarnowski P, u. a. Analysis of the microbiota of pregnant women in relation to weight gain during pregnancy – a pilot study. *Front Cell Infect Microbiol*. 2025;15. doi:10.3389/fcimb.2025.1655581 PubMed PMID: 40951306.
 88. Bayar E, Bennett PR, Chan D, Sykes L, Macintyre DA. The pregnancy microbiome and preterm birth [Internet]. doi:10.1007/s00281-020-00817-w/Published
 89. Huang Y, Li D, Cai W, Zhu H, Shane MI, Liao C, u. a. Distribution of Vaginal and Gut Microbiome in Advanced Maternal Age. *Front Cell Infect Microbiol*. 27. Mai 2022;12. doi:10.3389/fcimb.2022.819802 PubMed PMID: 35694547.
 90. Romero R, Theis KR, Gomez-Lopez N, Winters AD, Panzer JJ, Lin H, u. a. The Vaginal Microbiota of Pregnant Women Varies with Gestational Age, Maternal Age, and Parity. *Microbiol Spectr*. 17. August 2023;11(4). doi:10.1128/spectrum.03429-22 PubMed PMID: 37486223.
 91. Xie Y, Wang Q, Li D, Jia F, Chang F, Zhang Z, u. a. Role of age in mediating the association between the vaginal microbiota and preterm birth. *mSystems*. 17. Juni 2025;10(6). doi:10.1128/msystems.00149-25 PubMed PMID: 40391892.
 92. Petry CJ, Hughes IA, Ong KK. Increased basal insulin sensitivity in late pregnancy in women carrying a male fetus: a cohort study. *Biol Sex Differ*. 1. Dezember 2022;13(1). doi:10.1186/s13293-022-00429-z PubMed PMID: 35509032.
 93. Enninga EAL, Nevala WK, Creedon DJ, Markovic SN, Holtan SG. Fetal Sex-Based Differences in Maternal Hormones, Angiogenic Factors, and Immune Mediators During Pregnancy and the Postpartum Period. *American Journal of Reproductive Immunology*. 1. März 2015;73(3):251–62. doi:10.1111/aji.12303 PubMed PMID: 25091957.
 94. Toriola AT, Vääräsmäki M, Lehtinen M, Zeleniuch-Jacquotte A, Lundin E, Rodgers KG, u. a. Determinants of maternal sex steroids during the first half of pregnancy. *Obstetrics and Gynecology*. November 2011;118(5):1029–36. doi:10.1097/AOG.0b013e3182342b7f PubMed PMID: 22015870.
 95. Kundu S, Correia GDS, Lee YS, Ng S, Sykes L, Chan D, u. a. Secretor status is a modifier of vaginal microbiota-associated preterm birth risk. *Microb Genom*. 1. Dezember 2024;10(12). doi:10.1099/mgen.0.001323 PubMed PMID: 39630497.
 96. Jiang S, Qin J, Shi L, Feng J, Mo J, Su W, u. a. Association among Gestational Weight Gain, Fucosylated Human Milk Oligosaccharides, and Breast Milk Microbiota—An Evidence in Healthy Mothers from Northwest China. *J Agric Food Chem*. 13. November 2024;72(45):25135–45. doi:10.1021/acs.jafc.4c07050 PubMed PMID: 39476856.
 97. Liu B, Xu G, Sun Y, Du Y, Gao R, Snetselaar LG, u. a. Association between maternal pre-pregnancy obesity and preterm birth according to maternal age and race or ethnicity: a population-based study. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 1. September 2019;7(9):707–14. doi:10.1016/S2213-8587(19)30193-7 PubMed PMID: 31395506.
 98. Manuck TA. Racial and ethnic differences in preterm birth: A complex, multifactorial problem. *Seminars in Perinatology*. W.B. Saunders; 2017. S. 511–8. doi:10.1053/j.semperi.2017.08.010 PubMed PMID: 28941962.

