

**Einfluss des probiotischen Bakteriums *Bacillus toyonensis*
(ToyoCerin®) auf die intestinale Immunantwort beim Ferkel
während der Phase des Absetzens**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Sara Altmeyer
aus Saarbrücken

2016

Diese Arbeit wurde unter der Leitung von Prof. Dr. Jürgen Zentek von Mai 2012 bis Juli 2016 im Institut für Tierernährung des Fachbereichs Veterinärmedizin der FU Berlin durchgeführt.

Erstgutachter: **Prof. Dr. Jürgen Zentek**
Fachbereich Veterinärmedizin
Institut für Tierernährung
Königin-Luise-Str. 49
14195 Berlin
Tel.: +49 30 838 52256
E-Mail: juergen.zentek@fu-berlin.de

Zweitgutachter: **Prof. Dr. Tina Romeis**
Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
Institut für Biologie
Königin-Luise-Str. 12-16
14195 Berlin
Tel.: +49 (0) 30 838 53123
E-Mail: tina.romeis@fu-berlin.de

Disputation am: 07. Oktober 2016

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Literaturübersicht	3
2.1	Aufbau des intestinalen Immunsystems beim Schwein	3
2.1.1	Intraepitheliale Lymphozyten (IEL)	4
2.1.2	NKG2D-Rezeptor	7
2.1.3	Cytokine	8
2.2	Intestinale Barriere	9
2.2.1	Nahrungsmittelallergien.....	10
2.3	Die Entwicklung der intestinalen Mikrobiota beim Ferkel	11
2.4	Die Phase des Absetzens und die Bedeutung für die Tiergesundheit.....	12
2.4.1	Morphologische und physiologische Veränderungen im Dünndarm während der Absetzphase	13
2.4.2	Durchfallerkrankungen nach dem Absetzen	14
2.5	Futtermittelzusatzstoffe	15
2.6	Probiotika als Futtermittelzusatzstoffe	17
2.6.1	Definition	17
2.6.2	Wirkmechanismen von Probiotika	18
2.6.3	Anforderungen an Probiotika als Futtermittelzusatzstoffe	23
2.6.4	Probiotika in der Tierernährung	23
2.6.5	Bazillussporen als probiotische Futtermittelzusatzstoffe	25
2.6.6	<i>Bacillus toyonensis</i>	26
2.7	Zielsetzung der Arbeit	29
3	Material und Methoden.....	30
3.1	Tierversuch	30
3.1.1	Haltung, Fütterung und Probennahme der Tiere in der Probiotikastudie.....	30
3.1.2	Haltung und Fütterung der Ferkel der Antikörper-Aktivierungsstudie	31
3.1.3	Versuchsfutter und Fütterung	31
3.1.4	Lebendmassezunahme	33
3.1.5	Keimzahlbestimmung	33
3.2	Elektrophysiologische Methoden	34
3.2.1	HRP-Durchlässigkeit des jejunalen Epithels	34
3.3	Immunologische Methoden	36

3.3.1	Isolierung intraepithelialer Lymphozyten aus jejunalem Epithel	36
3.3.2	Isolierung von PBMCs aus kardialem Blut	37
3.3.3	Durchflusszytometrie	38
3.3.4	Magnetic activated cell sorting (MACS)	40
3.3.5	Inkubation isolierter Zellpopulationen mit anti-CD3	41
3.3.6	Sojaprotein Antikörper-Titerbestimmung	42
3.4	Genexpressionsanalysen mittels quantitativer Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR)	43
3.4.1	RNA Extraktion	44
3.4.2	Quantitative Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR) ...	44
3.4.3	cDNA-Synthese und qPCR	45
3.5	Histologische Methoden	49
3.5.1	Histologische Aufarbeitung der Darmgewebeprobe	49
3.5.2	Immunhistochemischer Nachweis CD3 positiver Zellen im jejunalen Epithel ...	50
3.5.3	Dokumentation und Auswertung	52
3.6	Statistische Auswertungen	55
4	Ergebnisse	56
4.1	Lebendmasse, Lebendmassezunahme und Gesundheitszustand	56
4.2	Gehalt koloniebildender Einheiten (KBE) von <i>Bacillus toyonensis</i> in Fäzesproben	57
4.3	Integrität der intestinalen Darmschranke	58
4.3.1	Meerrettichperoxidase-Permeabilität des jejunalen Epithels	58
4.3.2	Sojaprotein-Antikörper Entwicklung im Blutserum	59
4.4	Verteilung verschiedener intraepithelialer Lymphozyten im Darmepithel	60
4.5	Genexpressionsanalyse von Stressfaktoren, Cytokinen und dem Natürlichen Killerzellen Rezeptor NKG2D	63
4.5.1	Expression von Stressfaktoren auf jejunalem Epithel	63
4.5.2	Expression des Natürlichen Killerzellen Rezeptors NKG2D auf jejunalem Epithel	63
4.5.3	Expression von Cytokinen auf jejunalem Epithel	63
4.6	NKG2D Genexpressionsanalysen	66
4.6.1	NKG2D Expression auf isolierten IEL Populationen	66
4.6.2	Vergleich der NKG2D Expression auf isolierten T-Zellen nach Inkubation mit anti-CD5 (9G12) bzw. anti-CD3 Antikörpern (PPT3)	67
4.6.3	Korrelation der Expression von NKG2D, Stressfaktoren und Cytokinen mit den Zellzahlen verschiedener IEL Populationen im jejunalen Epithel	70

4.6.4	Morphologische Veränderungen im jejunalen Darmepithel.....	73
5	Diskussion.....	75
5.1	Hintergrund und Ziel der Arbeit	75
5.2	Versuchsteil I: Der Einfluss des probiotischen <i>B. toyonensis</i> auf die Integrität und Morphologie des Darmepithels und die intestinale Immunantwort beim Ferkel.....	76
5.2.1	Lebendmasseentwicklung	76
5.2.2	Veränderungen der Integrität der intestinalen Barriere	77
5.2.3	Mukosale Immunantwort	82
5.2.4	Morphologische Veränderungen unter dem Einfluss von <i>B. toyonensis</i>	88
5.3	Versuchsteil II: Die Expression des Natürlichen Killerzellen Rezeptors NKG2D auf verschiedenen intraepithelialen Lymphozytenpopulationen und seine mögliche Verbindung zum adaptiven Immunsystem.....	90
5.3.1	Expressionsverhalten des NKG2D Zellrezeptors auf verschiedenen IEL Populationen	90
5.3.2	Aktivierung des TCR/CD3 Komplexes	93
5.4	Schlussfolgerung und Ausblick.....	96
6	Zusammenfassung.....	98
7	Summary.....	100
8	Literaturverzeichnis	102
	Publikationsverzeichnis	123
	Danksagung	124
	Lebenslauf.....	125
	Eidesstattliche Erklärung	127

Abkürzungsverzeichnis

®	Eingetragenes Warenzeichen
ANOVA	Varianzanalyse (analysis of variance)
a. p.	Ante partum, vor der Geburt
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	Cluster of differentiation
cDNA	Komplementäre DNA
C.I.	Konfidenzintervall
CTL	Zytotoxische T-Zellen
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
DNase	Desoxyribonuklease
EC	Enterozyten
EFSA	Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit
ELISA	Enzymimmunoassay (enzyme linked immunosorbent assay)
ERK	Extracellular-signal-regulated kinase
EtOH	Ethanol
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FITC	Fluoreszeinisothiozyanat
GALT	Darmassoziertes lymphatisches Gewebe (gut associated lymphoid tissue)
GrB	Granzyme
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution
HRP	Horseradish Peroxidase
IEL	Intraepitheliale Lymphozyten
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
KBE	Koloniebildende Einheit
MACS	Magnetic activated cell sorting
MHC	Major histocompatibility complex
MIC	MHC-Klasse-I verwandte Moleküle
N	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
p	Überschreitungswahrscheinlichkeit
PAMP	Pathogen-assoziierte molekulare Muster (pathogen-associated molecular pattern)
PBMC	Mononukleäre Zelle des peripheren Blutes (peripheral blood mononuclear cell)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
PE	Phycoerythrin
Pfn	Perforin
pH	Negativer dekadischer Logarithmus des Zahlenwerts der H ⁺ -Aktivität
p. p.	Post partum, nach der Geburt
PRR	Pattern recognition receptor
qPCR	Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion

RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
RNAse	Ribonuklease
Rpm	Rotations per minute, Umdrehungen pro Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
RT	Raumtemperatur
RT-qPCR	Quantitative Reverse-Transkriptase Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion
TCR	T-Zell-Rezeptor
U	Units, Enzymeinheit
ULBP	UL16 bindenden Proteine
$x g$	Erdbeschleunigung, $g = 9,81 \text{ m/s}^2$

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Oberflächenmarker für porcine Immunzellen	6
Tabelle 2: Futtermittelzusatzstoff-Kategorien (Verordnung (EG) Nr. 1831/2003, 2003).....	16
Tabelle 3: Gewünschte Eigenschaften probiotischer Mikroorganismen.....	23
Tabelle 4: Liste der gegenwärtig in der EU als Futtermittelzusatzstoffe zugelassenen Mikroorganismen (European Union Register of Feed Additives. Edition 224. Annex I, Stand: 19.07.2016)	24
Tabelle 5: Zusammensetzung des Saugferkelbeifutters der Probiotikastudie (Tag 14-28) ..	32
Tabelle 6: Zusammensetzung des Saugferkelbeifutters der Antikörper-Aktivierungsstudie (Tag 14-28).....	32
Tabelle 7: Zusammensetzung des Ferkelaufzuchtsfutters der Antikörper-Aktivierungsstudie	33
Tabelle 8: Zusammensetzung des für die Ussing-Kammer verwendeten modifizierten Krebs-Henseleit Puffers (pH = 7,4)	35
Tabelle 9: Für die HRP-Durchflussmessung verwendete Geräte und Chemikalien	36
Tabelle 10: Zusammensetzung der für die IEL und PBMC Extraktion verwendeten Medien und Puffer.....	37
Tabelle 11: Liste der für die Quantifizierung der IEL und PBMC verwendeten Antikörper ...	39
Tabelle 12: Für die durchflusszytometrischen Untersuchungen verwendete Geräte und Chemikalien.....	40
Tabelle 13: Für die magnetische Zellsortierung (MACS) verwendete Geräte und Chemikalien	41
Tabelle 14: Für die Bestimmung des Sojaprotein-Antikörpertiters verwendeten Geräte und Chemikalien.....	43
Tabelle 15: Reaktionsansätze für die <i>one-step</i> RT-qPCR.....	45
Tabelle 16: Reaktionsbedingungen für die <i>one-step</i> RT-qPCR	46
Tabelle 17: Reaktionsansätze für die cDNA-Synthese	46
Tabelle 18: Reaktionsansätze für die qPCR.....	46
Tabelle 19: Verwendete Primer für die qPCR und RT-qPCR.....	47
Tabelle 20: Geräte und Chemikalien für die RNA-Extraktion, Bestimmung der RNA-Konzentration, cDNA Synthese und PCR	47
Tabelle 21: Zusammensetzung der verwendeten Fixiermedien	49
Tabelle 22: Bestandteile der zur Desmaskierung verwendeten Zitronensäurelösung	51
Tabelle 23: Für die histologischen und immunhistologischen Arbeiten verwendete Geräte und Chemikalien.....	54

