

## SUMMARY IN GERMAN (ZUSAMMENFASSUNG)

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, durch zwei verschiedene Vorgehensweisen die immunologischen Effekte des probiotischen Stammes *Enterococcus faecium* SF68 (NCIMB 10415) auf Ferkel einzuschätzen.

Zunächst wurde ein *in vivo* Modell genutzt, bei dem die Ferkel in zwei Gruppen – eine probiotische (43 Ferkel, die als Präparat den Stamm *E. faecium* SF68 verabreicht bekamen) und eine Kontrollgruppe (46 Ferkel ohne probiotisches Präparat) – eingeteilt wurden. Beide Gruppen wurden mit dem Stamm *Salmonella typhimurium* DT104 infiziert. Zufällig ausgewählte Ferkel jeden Wurfs wurden 3, 24 und 72 Stunden sowie 28 Tage *post infectionem* (p. i.) getötet. PBMC, CD4+-Lymphocyten aus der Milz und einzelnen Peyer'sche Plaques (PP), Lymphocyten aus dem distalen PP und CD8+-Lymphocyten aus den intraepithelialen Lymphocyten (IEL) des Jejunums wurden durch Einsatz verschiedener Protokolle und des Magnetic Cell Sorting Prinzips (MACS) isoliert.

Durchflußzytometrische Bestimmung der CD8+-Lymphocyten im IEL aus Ferkeln beider Versuchsgruppen ergab im Einklang mit früheren Untersuchungen eine signifikante Reduktion in der probiotischen Gruppe 24 Stunden nach Infektion mit Salmonellen. Die relative Anzahl von CD4+-Zellen in den einzelnen PP und der Milz war tendenziell höher in Ferkeln der probiotischen Gruppe. Aus allen isolierten Zellen wurde RNA gewonnen und komplementäre DNA (cDNA) hergestellt. Mit der cDNA aus den Proben der PBMC und aus dem distalen PP wurde eine *real-time* PCR durchgeführt, um die Genexpression verschiedener Cytokine/Chemokine und Rezeptoren zu überprüfen. Unsere Ergebnisse zeigten eine signifikante Hochregulation der Gene für TLR2, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-8 in den PBMC und IL-1 $\alpha$  in den distalen PP der Ferkel aus der probiotischen Gruppe 71 Stunden nach Infektion mit Salmonellen. Obwohl die Entzündungsreaktion nicht vermindert werden konnte, wird hier erstmals die Hochregulation der antientzündlichen Gene TLR-9, CD9 und TGF- $\beta$  durch den probiotischen Stamm *E. faecium* SF68 gezeigt.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde ein *in-vitro* Modell genutzt, um die immunologischen Auswirkungen des Stammes *E. faecium* SF68 auf die Vermehrung des Transmissiblen Gastroenteritis-Virus (TGEV) in Epithelzellen zu untersuchen. Diese Arbeit ist die erste, die den Effekt eines Probiotikums gegen TGEV erforscht. Da Probiotika hauptsächlich im Darm wirken, also dort, wo sich TGEV-Infektionen etablieren, ist der

Einsatz einer adäquaten intestinalen Zelllinie porcinen Ursprungs entscheidend. Daher wurden zwei früher isolierte Zelllinien (Typ I- und Typ II-Zellen) aus dem Epithel von Ferkeln durch Einsatz morphologischer (Licht- und Transmissionselektronenmikroskop, FACS), histochemischer (FACS und Fluoreszenzmikroskopie) und molekularer (RT-PCR) Methoden sowie hinsichtlich ihrer Sensitivität gegenüber TGEV charakterisiert. Die erzielten Ergebnisse lassen vermuten, dass beide Zelllinien epithelialer Natur sind und nur die Typ II-Zellen mit TGEV infiziert werden können. Typ II-Zellen produzierten höhere Virustiter als ST-Zellen, die das für Untersuchungen zu TGEV etablierte Zelllinien-Modell darstellen, aber ursprünglich nicht aus dem Darm stammen. Folglich können Typ II-Zellen künftig als adäquate porcine Epithelzelllinie für *in-vitro* Untersuchungen von TGEV genutzt werden.

Um den antiviralen Effekt des Probiotikums auf TGEV zu untersuchen, wurden Monolayer der Typ II-Zellen vor der Infektion mit dem Virus mit dem Stamm *E. faecium* SF68 vorbehandelt. Anschließend wurde der Anstieg überlebender Zellen mittels MTT-Test ermittelt und mit den Ergebnissen der nicht vorbehandelten Kontroll-Monolayern verglichen. Zusätzlich wurden die Virustiter der probiotisch vorbehandelten und nicht vorbehandelten infizierten Monolayer der Typ II-Zellen durch Einsatz der TCID<sub>50</sub> Titrationmethode von ST-Zellen bestimmt. Die Ergebnisse zeigen einen Abfall der viralen Aktivität und der Virustiter als Resultat der Vorbehandlung mit dem Stamm *E. faecium* SF68. Um die molekularen Ergebnisse der Schutzeffekt vom Probiotika gegenüber TGEV Infektion zu bestätigen, wurde eine *real-time* PCR-Analyse durchgeführt, um den Grad der Genexpression von IL-6, IL-8 und IFN- $\gamma$  zwischen den Typ II-Kontrollzellen, probiotisch vorbehandelten Zellen, mit TGEV infizierten Zellen und Zellen, die sowohl probiotisch vorbehandelt als auch mit TGEV infiziert wurden, zu vergleichen. Die Ergebnisse zeigen, dass durch die virale Infektion die Expression der oben erwähnten Gene verglichen mit der Expression in der probiotisch vorbehandelten Gruppe stark signifikant hochreguliert werde. Die virus-induzierte Hochregulation der oben erwähnten Gene für Entzündungsfaktoren ließ sich durch Vorbehandlung mit dem Stamm *E. faecium* SF68 reduzieren. Die Ergebnisse deuten drauf hin, dass die nützlichen Effekts des Probiotikums in einer Reduktion der Entzündungszytokinen liegt, die durch infektiöse Agentien hervorgerufen werden.