99. Prince AL, Antony KM, Chu DM, Aagaard KM. The microbiome, parturition, and timing of birth: More questions than answers. *J Reprod Immunol.* 2014;104–105(C):12–9. doi:10.1016/j.jri.2014.03.006 PubMed PMID: 24793619.
100. Austria S. Demographie 2024 STATreport Strukturen und Trends.
101. Jantscher-Krenn E, von Schirnding L, Trötz Müller M, Köfeler H, Kurtovic U, Fluhr H, u. a. Human Milk Oligosaccharides Are Present in Amniotic Fluid and Show Specific Patterns Dependent on Gestational Age. *Nutrients.* 1. Mai 2022;14(10). doi:10.3390/nu14102065 PubMed PMID: 35631205.
102. Lazarini T, Tonon KM, Araujo Filho HB de, Morais MB de. Bifidogenic Effect of 2'-Fucosyllactose (2'-FL) on the Gut Microbiome of Healthy Formula-Fed Infants: A Randomized Clinical Trial. *Nutrients.* 1. März 2025;17(6). doi:10.3390/nu17060973 PubMed PMID: 40290019.
103. Allen NG, Edupuganti L, Edwards DJ, Jimenez NR, Buck GA, Jefferson KK, u. a. The vaginal microbiome in women of reproductive age with healthy weight versus overweight/obesity. *Obesity.* 1. Jänner 2022;30(1):142–52. doi:10.1002/oby.23306 PubMed PMID: 34806323.
104. Molecular structure of nucleic acids.
105. Vaitiekunas P, Crane-Robinson C, Privalov PL. The energetic basis of the DNA double helix: A combined microcalorimetric approach. *Nucleic Acids Res.* 30. September 2015;43(17):8577–89. doi:10.1093/nar/gkv812 PubMed PMID: 26304541.
106. Neumann CJ, Mohammadzadeh R, Woh PY, Kobal T, Pausan MR, Shinde T, u. a. First-Year Dynamics of the Anaerobic Microbiome and Archaeome in Infants Oral and Gastrointestinal Systems [Internet]. 2024. Verfügbar unter: <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2024.07.24.604926> doi:10.1101/2024.07.24.604926
107. Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, Bokulich NA, Abnet CC, Al-Ghalith GA, u. a. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology.* Nature Publishing Group; 2019. S. 852–7. doi:10.1038/s41587-019-0209-9 PubMed PMID: 31341288.
108. R Core Team. *A Language and Environment for Statistical Computing.* R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2021.
109. www.aok.de.
110. Rasmussen KM Y AL. Weight Gain During Pregnancy: Reexamining the Guidelines. Institute of Medicine (US) and National Research Council (US) Committee to Reexamine IOM Pregnancy Weight Guidelines; 2009. PubMed PMID: 20669500.
111. Bode L, Jantscher-Krenn E. Structure-function relationships of human milk oligosaccharides. *Advances in Nutrition.* Mai 2012;3(3). doi:10.3945/an.111.001404 PubMed PMID: 22585916.
112. Menzel P, Vogel M, Austin S, Sprenger N, Grafe N, Hilbert C, u. a. Concentrations of oligosaccharides in human milk and child growth. *BMC Pediatr.* 1. Dezember 2021;21(1). doi:10.1186/s12887-021-02953-0 PubMed PMID: 34717578.
113. Azad MB, Robertson B, Atakora F, Becker AB, Subbarao P, Moraes TJ, u. a. Human Milk Oligosaccharide Concentrations Are Associated with Multiple Fixed and Modifiable Maternal Characteristics, Environmental Factors, and Feeding Practices. *Journal of Nutrition.* 1. November 2018;148(11):1733–42. doi:10.1093/jn/nxy175 PubMed PMID: 30247646.
114. Liu F, He S, Yan J, Yan S, Chen J, Lu Z, u. a. Longitudinal changes of human milk oligosaccharides, breastmilk microbiome and infant gut microbiome are associated