Tabelle 24: Mittlere Lebendmasse der Ferkel mit <i>B. toyonensis</i> supplementierter Diät zum Ende der einzelnen Versuchswochen [kg]	56
Tabelle 25: Mittlere wöchentliche Lebendmassezunahme der Ferkel mit <i>B. toyonensis</i> supplementierter Diät zum Ende der einzelnen Versuchswochen [g/Tag].....	57
Tabelle 26: Mittlerer Glycinin-Antikörpertiter im Blutserum der Versuchs- und Kontrollgruppe	59
Tabelle 27: Anteile verschiedener IEL im jejunalen Epithel von Ferkeln (mittels immunhistologischer Zählung CD3 positiver Zellen in absolute Zellzahlen konvertiert).....	62
Tabelle 28: Mittlere Genexpression der Stressfaktoren ULBP, MIC2 und des NKG2D-Rezeptors in jejunalen Epithelzellen	65
Tabelle 29: Mittlere Genexpression der pro-inflammatorischen Cytokine IL-1 β , IL-8 und des anti-inflammatorischen Cytokins IL-10 in jejunalen Epithelzellen	65
Tabelle 30: Relative Genexpression des NKG2D Rezeptors, pro- und anti-inflammatorischen Cytokinen und Stressfaktoren aus isolierten Lymphozytenpopulationen aus jejunalem Gewebe (IEL) nach Inkubation mit einem CD3 Antikörper (PPT3).	68
Tabelle 31: Genexpressionsanalyse des NKG2D Rezeptors, pro- und anti-inflammatorischen Cytokinen und Stressfaktoren aus isolierten Lymphozytenpopulationen aus mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) nach Inkubation mit einem CD3 Antikörper (PPT3). .	69
Tabelle 32: Korrelation der Expression von NKG2D und Stressfaktoren in jejunalem Gewebe mit der verschiedener Cytokine und der Zellzahl isolierter IEL Populationen innerhalb der Kontrollgruppe	71
Tabelle 33: Korrelation der Expression von NKG2D und Stressfaktoren in jejunalem Gewebe mit der verschiedener Cytokine und der Zellzahl isolierter IEL Populationen innerhalb der <i>B. toyonensis</i> Gruppe	72
Tabelle 34: Veränderungen unterschiedlicher morphologischer Parameter im jejunalen Darmepithel	74
Tabelle 35: Mittlere Anzahl der CD3+ Lymphozyten im jejunalen Darmepithel.....	74

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Aufbau einer Bazillusspore. Modifiziert nach (Paredes-Sabja <i>et al.</i> , 2011) und McKenney <i>et al.</i> (2013).	26
Abbildung 2: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus der Probiotikastudie.	31
Abbildung 3: Schematischer Aufbau einer Ussing-Kammer	35
Abbildung 4: Beispielhafte Darstellung der durchflusszytometrischen Streudiagramme.	39
Abbildung 5: Schematische Versuchsdarstellung des Antikörper-Inkubationsansatzes	42
Abbildung 6: A, Darstellung der Dünndarmschleimhaut und schematische Markierung der Bestimmung von Zottenlänge und Kryptentiefe am mittleren Jejunum eines 32 Tage alten Ferkels (LM, HE, 40x); ZS = Zottenspitze, ZB = Zottenbasis, K = Darmkrypte. B, Exemplarisches Beispiel	53
Abbildung 7: Wachstum von <i>B. toyonensis</i> in Fäzesproben von Ferkeln mit <i>B. toyonensis</i> supplementierter Diät, n = 5; p = Überschreitungswahrscheinlichkeit (*p ≤ 0,05; ANOVA, Tukey-HSD).	57
Abbildung 8: Mittlere jejunale Darmwandpermeabilität für Meerrettichperoxidase (HRP) bei Ferkeln mit <i>B. toyonensis</i> supplementierter Diät	58
Abbildung 9: Entwicklung der Sojaprotein-Antikörper in Serumproben	60
Abbildung 10: Mittlere RNA-Expression des NKG2D-Rezeptors in isolierten IEL Populationen	66
Abbildung 11: Zeitlicher Zusammenhang der intestinalen Barriere und der Häufigkeit verschiedener IELs innerhalb des jejunalen Epithels in der mit <i>B. toyonensis</i> supplementierten Gruppe	85

1 Einleitung

Die gastrointestinale Mikrobiota spielt bei der Entwicklung des gesamten Organismus eine entscheidende Rolle. Dabei trägt eine gesunde Mikrobiota auch bei landwirtschaftlichen Nutztieren zu deren Leistungsfähigkeit bei und unterstützt die Vorbeugung von Durchfallerkrankungen. Eine Futterumstellung während der Phase des Absetzens geht mit diversen Stressfaktoren einher. Dazu zählen der Transport der Tiere und die veränderten Haltungs- und Umweltbedingungen, die Aufstallung mit fremden Tieren und die verdauungsphysiologische Umstellung von Milch zu fester Nahrung. Zudem führt die Trennung vom Muttertier zu einem abrupten Abbau der, durch die Sauenmilch vermittelten, passiven Immunität. Zusammen machen diese Faktoren die frisch abgesetzten Ferkel oft anfälliger für den Befall pathogener Mikroorganismen und damit einhergehenden Verdauungsstörungen.

Dabei führen die durch das Absetzen häufig auftretenden Durchfallerkrankungen auch heute noch zu erheblichen wirtschaftlichen Schäden in der Schweineproduktion (Madec *et al.*, 1998; Melin *et al.*, 2000). Um die Tiergesundheit und damit auch die Leistung und Futterverwertung der Tiere steigern zu können, wurden daher viele Jahre lang Antibiotika als präventive Maßnahme eingesetzt. Seit Anfang des Jahres 2006 ist der Einsatz von antibiotisch wirkenden Futtermittelzusatzstoffen als Leistungsförderer in der Tierproduktion aus Gründen des Verbraucherschutzes in der Europäischen Union verboten (European Commission, 2006). Seitdem haben sich das Interesse und die Forschung an nicht-antibiotischen Leistungsförderern enorm intensiviert. Besonderes Augenmerk lag dabei auf sogenannten probiotischen Mikroorganismen, die oft auch als „alternative Leistungsförderer“ bezeichnet werden. In der Schweinehaltung konnte der positive Einfluss durch den Einsatz von Probiotika bereits in zahlreichen Studien beobachtet werden. Dazu zählten neben einer verbesserten Lebendmassezunahme und Futterverwertung auch eine verringerte Sterblichkeitsrate, sowie ein deutlich reduziertes Auftreten von Durchfallerkrankungen (Fuller, 1989; Simon *et al.*, 2005; Ohashi und Ushida, 2009).

Zu den in der Fütterungspraxis häufig verwendeten Probiotika gehören neben Hefen vor allem probiotisch wirkende Bakterien. Dieser Gruppe wird auch das in dieser Arbeit untersuchte probiotische, sporenbildende Bakterium *Bacillus toyonensis* zugeordnet. Frühere Studien deuteten bereits auf eine immunstimulierende Wirkung dieses Probiotikums hin (Scharek *et al.*, 2007; Schierack *et al.*, 2007). Der Mechanismus, auf dem diese Immunmodulation beruht, ist jedoch bisher nicht vollständig geklärt.

Ziel der vorliegenden Studie war es daher, den Einfluss von *B. toyonensis* auf die intestinale Immunantwort beim Ferkel zu untersuchen. Dabei wurde zunächst die Wirkung des Probiotikums auf die intestinale Integrität, eventuelle morphologische Veränderungen des Darmepithels und das epitheliale Stresslevel untersucht, sowie mit der Entwicklung einzelner intraepithelialer Immunzellpopulationen in Zusammenhang gebracht. Bei den durchgeführten Untersuchungen stand vor allem die mit physiologischem Stress verbundene Phase des Absetzens im Fokus. Mithilfe von Expressionsanalysen des Natürlichen Killerzellen Rezeptors NKG2D konnten neue Hypothesen über die Rolle einzelner Lymphozytenpopulationen in der immunologischen Abwehrfunktion beim Ferkel aufgestellt werden.

2 Literaturübersicht

2.1 **Aufbau des intestinalen Immunsystems beim Schwein**

Das Immunsystem dient dem Schutz des Körpers vor Umwelteinflüssen. Man unterscheidet allgemein die angeborene (unspezifische) und die adaptive (spezifische) Immunabwehr. Zum angeborenen Immunsystem gehören unter anderem die Haut bzw. Schleimhäute als physikalische Barriere. Ihre Zellen erkennen sogenannte pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs) von pathogenen Mikroorganismen, was zur Aktivierung der angeborenen Immunität in der frühen Phase einer Infektion führt. Dabei ist es jedoch wichtig, eine Balance zwischen einer schnellen und gleichzeitig kontrollierten Reaktion zu finden. Ist die Reaktion zu langsam, kann dies in einer unkontrollierten Infektion enden, ist sie zu unkontrolliert kann es u. a. zu Autoimmunkrankheiten führen (Piccioli *et al.*, 2002). Zu den Zellen der angeborenen Immunabwehr zählen u. a. Phagozyten, dendritische Zellen, natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und das Komplementsystem (Fraser *et al.*, 1998; Kaufmann, 2014). Besonders NK-Zellen und dendritische Zellen sind dabei so spezialisiert, dass sie auch als Verbindung zwischen der angeborenen und der im weiteren Verlauf näher erläuterten adaptiven Immunabwehr fungieren (Scott und Trinchieri, 1995; Banchereau und Steinman, 1998).

Wird das unspezifische Abwehrsystem durch einen Erreger durchbrochen, sorgt die adaptive Abwehr für die Eindämmung der Infektion. Hierzu zählen zelluläre Vorgänge, z. B. die Expression spezifischer T-Zellen und Phagozytose, sowie humorale Vorgänge wie u. a. die Bildung spezifischer Antikörper durch B-Zellen (Janeway, 2005). Circa 60 - 70 % der vom Körper gebildeten Antikörper werden über die Darmschleimhaut sezerniert (Brandtzaeg *et al.*, 1989).

Die Darmschleimhaut beherbergt zudem den größten Anteil an Lymphozyten im Körper, womit das darmassoziierte lymphatische Gewebe (GALT) als wichtiges Abwehrsystem des Körpers fungiert (Rocha *et al.*, 1991; Scharek, 2004). Das GALT umfasst dabei Lymphaggregate (u. a. Peyersche Platten, die mesenterialen Lymphknoten) sowie diffuses Gewebe (intraepitheliale Lymphozyten (IEL) und Lymphozyten der Lamina Propria) (Bianchi *et al.*, 1992; Langkamp-Henken *et al.*, 1992; Pabst und Rothkötter, 1999; Thielke *et al.*, 2003). Dabei stellen Enterozyten gemeinsam mit den innerhalb der Epithelschicht liegenden IEL die erste Abwehrfunktion gegen das Eindringen pathogener Mikroorganismen im Darm dar (Bianchi *et al.*, 1992; Stokes *et al.*, 1994). Keiner dieser Bestandteile der Immunantwort arbeitet jedoch alleine, sondern ist als ein zusammenhängendes Netzwerk strukturiert (Saalmüller, 2006).

2.1.1 Intraepitheliale Lymphozyten (IEL)

Beim Menschen stellen etwa 20 % der jejunalen Epithelzellen IELs dar (Pabst und Rothkötter, 2006). Bei drei Monate alten Ferkeln ist der Anteil mit ca. 30 % etwas höher (Rothkötter *et al.*, 1999a). Mit dem Alter des Ferkels nimmt die Anzahl der IELs zu (Rothkötter *et al.*, 1999a; Solano-Aguilar *et al.*, 2001; Vega-Lopez *et al.*, 2001). Während der ersten Tage nach der Geburt nehmen die Ferkel maternale Antikörper und Leukozyten über das intestinale Epithel auf und innerhalb der ersten 60 Tage erhöht sich die Anzahl der IEL auf das Zwölfwache (Pabst und Rothkötter, 1999). Studien belegen einen großen Einfluss der intestinalen Mikrobiota auf die Entwicklung der IELs. Im Vergleich zu konventionell gehaltenen Schweinen wurden in keimfrei gehaltenen Schweinen deutlich weniger IELs nachgewiesen (Pabst und Rothkötter, 1999; Rothkötter *et al.*, 1999a). Bei einem Großteil dieser Lymphozyten handelt es sich um T-Zellen, welche zum Teil zytolytische und immunregulatorische Eigenschaften aufweisen (Hayday *et al.*, 2001; Burkey *et al.*, 2009), sowie u. a. auch um NK-Zellen (Denyer *et al.*, 2006).

2.1.1.1 T-Zellen

T-Zellen zählen, wie auch B-Zellen, zu den Lymphozyten der adaptiven Immunantwort (Janeway, 2005). B-Zellen und die daraus durch Stimulation mittels T-Helfer-Zellen, differenzierenden Antikörper produzierenden Plasmazellen, sind dabei Teil der spezifischen humoralen Immunität (Vollmar *et al.*, 2013). Die im weiteren Verlauf weiter ausgeführten T-Zellen zählen zur spezifischen zellulären Immunität (Kaufmann, 2014).

Porzine T-Zellen lassen sich, wie bei anderen Spezies auch, durch das Vorhandensein von CD3-Molekülen gemeinschaftlich erfassen (Pescovitz *et al.*, 1998c). Ihre Bildung beginnt während des ersten Trimesters der Fetalentwicklung in der Leber. Nach ca. 40 Tagen Trächtigkeit finden sich die ersten T-Zell Vorläufer im Thymus der Ferkel (Šinkora *et al.*, 1998; Šinkora *et al.*, 2000; Šinkora *et al.*, 2002). Diese Vorläuferzellen exprimieren zunächst weder CD3-Moleküle, noch die Costimulatoren CD4 und CD8 und werden als dreifach negative Thymozyten bezeichnet (Cheroutre *et al.*, 2011). Nach 40-50 Tagen beginnen diese mit der Expression von CD3 (Šinkora *et al.*, 1998; Šinkora *et al.*, 2000; Šinkora *et al.*, 2002). Anschließend verlassen die Vorläuferzellen den Thymus und wandern an die unterschiedlichen Zielorte (Weinreich und Hogquist, 2008). Die weitere Differenzierung der intraepithelialen T-Zellen erfolgt nach dem Kontakt mit verschiedenen Antigenen der intestinalen Mikrobiota. Studien zeigten bei konventionell gehaltenen Schweinen eine deutlich schnellere Proliferationsrate der T-Zellen als in keimfreien Tieren (Rothkötter *et al.*, 1991).

Ein weiteres wichtiges Merkmal der T-Zellen ist die Expression von T-Zell-Rezeptoren (TCR). TCRs bestehen aus einem antigenbindenden extrazellulären Teil und nur einer minimalen intrazellulären Domäne (Kuhns *et al.*, 2006). Die Rezeptoren bilden Multiprotein-

Membrankomplexe, bestehend aus einem stark variablen TCR Heterodimer und dem bereits erwähnten CD3-Molekül (Wegener *et al.*, 1995; Piriou-Guzylack und Salmon, 2008). CD3 besteht dabei wiederum aus drei verschiedenen Untereinheiten, den beiden Glykoproteinen γ und δ und dem nicht-glykosylierten Protein ϵ (Brenner *et al.*, 1985; Kuhns *et al.*, 2006). Porzine T-Zellen werden entsprechend der Expression des jeweiligen TCR in $\alpha\beta$ - und $\gamma\delta$ T-Zellen unterteilt (Yang und Parkhouse, 1996; Chareerntantanakul und Roth, 2006). Zu den $\alpha\beta$ T-Zellen zählen u. a. CD4-/CD8+ Zellen, bei welchen zytotoxische Aktivität nachgewiesen wurde (Pescovitz *et al.*, 1985; Saalmuller und Bryant, 1994; Pauly *et al.*, 1996; Yang und Parkhouse, 1997). Diese Zellen exprimieren den $\alpha\beta$ -TCR-Komplex, sowie den heterodimeren Corezeptor CD8 $\alpha\beta$ (Jabri und Ebert, 2007).

Ein Großteil der intestinalen T-Zellen basiert vor allem auf TCR/ $\gamma\delta$ + Zellen (Cheroutre *et al.*, 2011). Auch einige dieser CD2 positiven $\gamma\delta$ T-Zell Subpopulationen zeigen zytotoxische Aktivität (Groh *et al.*, 1998). Die Mehrheit der intraepithelialen T-Zellen setzt sich vor allem aus solchen sogenannten zytotoxischen T-Zellen (CTL) zusammen (Bianchi *et al.*, 1992; Gebert *et al.*, 1996; Rothkötter *et al.*, 1999b; Thielke *et al.*, 2003). CTLs reagieren nach der Erkennung pathogener Antigene mit dem Sezernieren bioaktiver Substanzen, welche anschließend die infizierten Körperzellen zerstören (Gaskins und Kelley, 1995).

2.1.1.2 Natürliche Killer Zellen

Natürliche Killer (NK) Zellen zählen zu den granulären Lymphozyten und sind Teil der zellulären, angeborenen Immunabwehr. NK-Zellen zeigen den komplexen Phänotypen Perforin+ CD2+ CD3- CD4- CD5- CD6- CD8 α + CD8 β - CD11R1+ CD16+ (Denyer *et al.*, 2006). Bei anderen Tierarten wird NKp46 als Marker für NK-Zellen des Blutes verwendet, dieser wird jedoch nicht in allen NK-Zellen des Schweins exprimiert (Mair *et al.*, 2012). Porzine NK-Zellen lassen sich von zytotoxischen T-Zellen unterscheiden, welche Oberflächenmarker für CD3, CD5, CD6 und CD8 $\alpha\beta$ tragen (Pauly *et al.*, 1996; Saalmüller, 1996; Yang und Parkhouse, 1996; Samsom *et al.*, 2000). Die CD8-Moleküle auf den porzinen zytotoxischen T-Zellen sind zudem $\alpha\beta$ Heterodimere, wohingegen sie auf den NK-Zellen als $\alpha\alpha$ Homodimere präsent sind (Yang und Parkhouse, 1997; Chareerntantanakul und Roth, 2006). In Tabelle 1 sind die in dieser Arbeit relevanten Oberflächenmarker mitsamt ihrer Lokalisierung und der entsprechenden Antikörper vermerkt.

Die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen ist abhängig von den verschiedenen Rezeptoren, die sie exprimieren. Mit diesen sind die Zellen dazu in der Lage, sowohl hemmende, als auch aktivierende Signale zu erkennen (Mandal und Viswanathan, 2015). Hemmende Rezeptoren sind dabei jene, welche Moleküle des *major histocompatibility complex* (MHC) der Klasse I erkennen können (Kärre *et al.*, 1986; Kärre, 2002; Slavuljica *et al.*, 2011). Diese MHC-Klasse-I-Moleküle zählen zu den körpereigenen Antigenen und werden auf allen

gesunden Zellen exprimiert (Abbas *et al.*, 2012). Gestresste und infizierte Zellen zeigen eine deutlich verminderte, bzw. eingestellte Expression dieser Moleküle. Körperfremde Zellen tragen diese gar nicht, wodurch sie nach der *missing-self* Hypothese von körpereigenen, gesunden Zellen unterschieden werden können (Ljunggren und Kärre, 1990; Kärre, 2002). Damit wird eine gewisse Selbsttoleranz gewährleistet und die unkontrollierte Zerstörung gesunder, körpereigener Zellen verhindert (Mandal und Viswanathan, 2015).

Zudem tragen NK-Zellen verschiedene aktivierende Rezeptoren, mit welchen sie infizierte und gestresste Zellen anhand von unter Stress exprimierten Proteinen erkennen, um diese zu zerstören. Diese Art der Signaltransduktion wird als *induced-self* Erkennung bezeichnet (Slavuljica *et al.*, 2011; Mandal und Viswanathan, 2015). NK-Zellen sind selbst nicht zur Phagozytose fähig. Die Zerstörung gestresster Zellen wird durch Apoptose bzw. Zellnekrose eingeleitet (Abbas *et al.*, 2012). Die Bindung entsprechender Liganden an die aktivierenden NK-Zellrezeptoren führt zur Freisetzung von Molekülen, u. a. Perforin und Proteasen, durch die zytoplasmatischen Granula. Diese dringen in die infizierte, bzw. gestresste Zelle ein und leiten dort die Apoptose ein (Lowin *et al.*, 1995; Sirén *et al.*, 2004; López-Larrea *et al.*, 2008). Zudem schütten die aktivierten NK-Zellen Cytokine (u. a. IFN γ) aus, wodurch wiederum die Phagozytose und Lyse pathogener Mikroorganismen durch Makrophagen einleitet wird (Abbas *et al.*, 2012).

Tabelle 1: Oberflächenmarker für porcine Immunzellen

Differenzierungsantigen	Expression	Antikörper	Referenz
CD45	Leukozyten	MAC323	(Zuckermann <i>et al.</i> , 1998a; Zuckermann <i>et al.</i> , 2001)
CD2	T-Zellen, NK-Zellen	MSA4	(Pescovitz <i>et al.</i> , 1994a)
CD3	T-Zellen	PPT3	(Pescovitz <i>et al.</i> , 1998b)
CD4	T-Helfer-Zellen	74-12-4	(Pescovitz <i>et al.</i> , 1994b)
CD5	T-Zellen	9G12	(Saalmüller <i>et al.</i> , 1994a; Pescovitz <i>et al.</i> , 1998a)
CD8 α	Zytotoxische T-Zellen, NK-Zellen	76-2-11	(Saalmüller <i>et al.</i> , 1994b; Zuckermann <i>et al.</i> , 1998b)
CD8 β	Zytotoxische T-Zellen	PG164A	(Jonjić und Koszinowski, 1984)
CD11R1	NK-Zellen	MIL-4	(Haverson <i>et al.</i> , 1994)
CD16	NK-Zellen	G7	(Halloran <i>et al.</i> , 1994; Piriou-Guzylack und Salmon, 2008)
TCR1	$\gamma\delta$ T-Zellen	PGLBL22A	(Davis <i>et al.</i> , 1998)

2.1.2 NKG2D-Rezeptor

Zu den transmembranen, aktivierenden Rezeptoren der NK-Zellen zählt u. a. der in dieser Arbeit untersuchte Rezeptor NKG2D (Bauer *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2001; Denyer *et al.*, 2006). Dieser Rezeptor ist Mitglied einer supergenen Familie von Typ-II Transmembranproteinen, welche durch das Vorhandensein einer Typ-C Lektin-Domäne charakterisiert ist. Er wird durch das *KLRK1* (*killer cell lectin-like receptor subfamily K, member 1*) Gen kodiert wird (Houchins *et al.*, 1991). Er wurde auf Immunzellen von Menschen und auch bei Mäusen und Schweinen gefunden (Yim *et al.*, 2001; Denyer *et al.*, 2006). Sowohl beim Menschen als auch bei der Maus wird NKG2D konstitutiv exprimiert, kann jedoch in humanen NK-Zellen durch Cytokine beeinflusst werden (Sutherland *et al.*, 2002; Sirén *et al.*, 2004). Neben den NK-Zellen (Ogasawara und Lanier, 2005) konnte eine NKG2D-Expression zudem auf einem Großteil der IELs im humanen Darmgewebe gezeigt werden, wie u. a. den $\gamma\delta$ T-Zellen und anderen CD8+ T-Zellen (Bauer *et al.*, 1999; Roberts *et al.*, 2001; Slavuljica *et al.*, 2011).