- with maternal characteristics. *Int J Food Sci Technol.* 1. Mai 2022;57(5):2793–807. doi:10.1111/ijfs.15324
115. Fricke SL. Korrelation maternalen humaner Milcholigosaccharide mit metabolischen Faktoren während der Schwangerschaft eingereicht von. Report.
 116. 015-025am_S2k_Praevention-Therapie_Fruehgeburt_2023-01_1.
 117. Spear GT, French AL, Gilbert D, Zariffard MR, Mirmonsef P, Sullivan TH, u. a. Human α -amylase present in lower-genital-tract mucosal fluid processes glycogen to support vaginal colonization by *Lactobacillus*. *Journal of Infectious Diseases.* 1. Oktober 2014;210(7):1019–28. doi:10.1093/infdis/jiu231 PubMed PMID: 24737800.
 118. Garg A, Ellis LB, Love RL, Grewal K, Bowden S, Bennett PR, u. a. Vaginal microbiome in obesity and its impact on reproduction. *Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology.* Bailliere Tindall Ltd; 2023. doi:10.1016/j.bpobgyn.2023.102365 PubMed PMID: 37399714.
 119. Saben JL, Abraham A, Bode L, Sims CR, Andres A. Third-trimester glucose homeostasis in healthy women is differentially associated with human milk oligosaccharide composition at 2 months postpartum by secretor phenotype. *Nutrients.* 1. August 2020;12(8):1–15. doi:10.3390/nu12082209 PubMed PMID: 32722157.
 120. Navarro S, Abla H, Delgado B, Colmer-Hamood JA, Ventolini G, Hamood AN. Glycogen availability and pH variation in a medium simulating vaginal fluid influence the growth of vaginal *Lactobacillus* species and *Gardnerella vaginalis*. *BMC Microbiol.* 1. Dezember 2023;23(1). doi:10.1186/s12866-023-02916-8 PubMed PMID: 37442975.
 121. Huertas-Díaz L, Gezer ME, Marietou A, Hosek J, Thams L, Dalgaard LB, u. a. *Megasphaera* contributes to lactate-driven valerate production in the human gut. *Microbiome.* 21. Oktober 2025;13(1):210. doi:10.1186/s40168-025-02207-6 PubMed PMID: 41121394.
 122. Sudarma V, Sunardi D, Marzuki NS, Munasir Z, Asmarinah, Hidayat A, u. a. Human Milk Oligosaccharide Profiles and the Secretor and Lewis Gene Status of Indonesian Lactating Mothers. *Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr.* 2023;26(5):266–76. doi:10.5223/pghn.2023.26.5.266
 123. Subramaniam A, Kumar R, Cliver SP, Zhi D, Szychowski JM, Abramovici A, u. a. Vaginal Microbiota in Pregnancy: Evaluation Based on Vaginal Flora, Birth Outcome, and Race. *Am J Perinatol.* 1. März 2016;33(4):401–8. doi:10.1055/s-0035-1565919 PubMed PMID: 26479170.

Anhang

Prompt: Konkrete Frage: „Das ist mein Material und Methoden-Teil der Diplomarbeit (hochgeladenes Zitat des Material- und Methodenteils). Welche potenziellen Bias gab es und welche Maßnahmen zur Vermeidung wurden getroffen?“ KI-generierte Antwort auf die Frage: „Selektionsbias minimiert (Studienpopulation kontrolliert definiert). Ihr habt eine sehr streng definierte Kohorte verwendet. Klare Einschlusskriterien: Alter 18-45 Jahre, Einlingsschwangerschaft, Termingeburt, Geburt eines gesunden Kindes, schriftliche Einwilligung. Klare Ausschlusskriterien: Ausgeschlossen wurden alle Faktoren, die das vaginale Mikrobiom stark beeinflussen können:

bakterielle oder fungale Infektionen, Antibiotika / Probiotika, Medikamente, Diabetes, Schwangerschaftskomplikationen (Präeklampsie, HELLP etc.), Rauchen Drogenabusus, HIV/HCV, fetale Anomalien, Multiparität; Ziel: Eliminierung wichtiger Confounder des Mikrobioms; verhindert: systematischen biologischen Bias. Longitudinales Design (interindividueller Bias reduziert); Jede Frau wurde 4x während der Schwangerschaft untersucht: 12-14 SSW, 20-24 SSW, 25-28 SSW, 34-39 SSW, Jede Teilnehmerin dient als ihre eigene Kontrolle, reduziert interindividuelle Unterschiede im Mikrobiom massiv. Standardisierte Probenentnahme: gleiche Probenart: vaginale Abstriche, sterile FLOQ-Swabs, festgelegte Schwangerschaftszeitpunkte, gleiche Klinik, verhindert Sampling-Bias / Messbias durch unterschiedliche Entnahmetechnik. Standardisierte Lagerung (Vermeidung von Degradations-Bias), sofortige Lagerung bei -80°C , identische Lagerbedingungen für alle Proben, Analyse in gleichem Zeitraum (Mai-Juni 2024), verhindert mikrobiellen Wachstums- oder Abbau-Bias, Anonymisierung (Observer-Bias reduziert) Du hast ergänzt: Daten waren anonymisiert (nur ID-Nummern), verhindert bewusste oder unbewusste Beeinflussung der Auswertung, Labor-Kontrollen gegen Kontamination, Mehrere sehr wichtige Punkte: Negativkontrolle bei jeder Extraktion (NC), sterile Reaktionsgefäße, getrennte Dokumentation (digital + analog), mechanische + enzymatische Lyse standardisiert, identisches Kit (QIAamp DNA Mini Kit), verhindert experimentellen Bias / Kontaminationsbias, Technische Replikate (Messbias reduziert), PCR in Triplikaten, reduziert Zufallsfehler & Amplifikationsbias, Sequenzierungs-Bias minimiert, DNA-Normalisierung (SequalPrep plate), gleiche

Sequenzierungsplattform (Illumina MiSeq), gleiche Primer (V4-Region, 16S), Gelschnitt-Purifikation, verhindert unterschiedliche Sequenziertiefe und Library-Bias, Standardisierte Bioinformatik, gleiche Pipeline (QIIME2 + R Microbiome Explorer), feste Diversitätsmaße (Chao, Simpson), verhindert Analyse-Bias, Confounder-Erfassung (statistische Kontrolle möglich). Ihr habt umfangreiche Metadaten erhoben: BMI, Gewichtszunahme, Alter, Ethnie, Supplemente, Medikamente, Sekretorstatus, Geburtsmodus, Kindliche Parameter, ermöglicht Adjustierung → reduziert Confounding-Bias, ChatGPT 5.3, OpenAI, 18.02.2026; <https://chatgpt.com>)

Prompt: Konkrete Frage: „Welchen statistischen Test verwende ich, wenn ich den BMI und die Gewichtszunahme zweier unabhängige Gruppen unterschiedlicher Größe (Gruppe 1 = 35, Gruppe 2 = 13) vergleichen will? Die mit Excel ermittelten Mittelwerte + Standardabweichungen sind: Sekretor-Status maternaler BMI vor der Schwangerschaft maternaler BMI bei Geburt durchschnittliche Gewichtszunahme in der Schwangerschaft positiv (n = 35) 23,2 ± 4,6 (Standardabweichung: 4,6) 28,5 ± 4,9 13,8 kg ± 5,7 negativ (n = 13) 26,0 ± 8,4 29,9 ± 7,9 11,1 kg ± 4,0 Wie sind die Formeln, die ich zum Ausrechnen des p-Werts brauche?“ Konkrete Antwort: „Du möchtest metrische Variablen (BMI, Gewichtszunahme) zwischen zwei unabhängigen Gruppen unterschiedlicher Größe (n₁=35, n₂=13) vergleichen. Dafür gibt es – je nach Verteilung – zwei Standardtests: Parametrischer Test (wenn Daten ~ normalverteilt): Welch-t-Test (empfohlen!) Dieser ist ideal bei: unabhängigen Gruppen, unterschiedlicher Gruppengröße, möglicherweise ungleichen Varianzen, Genau deine Situation. Teststatistik (Welch-t)

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}}$$

\bar{x}_1, \bar{x}_2 = Mittelwerte, s_1, s_2 = Standardabweichungen, n_1, n_2 = Gruppengrößen
Freiheitsgrade (Welch-Satterthwaite)

$$df = \frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}\right)^2}{\frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1}\right)^2}{n_1 - 1} + \frac{\left(\frac{s_2^2}{n_2}\right)^2}{n_2 - 1}}$$

Mit t und df bestimmst du den p -Wert aus der t -Verteilung.