Die Expression des porcinen NKG2D-Rezeptors (pNKG2D) konnte bisher nur in NK-Zellen des Blutes nachgewiesen werden (Denyer *et al.*, 2006). In einer Studie wurden sowohl die aus Blut isolierten CD8+ $\alpha\beta$ T-Zellen als auch $\gamma\delta$ -Zellen als negativ für pNKG2D beschrieben (Denyer *et al.*, 2006). Auf den Immunzellen des porcinen Darmepithels ließ sich der Rezeptor bisher nicht nachweisen.

NKG2D bindet zahlreiche Liganden, wodurch eine effektive Erkennung infizierter und gestresster Zellen ermöglicht werden soll (O'Callaghan *et al.*, 2001; Eagle und Trowsdale, 2007). Die Interaktion des NKG2D-Rezeptors mit seinen Liganden spielt im humanen System eine entscheidende Rolle, wie u. a. bei der Abwehr mikrobieller Infektionen, der Zerstörung von Krebszellen und Abstoßungsreaktionen in Folge von Xenotransplantationen (Hüe *et al.*, 2004; Lilienfeld *et al.*, 2006). Zu diesen Liganden zählen die stress-induzierten MHC-Klasse-I verwandten Moleküle MICA und MICB (Bauer *et al.*, 1999), sowie die Familie der UL16 bindenden Proteine (ULBP 1-5) (Cosman *et al.*, 2001; Sutherland *et al.*, 2002; Romero *et al.*, 2006). Diese weisen, wie auch die klassischen MHC-Klasse-I-Moleküle, mehrteilige extrazelluläre Domänen und transmembrane Enden auf, assoziieren jedoch nicht mit β_2 -Mikroglobulin und haben keine Funktion in der Antigenpräsentation (Groh *et al.*, 1996; Groh *et al.*, 1999; Cerwenka und Lanier, 2001; Groh *et al.*, 2001). Das porcine Homologon zum humanen MICA und MICB stellt das *MIC-like* Gen MIC2 dar (Chardon *et al.*, 2000). Es wird zum größten Teil im gastrointestinalen Epithel exprimiert, konnte aber auch in Muskeln, Herz, Leber, Lunge, Hoden und Thymus nachgewiesen werden (Garcia-Borges *et al.*, 2005). Das porcine ULBP wurde in zahlreichen Geweben nachgewiesen, zeigt jedoch, wie auch MIC2, die größte Expression im Darmepithel. Beide sind in gestresstem Gewebe deutlich stärker exprimiert (López-Larrea *et al.*, 2008).

Zur Bindung an die Liganden bildet der Rezeptor einen Homodimerkomplex und erinnert strukturell an Rezeptor-Liganden-Komplexe auf T-Zellen (Li *et al.*, 2001). NKG2D selbst trägt kein signaltransduzierendes Motiv in seiner intrazellulären Domäne, sondern assoziiert mit den signalleitenden Proteinen DAP10 und DAP12 (Bauer *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 2000). Der Aufbau dieses Rezeptorkomplexes von NKG2D mit DAP12 ist dem auf T-Zellen exprimierten TCR/CD3 Komplex sehr ähnlich. Wie der TCR trägt auch DAP12 ein ITAM-Motif und aktiviert darüber die NK-Zelle (López-Larrea *et al.*, 2008). DAP10 trägt ein YINM-Motif in der zytoplasmatischen Domäne und rekrutiert PI3K (Wu *et al.*, 1999; Wilson *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2000). Co-stimulierende Moleküle in T-Zellen, wie z. B. CD28, nutzen ebenfalls den PI3K-Signalweg, was eine co-stimulierende Wirkung von NKG2D auf CD8⁺ T-Zellen vermuten lässt (Cerwenka und Lanier, 2001). Die durch NKG2D eingeleitete Aktivierung der PI3K-Signalkaskade führt u. a. zur Phosphorylierung von *extracellular-signal-regulated* Kinasen (ERKs) und ERK Aktivator-Kinasen (MEK). Die Beteiligung dieser Kinasen ist wiederum essentiell für die zytotoxische bzw. apoptotische Aktivität der Zellen (Sutherland *et al.*, 2002; Upshaw *et al.*, 2006; Upshaw und Leibson, 2006). Zudem konnte in früheren Studien gezeigt werden, dass aktivierte NK-Zellen, durch das Freisetzen von pro-inflammatorischen Cytokinen, dendritische Zellen stimulieren können, um eine anschließende Signalkaskade zu initiieren (Glas *et al.*, 2000; Ferlazzo *et al.*, 2002; Gerosa *et al.*, 2002; Zitvogel, 2002; Moretta *et al.*, 2007). Diese stimulierten dendritischen Zellen haben daraufhin das Potential, durch die Ausschüttung von IL-12, zytotoxische T-Zellen anzuregen. Somit scheinen der NK-Zellrezeptor NKG2D und seine entsprechenden Liganden eine Verbindung zwischen der angeborenen und der adaptiven Immunantwort darzustellen (Mocikat *et al.*, 2003).

2.1.3 Cytokine

Cytokine spielen eine wichtige Rolle bei der Reaktion des Körpers auf Infektionen und Krankheiten. Man unterscheidet zwischen pro- und anti-inflammatorischen Cytokinen. Pro-inflammatorische Cytokine, wie u. a. IL-1 β , IL-6 und TNF- α , unterstützen dabei Entzündungsprozesse. Anti-inflammatorische Cytokine, wie u. a. IL-10 und TGF- β , hingegen wirken den Entzündungsprozessen entgegen, indem sie u. a. die Aktivität der pro-inflammatorischen Cytokine unterdrücken und somit u. a. die Bewahrung einer intakten Darmschranke unterstützen (Dinarello, 2000; Opal und Depalo, 2000). Kommen pathogene Bakterien in Kontakt mit der Darmschleimhaut, werden diese anhand ihrer pathogen-assoziierten molekularen Muster (PAMPs) erkannt. Dies führt zur Aktivierung der angeborenen Immunabwehr. Dabei kommt es zur Produktion pro-inflammatorischer Cytokine, welche wiederum die Immunantwort in der Lamina propria unterstützen (Neutra und Kozlowski, 2006; McGuckin *et al.*, 2009). Eine Überproduktion dieser pro-inflammatorischen Cytokine resultiert

häufig in einer gestörten Darmintegrität und epithelialer Dysfunktion (McKay und Baird, 1999). In Folge des Absetzens kommt es bei Ferkeln meist zu einer vorübergehenden Entzündung des Darms (Lallès *et al.*, 2007a; Lallès *et al.*, 2007b). Damit korreliert eine Veränderung im Expressionsverhalten verschiedener Cytokine (Moeser *et al.*, 2007). Der Zeitraum des Absetzens konnte dabei mit der Hochregulierung einer Vielzahl pro-inflammatorischer Cytokine in Verbindung gebracht werden (Pié *et al.*, 2004; Moeser *et al.*, 2007). Eine verstärkte Kontrolle der Expression dieser Cytokine (u. a. IL-1 β , IL-6 und TNF α) könnte dabei helfen, die Entzündungen des Darms abzuschwächen und damit vermutlich auch die Durchfallhäufigkeit nach dem Absetzen reduzieren (Liu *et al.*, 2008).

2.2 Intestinale Barriere

Das Epithelium der Darmschleimhaut besteht aus einer einzelnen Zellschicht, welche das Darmlumen auskleidet (Groschwitz und Hogan, 2009). Es erfüllt dabei zwei entscheidende Funktionen. Zum einen fungiert es als selektiver Filter, welcher die Aufnahme von Nährstoffen, Elektrolyten und Wasser aus dem Darmlumen erlaubt (Ferraris und Diamond, 1997; Blikslager *et al.*, 2007). Zum anderen agiert das intestinale Epithelium jedoch auch als eine Barriere und verhindert u. a. die Passage von intraluminalen Antigenen, schädlichen Mikroorganismen, sowie deren Toxinen (Podolsky, 1999; Blikslager *et al.*, 2007; Groschwitz und Hogan, 2009). Eine Störung dieser Barriere, und damit der Durchlass von Antigenen durch das Epithelium in das Gewebe der Lamina Propria, löst in vielen Fällen Entzündungen der Darmschleimhaut aus und kann bis zur Sepsis führen (Doig *et al.*, 1998; Ammori *et al.*, 1999; Meddings, 2000; Lambert, 2004; Barbara, 2006; Blikslager *et al.*, 2007). Man unterscheidet die transzelluläre und die parazelluläre selektive Durchlässigkeit des Epithels. Die transzelluläre Durchlässigkeit ist dabei vor allem mit dem Transport von Wasser durch die Epithelzellen verbunden. Die parazelluläre Durchlässigkeit hingegen beschreibt den Transport von Molekülen zwischen den Epithelzellen. Auf der apikalen Seite des Epithels befinden sich verschiedene Zellverbindungen, welche die angrenzenden Epithelzellen verbinden und den interzellulären Zwischenraum versiegeln (Groschwitz und Hogan, 2009). Zu diesen Verbindungen zählen unter anderem die sogenannten *tight junctions*. Diese Bänder, welche die Epithelzellen verbinden, verhindern die freie parazelluläre Diffusion (Heyman, 2005) und kontrollieren damit den Durchlass von Makromolekülen und Antigenen (Madara *et al.*, 1989; Watson *et al.*, 2001). Verschiedene *in-vitro* und *in-vivo* Studien zeigten, dass die Durchlässigkeit des intestinalen Epithels von einer Vielzahl von Faktoren beeinflusst wird. Hierzu zählen unter anderem verschiedene Immunzellpopulationen. So zeigten z. B. Versuche mit Mäusen, dass eine Aktivierung von CD4⁺ T-Helferzellen zu einer erhöhten transzellulären und parazellulären

Permeabilität führt. Zudem kommt es nach der Aktivierung dieser Zellen zu einer erhöhten Ausschüttung pro-inflammatorischer Cytokine wie TNF- α (Musch *et al.*, 2002; Clayburgh *et al.*, 2005). Eine intraperitoneale Injektion dieser Cytokine zeigte außerdem einen Zusammenbruch der intestinalen Barriere, gefolgt von Durchfallerscheinungen bei Mäusen (Clayburgh *et al.*, 2006). Der Einfluss pro-inflammatorischer Cytokine, wie TNF- α und IFN- γ , ist auch bei vielen Entzündungserkrankungen des Darms bekannt (MacDonald *et al.*, 1990; Fais *et al.*, 1994; Ye *et al.*, 2006). Inkubationsversuche von Darm-Epithelzellen mit IFN- γ und TNF- α zeigten Veränderungen in der Struktur unterschiedlicher *tight junction* Proteine und führten zu einer verminderten epithelialen Barrierefunktion (Zolotarevsky *et al.*, 2002). Diese Art von immuninduzierten Dysfunktionen der intestinalen Barriere stehen im Verdacht, mit der Anfälligkeit und Ausprägung zahlreicher Autoimmunerkrankungen und Entzündungsprozessen, wie chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen, Diabetes, Zöliakie und Nahrungsmittelallergien im Zusammenhang zu stehen (Meddings *et al.*, 1999; Groschwitz und Hogan, 2009).

2.2.1 Nahrungsmittelallergien

Bei der Entstehung einer Nahrungsmittelallergie muss es zunächst zu einem Kontakt von Nahrungsmittelantigenen mit den Immunzellen der Darmschleimhaut kommen. Es wird vermutet, dass eine gestörte Barrierefunktion des Darmepithels einen verstärkten Transport dieser Antigene aus dem Darmlumen zulässt und damit eine Antigen-spezifische Immunreaktion hervorruft (Groschwitz und Hogan, 2009). Ussing-Kammer Untersuchungen mit Dünndarmgewebe von Kindern mit Kuhmilchallergie offenbarten eine deutlich erhöhte Durchlässigkeit im Vergleich zu gesunden Kindern (Heyman, 2005). Auch Patienten mit Allergien gegen diverse andere Nahrungsmittel, wie Nuss, Soja und Fruktose, zeigten eine gestörte epitheliale Barrierefunktion (Ventura *et al.*, 2006). Des Weiteren konnte ein Zusammenhang zwischen einer erhöhten intestinalen Permeabilität und der Entwicklung neuer Nahrungsmittelallergien immunsupprimierter Patienten in Folge von Transplantationen nachgewiesen werden (Asante-Korang *et al.*, 1996; Lacaille *et al.*, 1997; Granot *et al.*, 2006).

Neben der Entstehung der Nahrungsmittelallergie, scheint sich eine gestörte intestinale Barrierefunktion auch auf die Ausprägung klinischer Symptome aufgrund dieser Allergien auszuwirken. So erhöhte sich beispielsweise die intestinale Permeabilität durch die Verabreichung von Nahrungsmittelantigenen bei Patienten mit Nahrungsmittelallergien (Andre *et al.*, 1987; Ventura *et al.*, 2006). Dabei korrelierte der Grad der Barrieredysfunktion deutlich mit der Schwere der Ausprägung der Symptome (Ventura *et al.*, 2006). Zusammengefasst

weisen all diese Studien auf eine wichtige Funktion der intestinalen Barrierefunktion bei der Etablierung von Nahrungsmittelallergien hin.

2.3 Die Entwicklung der intestinalen Mikrobiota beim Ferkel

Die Entwicklung der intestinalen Mikrobiota beim Ferkel beginnt bereits während der Geburt und in den ersten Lebensstunden (Mackie *et al.*, 1999; Konstantinov *et al.*, 2006). Als Hauptquelle dient hierbei die vaginale, fäkale und dermale Mikrobiota des Muttertiers (Penders *et al.*, 2006). Bis zu diesem Zeitpunkt ist der Verdauungstrakt des heranwachsenden Fetus nahezu keimfrei (Gaskins, 2001; Hopwood und Hampson, 2003; Shirkey *et al.*, 2006; Lallès *et al.*, 2007a). Studien mit gnotobiotischen Tieren zeigten, dass autochthone Bakterien die natürliche, nachgeburtliche Entwicklung des intestinalen Gewebes des Wirtstieres stimulieren. Zudem unterstützen sie die Entwicklung des Immunsystems, spielen eine entscheidende Rolle bei Abwehrfunktionen und verwerten nicht-verdauliche Substanzen der Diät in energieliefernde Metabolite (Gaskins, 2001; Guarner und Malagelada, 2003; Bauer *et al.*, 2006; Ley *et al.*, 2008; Koenig *et al.*, 2011). Bereits 1989 wurde der Begriff *colonisation resistance* eingeführt, welcher den schützenden Einfluss der Mikrobiota gegen eindringende Pathogene beschreibt (van der Waaij, 1989). Diese symbiotische Beziehung aus Wirt und Bakterien entwickelte sich im Laufe der Evolution (Gaskins, 2001). Der genaue Aufbau der Mikrobiota hängt von mehreren Faktoren ab. Dazu zählt der genetische Hintergrund und die Physiologie des Wirts, aber auch die Interaktion verschiedener Bakterienarten (Konstantinov *et al.*, 2004).

Die Zusammensetzung der Mikrobiota durchläuft im Laufe der ersten Lebenswochen bis zum Absetzen viele Veränderungen (Stewart, 1997). Innerhalb weniger Stunden nach der Geburt dominieren dabei hauptsächlich Streptokokken und coliforme Bakterien wie *Escherichia coli* und *Clostridien* (Mackie *et al.*, 1999; Konstantinov *et al.*, 2004; Petri *et al.*, 2010). Bereits am zweiten Tag geht der Anteil der coliformen Bakterien und *Clostridien* zurück und die Anzahl der Streptokokken und Laktobazillen erhöht sich deutlich. Während der Säugezeit dominieren in der Digesta von Magen und Dünndarm Milchsäurebakterien (Tannock *et al.*, 1990; Petri *et al.*, 2010), welche an die Verwertung der Milchinhaltsstoffe adaptiert sind (Fuller *et al.*, 1978; Hopwood und Hampson, 2003). Innerhalb der ersten Woche nach dem Absetzen sinkt jedoch der Anteil dieser Bakteriengruppe im Dünndarm wieder und der Anteil coliformer Bakterien und *Clostridien* nimmt erneut zu (Konstantinov *et al.*, 2006).

Eine gesunde Mikrobiota ist auch entscheidend zur Vorbeugung von Durchfallerkrankungen bei der Futterumstellung. Während der Umstellung von Milch zu fester Nahrung kommt es zu einer radikalen Veränderung der Mikrobiota innerhalb der ersten zwei Wochen nach dem

Absetzen (Hillman *et al.*, 2001). In diesem Zusammenhang konnte eine deutlich reduzierte Anzahl von Laktobazillen und anderen nicht-pathogenen, zuträglichen Bakterien gezeigt werden, was wiederum das Wachstum von u. a. pathogenen coliformen Bakterien begünstigt (Ewing, 2009). Vor allem bei früh abgesetzten Ferkeln (nach 17 Tagen) war die Anzahl von Laktobazillen, vor allem im Dünndarm, deutlich geringer, als bei Ferkeln, die eine Woche später abgesetzt wurden. (Franklin *et al.*, 2002).

2.4 Die Phase des Absetzens und die Bedeutung für die Tiergesundheit

Das natürliche Absetzen von Wild- und Hausschweinen findet in einem Alter von ca. 70 Tagen statt (Whittemore und Green, 2001). Dabei handelt es sich jedoch um einen graduellen Prozess (van Beers-Schreurs *et al.*, 1998; Worobec *et al.*, 1999). Der Gastrointestinaltrakt eines neugeborenen Ferkels ist zunächst auf die Aufnahme und Verdauung von Sauenmilch eingestellt (Fan *et al.*, 2002). Im Alter von 14 - 28 Tagen entwickelt er sich so weit, dass das Ferkel dazu in der Lage ist, sukzessiv nicht Milch-basiertes Futter zu verwerten (Whittemore und Green, 2001). Dies erlaubt eine langsame Umstellung in der Nahrungsaufnahme, in der das Ferkel graduell von der Abhängigkeit der Sauenmilch und der darin enthaltenen Nährstoffe entwöhnt wird und ermöglicht so die Reifung eines funktionsfähigen Verdauungsapparates (van Beers-Schreurs *et al.*, 1998; Brooks und Tsourgiannis, 2003; Miller und Slade, 2003; Zabielski *et al.*, 2008). Es wird davon ausgegangen, dass sich das Ferkel, unter natürlichen Bedingungen, etwa acht Wochen nach der Umstellung zu fester Nahrung komplett unabhängig von der Sauenmilch ernähren kann (Whittemore und Green, 2001).

Die Entwicklung des Verdauungssystems wird durch die Aufnahme des Kolostrums eingeleitet und dauert während der gesamten Säugeperiode an. Hierbei zeigen Ferkel mit einem späteren Absetzzeitpunkt eine weiter fortgeschrittene Entwicklung (Hampson, 1986; Kelly *et al.*, 1991). Wann Ferkel frühestens abgesetzt werden dürfen, ist in der EU streng geregelt. In der Tierschutz-Nutztierhaltungsverordnung ist in Abschnitt 5 § 27 festgehalten, dass Saugferkel erst ab einem Alter von vier Wochen abgesetzt werden dürfen. Der Zeitpunkt darf dann früher gewählt werden, wenn es zum Schutz des Muttertieres bzw. des Saugferkels vor Schmerzen, Leiden oder Schäden erforderlich ist. Zudem dürfen Ferkel im Alter von über drei Wochen dann abgesetzt werden, wenn sie unverzüglich in desinfizierte Ställe, bzw. Stallabteile, verbracht werden, in denen keine Sauen gehalten werden (Tierschutz-Nutztierhaltungsverordnung, 2006). In der konventionellen Tierhaltung werden Ferkel mittels dieser Regelung meist so früh wie möglich abgesetzt. Unmittelbar darauf wird häufig eine reduzierte Futteraufnahme beobachtet, welche bis zur Unterernährung der Ferkel, durch die Unterversorgung mit Nährstoffen, führen kann (Pluske *et al.*, 1997; Le Dividich und Sève,

2000; Lallès *et al.*, 2004). Es kann bis zu zwei Wochen in Anspruch nehmen, das dadurch entstandene Energiedefizit wieder auszugleichen (Le Dividich und Sève, 2000). Der abrupte Wegfall der energiereichen Sauenmilch, die einen hohen Anteil an Fett und leicht verdaulicher Laktose aufweist, führt zu einem zusätzlichen Energiedefizit der Ferkel (Klobasa *et al.*, 1987; Pluske *et al.*, 1997; Le Dividich und Sève, 2000; Williams, 2003; Zabielski *et al.*, 2008). Zudem muss das Ferkel nach dem Absetzen auf die in der Sauenmilch enthaltenen Wachstumsfaktoren und Immunglobuline verzichten (Pluske *et al.*, 1997; King *et al.*, 2003). Diese Wachstumsfaktoren sind u. a. an der Bereitstellung regulatorischer Signale im Gastrointestinaltrakt des neugeborenen Ferkels verantwortlich (Odle *et al.*, 1996).