Beispiel: BMI vor Schwangerschaft Gruppe positiv: $n_1 = 35$, $\bar{x}_1 = 23,2$, $s_1 = 4,6$ Gruppe negativ: $n_2 = 13$, $\bar{x}_2 = 26,0$, $s_2 = 8,4$

Schritt 1: Standardfehler

$$SE = \sqrt{\frac{4.6^2}{35} + \frac{8.4^2}{13}} = \sqrt{\frac{21.16}{35} + \frac{70.56}{13}} = \sqrt{0.604 + 5.427} = \sqrt{6.031} \approx 2.456$$

Schritt 2: t -Wert

$$t = \frac{23.2 - 26.0}{2.456} \approx -1.14$$

Schritt 3: df berechnen \rightarrow p -Wert aus Tabelle/Software

Der p -Wert wäre hier nicht signifikant.

2) Nicht-parametrisch (wenn keine Normalverteilung) Mann-Whitney-U-Test, Wenn: kleine Stichprobe, starke Ausreißer, schiefe Verteilung, Dafür brauchst du Rohdaten – Mittelwerte + SD reichen NICHT.

Wichtig für deine Arbeit: Du hast **drei Variablen**: BMI vor Schwangerschaft, BMI bei Geburt, Gewichtszunahme, Für jede Variable separat testen.

In Excel: Excel-Funktion: =T.TEST(array1, array2, 2, 3) 2 = zweiseitig, 3 = ungleiche Varianzen (Welch)

Kurzfasit: Dein Fall: metrische Daten, unabhängige Gruppen, ungleiche Größe, Welch-t-Test.“

ChatGPT 5.3, OpenAI, 02.03.2026; <https://chatgpt.com>

QIAamp[®] DNA Mini Kit

The QIAamp DNA Mini Kit (cat. nos. 51304 and 51306) can be stored at room temperature (15–25°C) for up to 12 months.

Further information

- *QIAamp DNA Mini and Blood Mini Handbook*: www.qiagen.com/HB-0329
- Safety Data Sheets: www.qiagen.com/safety
- Technical assistance: support.qiagen.com

Notes before starting

- Perform all centrifugation steps at room temperature (15–25°C).
- Use carrier DNA if the sample contains <10,000 genome equivalents. Refer to the handbook for required equipment and procedure.
- If a precipitate has formed in Buffer ATL or Buffer AL, dissolve by incubating at 56°C.
- Add ethanol to Buffer AW1 and Buffer AW2 concentrates, as indicated on the bottle.
- Equilibrate samples to room temperature (15–25°C).
- Heat two water baths or heating blocks: one to 56°C for use in step 1 and one to 70°C for use in step 3.

Refer to the handbook for protocols for swabs, dried blood spots, cultured cells, fixed tissue, bacteria, yeast or other material.