2.4.1 Morphologische und physiologische Veränderungen im Dünndarm während der Absetzphase

Die Entwicklung der adulten Verdauungsphysiologie wird durch die Aufnahme des Kolostrums eingeleitet und während der Säugephase fortgeführt. Dabei zeigen später abgesetzte Ferkel eine deutlich weiter fortgeschrittene morphologische Entwicklung des Gastrointestinaltrakts (Hampson, 1986; Miller *et al.*, 1986; Cera *et al.*, 1988; Kelly *et al.*, 1991; Miller und Slade, 2003). Innerhalb der ersten drei Tage nach dem Absetzen kommt es zunächst zu einer deutlichen Reduktion des Dünndarmgewichts beim Ferkel (Makkink *et al.*, 1994). Gleichzeitig konnte eine dramatische Reduktion der jejunalen Villuslänge unmittelbar nach dem Absetzen gezeigt werden (Cera *et al.*, 1988; van Beers-Schreurs *et al.*, 1998). In Zusammenhang mit der reduzierten Futtermittelaufnahme und der damit oft einhergehenden, vorübergehenden Unterversorgung, werden bei Ferkeln nach dem Absetzen oft Villusatrophien beobachtet (Hampson, 1986; Stokes *et al.*, 1987; Pluske *et al.*, 1997; van Beers-Schreurs *et al.*, 1998; Lallès *et al.*, 2004). Diese Verkürzung der Darmzotten ist drei bis fünf Tage nach dem Absetzen am gravierendsten und wird ab dem dritten bis sechsten Tag von einer sogenannten Kryptenhyperplasie, einer Vertiefung der Krypten, begleitet (Tang *et al.*, 1999; Spreeuwenberg *et al.*, 2001; David *et al.*, 2002; Boudry *et al.*, 2004; Montagne *et al.*, 2007). Die Vertiefung der Krypten erfolgt aufgrund einer erhöhten Zellproliferation und soll der regenerativen Zunahme der Zottenlänge, durch die Nachbildung von Enterozyten dienen (Hedemann *et al.*, 2003; Miller und Slade, 2003; Zabielski *et al.*, 2008). Das Verhältnis von Zottenlänge zu Kryptentiefe ist hierbei ein wichtiger Indikator. In der akuten Phase nach dem Absetzen gilt eine Verringerung dieses Verhältnisses als Ausdruck hoher Zellverluste im Zottenepithel und einer nicht genügenden Zellerneuerung in den Krypten (Hampson, 1986; Pluske *et al.*, 1997; Van Dijk *et al.*, 2001; Hedemann *et al.*, 2003; Zabielski *et al.*, 2008). Die bei der Atrophie entstehende Verkürzung der Zotten und die damit einhergehende Verkleinerung der Oberfläche führen zu einer verschlechterten Aufnahmefähigkeit des Dünndarms für Nährstoffe. Dies wird durch eine

deutlich reduzierte Enzymaktivität (sog. *brush border* Enzyme) im Bereich der Darmschleimhaut verstärkt (Hampson, 1986; Miller *et al.*, 1986). Diese Veränderungen stehen in starkem Zusammenhang mit Durchfallerscheinungen in der akuten Phase nach dem Absetzen (Hampson, 1986; Gaskins und Kelley, 1995; Pluske *et al.*, 1997).

2.4.2 Durchfallerkrankungen nach dem Absetzen

Die in Folge des Absetzens häufig auftretenden Durchfallerkrankungen führen auch heute noch zu erheblichen wirtschaftlichen Schäden in der Schweineproduktion (Madec *et al.*, 1998; Melin *et al.*, 2000). Neben den bereits beschriebenen morphologischen Veränderungen (2.4.1) spielen bei diesem Krankheitsbild u. a. auch verschiedene immunologische Faktoren eine Rolle. Hierzu zählen vor allem die Immunglobuline (Ig), welche die Ferkel in der Säugeperiode über die Sauenmilch aufnehmen. Das maternale IgA ist ein wichtiger Bestandteil der mukosalen Immunität und mitverantwortlich für die effiziente Bekämpfung von pathogenen Mikroorganismen und Toxinen (Brandtzaeg und Pabst, 2004; Macpherson *et al.*, 2008). Durch das Absetzen, und die damit fehlende Sauenmilch, werden den Ferkeln diese schützenden Faktoren entzogen, was die Tiere daraufhin zunächst anfälliger für Darmerkrankungen und Durchfallerscheinungen macht (Fan *et al.*, 2002). Abgesetzte Ferkel sind dabei oft anfälliger für, durch *E. coli* Toxine verursachten, Durchfall als Saugferkel (Nabuurs *et al.*, 1993).

Zudem konnten Veränderungen in der Zusammensetzung der Lymphozyten der jejunalen Lamina propria aufgezeigt werden. Hierbei nahm der Anteil der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in der Phase des Absetzens deutlich zu, was auf eine Stimulation des gastrointestinalen Immunsystems hinweist (Pluske *et al.*, 1999; Solano-Aguilar *et al.*, 2001). Durch die Zufuhr neuer, unbekannter Futtermittelantigene nach dem Absetzen, kann es zudem zur Ausbildung einer Futtermittelhypersensitivität kommen. Dies wiederum wirkt sich zusätzlich schlecht auf die Lebendmasseentwicklung der Tiere aus (Li *et al.*, 1990b; Li *et al.*, 1991). Für die Sojabohnen-Proteine Glycinin und β -Glycinin konnten solche Hypersensitivitätsreaktionen bei Schweinen (Stokes *et al.*, 1984; Engle, 1994), Kälbern (Dawson *et al.*, 1988) und Mäusen (Mowat und Ferguson, 1981) gezeigt werden. Bei der Fütterung von unbearbeitetem Sojamehl konnte neben der veränderten Villusmorphologie zudem ein erhöhter Antikörpertiter (IgG) gegen Sojaproteine im Blut festgestellt werden (Li *et al.*, 1990a), was auf eine immunologische Ursache hin deutet. Es wird angenommen, dass ein vermehrter Übertritt intakter Soja-Antigene aus dem Darm hierfür ursächlich ist. Der genaue Mechanismus ist bisher allerdings nicht geklärt. Verschiedene Studien deuten auf eine zellvermittelte Immunreaktion hin (Miller *et al.*, 1984a; Miller *et al.*, 1984b; Stokes *et al.*, 1984; Stokes *et al.*, 1987). Stokes *et al.* (1987) stellten z. B. eine erhöhte Anzahl intraepithelialer Lymphozyten im Dünndarm Soja-sensibilisierter

Schweine fest. Miller *et al.* (1984a) zeigten, dass ein erhöhter Gehalt an antigenem Material (bovines Kasein) im, vor dem Absetzen verabreichten, Beifutter verstärkte Durchfallerscheinungen nach dem Absetzen zur Folge hat. Daraufhin postulierten sie, dass das Tier zunächst durch das Antigen sensibilisiert werden muss, um anschließend eine Hypersensitivität zu entwickeln. Es gibt jedoch auch Studien, die die zellvermittelte Immunreaktion als Grundlage für die Hypersensitivität nicht unterstützen. So konnten beispielsweise weder Blut- noch Darmlymphozyten von Ferkeln (56 Tage und jünger) durch aufgereinigtes Sojaprotein zur Proliferation angeregt werden (Li *et al.*, 1990b). Dabei ist jedoch zu beachten, dass sich Darmlymphozyten vor dem Vollenden der zehnten Lebenswoche *in-vitro* nur sehr schwer zur Proliferation anregen lassen (Wilson *et al.*, 1986). Es ist jedoch bekannt, dass NK-Zellen bereits im jungen Ferkel funktionstüchtig sind. Bereits am 21. Lebenstag konnte eine zytotoxische Aktivität der NK-Zellen des Blutes nachgewiesen werden (Tuchscherer *et al.*, 2002). Somit lässt sich eine Beteiligung der NK-Zellen, als Teil der zellvermittelten Immunantwort, am Prozess der Villusatrophie nicht ausschließen.

2.5 Futtermittelzusatzstoffe

Futtermittelzusatzstoffe sind „Stoffe, Mikroorganismen oder Zubereitungen, die keine Futtermittel-Ausgangserzeugnisse oder Vormischungen sind und bewusst Futtermitteln oder Wasser zugesetzt werden (Verordnung (EG) Nr. 1831/2003, 2003). Zugelassene Futtermittelzusatzstoffe werden in insgesamt fünf Kategorien unterteilt (Tabelle 2). Für die wissenschaftliche Einschätzung sowie die Zulassung von Futtermittelzusatzstoffen sind die Europäische Kommission, sowie die Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit verantwortlich (EFSA).

Vor allem in der Phase des Absetzens kommt es zu einem erhöhten Aufkommen von Durchfallerkrankungen, was zu einem erheblichen ökonomischen Verlust in der Tierhaltung führt (Madec *et al.*, 1998; Melin *et al.*, 2000). Mithilfe von Futtermittelzusatzstoffen konnte eine Reduktion der Durchfallhäufigkeit, sowie eine Verbesserung der Leistungsdaten um bis zu 5 % erzielt werden (Simon *et al.*, 2005). Dabei ist die gesteigerte Leistungsfähigkeit vermutlich auf eine gesteigerte Ausnutzung der Futternährstoffe zurückzuführen. Die wachstumssteigernde Wirkung verabreichter Antibiotika erwies sich als besonders groß bei Tieren, welche unter unvorteilhaften Bedingungen gehalten werden und keine vollwertige Ernährung erhalten. Hierbei gilt, je schlechter die Umweltbedingungen wie Stallhygiene oder die Zusammensetzung des Futters sind und je schlechter der allgemeine Gesundheitszustand des Tiers, desto dramatischer ist die Antibiotikawirkung (Kirchgeßner, 2004).

Tabelle 2: Futtermittelzusatzstoff-Kategorien (Verordnung (EG) Nr. 1831/2003, 2003).

Kategorie	Beschreibung
Technologische Zusatzstoffe	Stoffe, die den Futtermitteln aus technologischen Gründen zugesetzt werden. Dazu zählen u. a. Konservierungs- und Antioxidationsmittel, Emulgatoren, Stabilisatoren, Silierzusatzstoffe, Trenn-, Gelier-, und Bindemittel
Sensorische Zusatzstoffe	Stoffe, die einem Futtermittel zugesetzt werden, um die organoleptischen Eigenschaften dieses Futtermittels bzw. die optischen Eigenschaften des aus den Tieren gewonnenen Lebensmittels zu verbessern oder zu verändern. Hierzu zählen u. a. Aromen und Farbstoffe
Ernährungsphysiologische Zusatzstoffe	U. a. Vitamine, Provitamine, Spurenelemente, Aminosäuren und Harnstoff
Zootechnische Zusatzstoffe	Stoffe, die die Leistung und den Gesundheitszustand der Tiere oder die Auswirkungen auf die Umwelt positiv beeinflussen. Dazu gehören u. a. Verdaulichkeitsförderer wie Enzyme, Darmflorastabilisatoren (Mikroorganismen, die bei der Verfütterung an Tiere eine positive Wirkung auf die Darmflora haben) und Stoffe, die die Umwelt günstig beeinflussen
Kokzidiostatika und Histomonostatika	Stoffe, die Infektionen durch Kokzidien (Einzeller) vorbeugen

Antibiotika wurden lange Zeit nicht nur zur Therapie vorliegender Erkrankungen, sondern auch als Wachstums- bzw. Leistungsförderer in Form von Futtermittelzusatzstoffen bei verschiedenen Nutztieren eingesetzt. Durch das Europäische Parlament und den Rat der Europäischen Union wurden Antibiotika 2003 als „antimikrobielle Stoffe, die durch einen Mikroorganismus erzeugt bzw. aus diesem gewonnen werden und andere Mikroorganismen zerstören bzw. deren Wachstum hemmen“ definiert (Verordnung (EG) Nr. 1831/2003, 2003). Aufgrund eines erhöhten Übertragungsrisikos von Antibiotikaresistenzen wurde seit Januar 2006 der Einsatz antibiotischer Wachstums- bzw. Leistungsförderer in der Nutztierhaltung europaweit verboten (European Commission, 2006). Daher wurde in den letzten Jahren intensiv an nicht-antibiotischen Substanzen geforscht, welche einen ähnlich positiven Effekt auf die Leistung und Gesundheit der Tiere haben. Zu den sogenannten „alternativen Leistungsförderern“ zählen vor allem probiotische Mikroorganismen, welche im folgenden Kapitel genauer erläutert werden.

2.6 Probiotika als Futtermittelzusatzstoffe

2.6.1 Definition

Der Begriff "Probiotikum" stammt aus dem Griechischen („*pro bios*“) und bedeutet „für das Leben“. Er wurde erstmals 1953 von Werner Kollath verwendet, um aktive Substanzen zu beschreiben, die für eine gesunde Entwicklung essentiell sind (Park, 2009). Lilly und Stillwell entdeckten 1965, dass verschiedene Protozoen-Spezies Substanzen produzieren, die positiv auf das Wachstum anderer Spezies wirken, welche wiederum für den eigenen Organismus förderlich sind (Lilly und Stillwell, 1965). Parker spezifizierte dies 1974 und bezeichnete Probiotika als „Organismen und Substanzen, die zum mikrobiellen Gleichgewicht beitragen“ (Parker, 1974). Die gebräuchlichste Definition nach Fuller bezeichnet ein Probiotikum als „einen lebenden mikrobiellen Futterzusatz, der eine vorteilhafte Wirkung auf das Wirtstier hat, indem er das intestinale Gleichgewicht verbessert“ (Fuller, 1989). Hierbei wurde die weitläufige Bezeichnung „Substanz“ bewusst vermieden, um eine klare Abgrenzung zu antibiotischen und präbiotischen Substanzen zu schaffen und die Bedeutung der Lebensfähigkeit der probiotischen Organismen zu betonen. In den darauf folgenden Jahren wurde diese Definition oftmals angepasst. Die Weltgesundheitsorganisation beschreibt Probiotika als „lebende Mikroorganismen, die, nach Verzehr einer bestimmten Menge, über ihren generellen Nährwert hinaus, einen positiven Effekt auf die Gesundheit des Wirtstieres besitzen“ (Guarner und Schaafsma, 1998; Joint FAO, 2002). Studien haben zudem gezeigt, dass sich auch inaktivierte probiotische Keime, bzw. bereits deren Zellstruktur, positiv auf die menschliche Gesundheit auswirken (Salminen *et al.*, 1999).

Probiotika können in verschiedenen Formen über die Nahrung aufgenommen werden, unter anderem als Tabletten oder mittels fermentierter Nahrungsmittel, wie z. B. Joghurt. Dabei kann der Zusatz aus einem oder mehreren probiotischen Keimen in Kombination bestehen (Fooks und Gibson, 2002). Der positive Einfluss des Einsatzes von Probiotika in der Schweinehaltung wurde in diversen Studien beobachtet. Hierbei wurden eine Verbesserung der täglichen Lebendmassezunahme, der Futtermittelverwertung, sowie eine geringere Sterblichkeitsrate und ein reduziertes Auftreten von Durchfallerkrankungen festgestellt (Fuller, 1989; Simon *et al.*, 2005; Ohashi und Ushida, 2009). Vor allem die Durchfallinzidenz konnte, laut einer Studie, bei einer sehr frühen Applikation der Probiotika an die Ferkel kurz nach der Geburt, bzw. bereits zuvor an die Sauen, auf 10 bis 50 % reduziert werden (Simon, 2005).

Die Wirkungsmechanismen von Probiotika sind noch nicht eindeutig geklärt und variieren stark. Die generelle Unterteilung der bisher bekannten Wirkmechanismen sind in Absatz 2.6.2 dargestellt. Viele der als Probiotika eingesetzten Mikroorganismen entstammen dem Verdauungstrakt und zählen zu den Milchsäurebakterien, wie u. a. Laktobazillen,

Bifidobakterien, Pediokokken und Enterokokken (Gibson *et al.*, 1997; Lee, 1999; Jin *et al.*, 2000b). Darüber hinaus finden auch Hefen, Bakteriensporen und gramnegative Bakterien Verwendung als Probiotikum (Görke und Liebler-Tenorio, 2001; Simon *et al.*, 2005). Eine Liste mit allen derzeit durch die EFSA als Probiotikum zugelassenen Mikroorganismen ist in Tabelle 4 dargestellt.

2.6.2 Wirkmechanismen von Probiotika

Obwohl die gesundheitsfördernde und leistungssteigernde Wirkung von Probiotika auf die Wirtstiere in zahlreichen Studien belegt wurde (Shortt, 1999; Ohashi und Ushida, 2009), sind die detaillierten Wirkmechanismen bisher noch nicht hinreichend wissenschaftlich aufgeklärt. Zu beachten ist dabei, dass die Wirkung eines Probiotikums immer stammspezifisch ist, weshalb sich Forschungsergebnisse nicht ohne weiteres übertragen lassen (Dongarrà *et al.*, 2013). Es ist bekannt, dass Probiotika vor allem im Gastrointestinaltrakt wirken und in bedeutendem Zusammenhang mit der Mikrobiota des Wirtstieres stehen (Shortt, 1999). Die genaue Wirkung ist dabei von der mikrobiellen Ausgangssituation des Darmtrakts des Wirtstieres abhängig. Dadurch variiert der Einfluss des Probiotikums stark und kann nur sehr schwer vorausgesagt werden (Mackie *et al.*, 1999; Simon *et al.*, 2005; Ohashi und Ushida, 2009).

Man unterscheidet grundsätzlich zwischen zwei Wirkungsweisen: Der Interaktion zwischen probiotischen und anderen intestinalen Mikroorganismen, sowie der Wirkung von Probiotika auf den Wirtsorganismus selbst (Görke und Liebler-Tenorio, 2001; Thelen *et al.*, 2004; Oelschlaeger, 2010; Soccol *et al.*, 2010; Murguía-Peniche *et al.*, 2013). In den folgenden Abschnitten sind einige der möglichen Wirkmechanismen aufgeführt.

2.6.2.1 Interaktion zwischen probiotischen und anderen intestinalen Mikroorganismen

In einem Vergleichsversuch zeigten Collins und Carter (1978), dass die letale Dosis des Salmonellose verursachenden Bakteriums *Salmonella enteritidis* bei keimfrei gehaltenen Mäusen erheblich geringer ist als bei konventionell gehaltenen Mäusen. So führte bereits die Verabreichung von nur 10 Zellen / Tier bei den keimfreien Mäusen zu einer 100 % - igen Sterblichkeitsrate, wohingegen dies bei den konventionell gehaltenen Tieren erst ab einer Dosis von 10^9 Zellen / Tier eintrat. Dieser Effekt deutete bereits damals auf eine Interaktion zwischen der wirtseigenen Mikrobiota und den pathogenen Mikroorganismen hin.

Konkurrenz um Anheftungsstellen und Besiedlung des Gastrointestinaltrakts

Bereits 1973 konnte in einem Fütterungsversuch mit apathogenen Laktobazillen deren schützende Wirkung bei Infektionen mit *E. coli* in Schweinen gezeigt werden. Die mit dem

Probiotikum behandelten Tiere zeigten ein hohes Vorkommen der markierten, gefütterten Laktobazillen auf der Schleimhautoberfläche des Darms und, verglichen mit den Kontrolltieren, keine Anheftung der *E. coli* (Muralidhara *et al.*, 1973). Ähnliches wurde kurze Zeit später von Davidson und Hirsh (1976) beobachtet. Der Einsatz eines apathogenen *E. coli* Stammes vor der Infektion mit einem toxin-bildenden *E. coli* Stamm mit dem gleichen Fibrin-Antigen, führt zu einer starken Reduktion der Krankheitssymptome. Auch Jin *et al.* (2000b) beobachteten in einer Studie mit isoliertem porzinem Mukus, dass die Anheftung der *E. coli* Stämme K88 und K8MB an die Darmschleimhaut um bis zu 90 % verringert werden kann, wenn zeitgleich mit der Infektion mindestens 10^9 KBE / mL des *E. faecium* Stamms 18C23 verabreicht werden. Eine mögliche Erklärung für das reduzierte Anheften von *E. coli* ist eine Besetzung der Toxinsensitiven Zellen des Dünndarms durch die apathogenen Mikroorganismen. Studien haben zudem gezeigt, dass der Einsatz verschiedener probiotischer Stämme zu einer erhöhten Genexpression von Muzinen führt, wodurch die Bindung von Mikroorganismen ebenfalls reduziert wird (Mack *et al.*, 1999).

Konkurrenz um Nährstoffe

Neben der Konkurrenz um Anheftungsstellen, spielt auch die Konkurrenz um limitierte Substrate, die sowohl die probiotischen als auch die pathogenen Mikroorganismen für ihre Fermentation benötigen, eine Rolle (Fooks und Gibson, 2002). Bei diesen Substraten handelt es sich vor allem um leicht verwertbare Kohlenhydrate (Hentges, 1992), welche bei erhöhter Nutzung durch probiotische Bakterien zu einem Mangel an Energiesubstraten für unerwünschte Spezies führen. Hier zeigten Wilson und Perini (1988) in einem *continuous-flow*-System muriner Fäkalflora, dass sich *Clostridium difficile in-vitro* nur dann dauerhaft halten und vermehren kann, wenn dem System zusätzliche, leicht verwertbare Kohlenhydrate zugesetzt wurden. Ein weiterer limitierender Nährstoff ist Eisen, welches für die meisten Bakterien ein essentielles Substrat ist (Weinberg, 1997). Probiotische Bakterien wie der *E. coli* Stamm Nissle 1917 konkurrieren um diese begrenzte Ressource und reduzieren damit das verfügbare Eisen für andere Mikroorganismen (Grozdanov *et al.*, 2004; Große *et al.*, 2006).

Produktion antimikrobieller Substanzen

Auch durch die Produktion antimikrobieller Substanzen, welche entweder direkt inhibierend auf pathogene Spezies wirken (Bakteriozine), oder die Wachstumsbedingungen unerwünschter Spezies verschlechtern, können Probiotika das Millieu des Gastrointestinaltrakts beeinflussen (Genovese *et al.*, 2000; Görke und Liebler-Tenorio, 2001; Corcionivoschi *et al.*, 2010). So führte die Zugabe von Milchsäure, dem Endprodukt der Milchsäuregärung von Laktobazillen, zum Futter, zu einer Reduktion von *E. coli* Keimen im Gastrointestinaltrakt von Schweinen (White *et al.*, 1969). Ob die Menge des von Probiotika

hergestellten Laktat *in-vivo* im Vergleich zu den bereits im Darm vorhandenen Laktat produzierenden Bakterien relevant ist, bleibt fraglich. Viele Bakterien, darunter einige Milchsäurebakterien, können zudem neben organischen Säuren und anderen antimikrobiellen Substanzen, auch sogenannte Bakteriozine produzieren (Gibson und Wang, 1994; Yildirim und Johnson, 1998; Yildirim *et al.*, 1999; Ibrahim und Salameh, 2001; Cheikhyoussef *et al.*, 2008). Dabei handelt es sich um Proteine, welche auch von gramnegativen Bakterien hergestellt werden und einen antimikrobiellen Effekt auf sowohl grampositive, als auch gramnegative Bakterien ausüben können (Cheikhyoussef *et al.*, 2008). Das Wirkspektrum dieser Bakteriozine ist jedoch meist sehr eng, wodurch sie sich deutlich von den meisten Antibiotika unterscheiden lassen. Dabei beschränkt sich die antimikrobielle Wirkung in der Regel auf Stämme der gleichen Spezies, wie der bakteriozinproduzierende Mikroorganismus selbst (Zacharof und Lovitt, 2012). Verschiedene Probiotika, u. a. der *L. reuteri* Stamm ATCC55730, sind aber auch in der Lage, Bakteriozine mit einem breiteren Wirkspektrum herzustellen. Reuterin fungiert ähnlich wie ein Breitbandantibiotikum und ist sowohl gegen grampositive und -negative Bakterien, als auch Hefe, Pilze, Protozoen und verschiedene Viren wirksam (Cleusix *et al.*, 2008).