-
1. Cut tissue (≤ 25 mg) into small pieces and place in a 1.5 ml microcentrifuge tube. Add 180 μ l Buffer ATL and 20 μ l Proteinase K, mix by vortexing and incubate at 56°C until completely lysed (1–3 h). Vortex occasionally during incubation.
 2. Add 200 μ l Buffer AL. Mix thoroughly by vortexing for 15 s.
 3. Incubate at 70°C for 10 min. Briefly centrifuge the tube to remove drops from the lid.
 4. Add 200 μ l ethanol (96–100%). Vortex for 15 s. Briefly centrifuge the tube to remove drops from the lid.
 5. Pipet the mixture onto the QIAamp Mini spin column (in a 2 ml collection tube). Centrifuge at 6000 \times g (8000 rpm) for 1 min. Discard the flow-through and collection tube.
 6. Place the QIAamp Mini spin column in a new 2 ml collection tube and add 500 μ l Buffer AW1. Centrifuge at 6000 \times g (8000 rpm) for 1 min. Discard the flow-through and collection tube.
 7. Place the QIAamp Mini spin column in a new 2 ml collection tube and add 500 μ l Buffer AW2. Centrifuge at full speed (20,000 \times g; 14,000 rpm) for 3 min. Discard the flow-through and collection tube.
 8. **Recommended:** Place the QIAamp Mini spin column in a new 2 ml collection tube (not provided) and centrifuge at full speed for 1 min. This eliminates the chance of possible Buffer AW2 carryover.
 9. Place the QIAamp Mini spin column in a new 1.5 ml microcentrifuge tube (not provided), add 200 μ l Buffer AE or distilled water and incubate at room temperature for 1 min. Centrifuge at 6000 \times g (8000 rpm) for 1 min to elute the DNA.
 10. **Optional:** Repeat step 10 for increased DNA yield with a further 200 μ l Buffer AE or distilled water.



Scan QR code for handbook.

For up-to-date licensing information and product-specific disclaimers, see the respective QIAGEN kit handbook or user manual.

Trademarks: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp® (QIAGEN Group). 1113198 04/2018 HB-2530-001 © 2018 QIAGEN, all rights reserved.

Ordering www.qiagen.com/shop | Technical Support support.qiagen.com | Website www.qiagen.com

Ergebnisse der Fisher's Exact Tests aus RStudio:

Fisher's Exact Test for Count Data

data: matrix_SecFrueh
p-value = 0.5654
alternative hypothesis: true odds ratio is not equal to 1
95 percent confidence interval:
0.1790203 42.2141166
sample estimates:
odds ratio
2.745516

Fisher's Exact Test for Count Data

data: matrix_1_50
p-value = 0.2836
alternative hypothesis: true odds ratio is not equal to 1
95 percent confidence interval:
0.07361059 2.45195002
sample estimates:
odds ratio
0.4417145

Fisher's Exact Test for Count Data

data: matrix_2_50
p-value = 0.7172
alternative hypothesis: true odds ratio is not equal to 1
95 percent confidence interval:
0.3101571 11.5011690
sample estimates:
odds ratio
1.648855

Fisher's Exact Test for Count Data

data: matrix_3_50
p-value = 0.721
alternative hypothesis: true odds ratio is not equal to 1
95 percent confidence interval:
0.137563 4.546788
sample estimates:
odds ratio
0.7655001

Fisher's Exact Test for Count Data

data: matrix_4_50
p-value = 1
alternative hypothesis: true odds ratio is not equal to 1
95 percent confidence interval:
0.1221506 6.5206038
sample estimates:
odds ratio
0.8366939

Fisher's Exact Test for Count Data

data: matrix_1_80
p-value = 0.4949
alternative hypothesis: true odds ratio is not equal to 1
95 percent confidence interval:
0.1173442 2.5737627
sample estimates:
odds ratio
0.552946

Fisher's Exact Test for Count Data

data: matrix_2_80
p-value = 0.7533
alternative hypothesis: true odds ratio is not equal to 1
95 percent confidence interval:
0.1878723 3.5575346
sample estimates:
odds ratio
0.8039416

Fisher's Exact Test for Count Data

data: matrix_3_80
p-value = 0.5297
alternative hypothesis: true odds ratio is not equal to 1
95 percent confidence interval:
0.1512217 2.6689198
sample estimates:
odds ratio
0.6351221

Fisher's Exact Test for Count Data

data: matrix_4_80
p-value = 1
alternative hypothesis: true odds ratio is not equal to 1
95 percent confidence interval:
0.2282488 4.1318873
sample estimates:
odds ratio
0.9484981