Neutralisation von Toxinen

Viele pathogene Mikroorganismen zeichnen sich vor allem durch die Produktion von Toxinen aus. Ein weiterer möglicher Wirkmechanismus von Probiotika ist es, den Wirtsorganismus vor diesen Toxinen zu schützen (Oelschlaeger, 2010). Die Hefe *Saccharomyces boulardii* beispielsweise besitzt die Fähigkeit, bakterielle Toxine zu binden. Untersuchungen ergaben, dass die Untereinheit B des Cholera-toxins an die Oberfläche von Hefezellen bindet, wodurch diese wiederum das Toxin im Gastrointestinaltrakt vor einer möglichen Bindung an Epithelzellen abfangen könnten (Brandão *et al.*, 1998). Auch die Menge des von *C. difficile* hergestellten Toxins A und die damit einhergehende Hypersekretion konnte durch *S. boulardii* in Ratten deutlich reduziert werden (Pothoulakis *et al.*, 1993; Izadnia *et al.*, 1998). Dabei konnte eine antagonistische Wirkung der aus *S. boulardii* extrahierten Serinprotease gegen Toxin A gezeigt werden, welche eventuell am Abbau des intestinalen Rezeptors für das entsprechende Enzym verantwortlich ist (Castagliuolo *et al.*, 1996). In Zellkulturversuchen konnte diesem Enzym ebenfalls eine neutralisierende Wirkung auf das Toxin B aus *C. difficile* zugeordnet werden (Castagliuolo *et al.*, 1999). Für einige Bifidobakterien, wie *B. breve*, konnte *in-vitro* eine hemmende Wirkung gegen das von *E. coli* (O157:H7) exprimierte *shiga* Toxin bei Mäusen gezeigt werden. Dabei überlebten alle mit *B. breve* vorbehandelten Tiere eine Infektion mit O157:H7, wohingegen 90 % der Kontrolltiere die Infektion nicht überstanden (Asahara *et al.*, 2004). Hier ist jedoch zu beachten, dass der streptomycinresistente Stamm vermutlich nur durch den Einsatz des entsprechenden Antibiotikums proportional in der

nötigen Anzahl überleben konnte, um einen Effekt zu zeigen. *In-vivo* konnte diese Wirkung bisher nicht nachgewiesen werden.

2.6.2.2 Wirkung auf den Wirtsorganismus

Immunmodulation

Neben den Wechselwirkungen probiotischer Mikroorganismen mit der Mikrobiota, kommt es durch Stoffe wie Zellwandkomponenten und DNA auch zu einer direkten Beeinflussung des Immunsystems des Wirtstieres (Oelschlaeger, 2010). Diese Stoffe werden von membranständigen *pattern recognition receptors* (PRRs) auf Immunzellen des Wirtstieres erkannt und können daraufhin unterschiedliche Signalkaskaden einleiten (Oelschlaeger, 2010; Wells, 2011). Zu diesen PRRs zählt unter anderem der *toll like receptor 2* (TLR-2), welcher z. B. Zellwandbestandteile von Laktobazillen erkennen kann (Wells, 2011). Einige Milchsäurebakterien, wie u. a. *B. longum*, führten in verschiedenen Studien zu einem generell erhöhten Gehalt an intestinalem IgA (Takahashí *et al.*, 1998; Vitini *et al.*, 2000). Ein Therapieversuch von durch Rotaviren mit Durchfall erkrankten Kleinkindern mit *Lactobacillus GG* führte zu einer deutlichen Verkürzung des Krankheitsverlaufes. Damit ging eine signifikante Erhöhung der nicht-spezifischen humoralen Antwort während der akuten Phase der Infektion einher, was sich durch einen erhöhten Anteil an IgG, IgA und IgM äußerte (Kaila *et al.*, 1992). Die Einnahme von Joghurt und den darin enthaltenen *L. bulgaricus* und *S. thermophilus* führte in einer Studie von Solis Pereyra und Lemonnier (1993) zu einer erhöhten Cytokin-Produktion. *L. plantarum* war in Versuchen mit gnotobiotischen Ratten in der Lage, die Antikörperproduktion gegen *E. coli* zu erhöhen (Herias *et al.*, 1999).

Es wird davon ausgegangen, dass eine Anhaftung des Probiotikums an die intestinale Oberfläche nötig ist, um Einfluss auf das Immunsystem des Wirtstieres nehmen zu können (Salminen *et al.*, 1998; Lee, 1999; Corthésy *et al.*, 2007). Jedoch wurde in zahlreichen Studien demonstriert, dass über die Nahrung aufgenommene Probiotika nicht zu einem konstanten Teil der Mikrobiota des Wirtstieres werden, sondern diese nur über die Dauer der Supplementierung und kurze Zeit danach kolonisieren (Fuller, 1991; Tannock, 1997, 2002; Gardiner *et al.*, 2004; Klingberg und Budde, 2006).

In *in-vitro* Studien mit Caco-2 Zellen konnte gezeigt werden, dass verschiedene Laktobazillen stammabhängig die Produktion von pro- bzw. anti-inflammatorischen Cytokinen beeinflussen (Haller *et al.*, 2000). Hierdurch ist eine Mitregulation der intestinalen Immunantwort über das Epithelium denkbar (Lu und Walker, 2001; Delcenserie *et al.*, 2008). Durchflusszytometrische Untersuchungen verschiedener probiotischer Mikroorganismen auf das Vorkommen bestimmter IELs ergaben speziesspezifisch unterschiedlich immunmodulierende Wirkungen der Probiotika. Fütterungsversuche, bei denen das Futter von Sauen und Ferkeln mit

E. faecium SF68 supplementiert wurde, zeigten ein deutlich reduziertes Vorkommen zytotoxischer CD8+ T-Zellen im jejunalen Epithel sowie eine reduzierte IgG Konzentration im Blut (Scharek *et al.*, 2005). Der auch in dieser Studie verwendete *B. toyonensis* hatte hingegen einen potentiell immunstimulierenden Effekt. Bei der Supplementierung von Sauen und Ferkeln konnte hier eine zeitweise Erhöhung der Gesamt-Leukozyten, sowie der CD8+ zytotoxischen T-Zellen gemessen werden (Scharek *et al.*, 2007). Bei Versuchen mit abgesetzten Ferkeln konnte sowohl nach der Gabe von *B. toyonensis* als auch durch *S. boulardii* eine tendenziell erhöhte Anzahl an CD8+ sowie $\gamma\delta$ T-Zellen beobachtet werden (Van Briel, 2002).

Einfluss auf die Permeabilität der Darmschleimhaut und zelluläre Transportmechanismen

Diverse Studien weisen darauf hin, dass mikrobielle Präparate einen Einfluss auf die intestinale Barriere haben können. Untersuchungen mit isolierten Gewebeproben aus dem Jejunum von Schweinen, zeigten eine stimulierende Wirkung von Probiotika auf den transzellulären Nährstofftransport. Der Einsatz von *S. boulardii* und *B. toyonensis* führte dabei zu einer deutlich höheren Aufnahme von Glukose, bei *S. boulardii* im speziellen zusätzlich von der nicht-essentiellen Aminosäure Alanin (Breves *et al.*, 1997). Ussing-Kammer Untersuchungen mit isolierten jejunalen Darmepithelien wachsender Schweine zeigten eine signifikant niedrigere unidirektionale Mannitol Durchflussrate bei Tieren, die mit *S. boulardii* und *B. toyonensis* supplementiert wurden. Die Nettofluxraten blieben dabei unbeeinflusst und auch die Gewebeleitfähigkeit war mit der der Kontrolltiere vergleichbar (Winckler, 1997). Ähnliche Ergebnisse wurden nach dem Einsatz von *E. faecium* erzielt. Auch hier wurden deutlich geringere Durchflussraten für das radioaktiv markierte Mannitol beobachtet (Klingspor *et al.*, 2013). Im Rückschluss deutet dies auf eine erhöhte Barrierefunktion nach der Gabe der Probiotika hin. In Zellkulturstudien mit dem Mixpräparat VSL#3, welches verschiedene Milchsäurebakterien enthält, konnte zudem ein erhöhter transepithelialer Widerstand gemessen werden. Die in Verbindung damit vermutete Stabilisierung des Cytoskeletts, durch eine Stärkung der *tight junctions*, scheint dabei eine wichtige Rolle beim Erhalt der intestinalen Barriere zu spielen (Winckler *et al.*, 1998; Otte und Podolsky, 2004). Der probiotische *E. coli* Stamm Nissle 1917 wirkte in Zellkulturstudien ebenfalls stabilisierend auf die *tight junctions*, indem er die Signaltransduktion der Proteinkinase C abwandelt. Dadurch kommt es zu einer erhöhten Expression von ZO-2 (zonula occludens-2), einem der entscheidenden Faktoren für den Erhalt epithelialer *tight junctions* (Zyrek *et al.*, 2007; Fanning und Anderson, 2009).

2.6.3 Anforderungen an Probiotika als Futtermittelzusatzstoffe

Probiotika werden in der Tierernährung oftmals als Leistungsförder-Alternativen bezeichnet und sollen eine Alternative zum Antibiotikaeinsatz in der Tierhaltung darstellen. Um als Futtermittelzusatzstoff zugelassen zu werden, müssen Substanzen gewisse Anforderungen erfüllen. Die Eignung eines Stoffes wird durch die Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) im Rahmen der Verordnung (EG) 1831/2003 geprüft und ist von verschiedenen Kriterien abhängig. Die Zulassung eines Präparats ist dabei tierart- und stammspezifisch jeweils für zehn Jahre gültig und kann auf Antrag verlängert werden (Julliand, 2006). Zudem müssen die Eigenschaften und Risiken des jeweiligen Mikroorganismus in mehreren Studien untersucht worden sein (Kneifel, 2005). Im Folgenden sind einige Eigenschaften aufgelistet, welche probiotische Futtermittelzusatzstoffe aufweisen sollten (Tabelle 3):

Tabelle 3: Gewünschte Eigenschaften probiotischer Mikroorganismen

Eigenschaften

- Ausübung eines positiven Einflusses auf die Gesundheit des Wirtstieres
- Keine Gefahr für den Verzehr durch Menschen
- Fähigkeit zur Adhäsion an Darmepithelzellen, bzw. zum längeren Aufenthalt im Gastrointestinaltrakt
- Fähigkeit zur Modulierung des Immunsystems
- Hemmung pathogener Darmbakterien und Produktion antimikrobieller Substanzen
- Kein Beitrag zum Transfer von Antibiotikaresistenzen
- Unempfindlich gegenüber Magen- und Gallensäure, sowie Speichel-, Verdauungs- und Pankreasenzyme
- In großen Mengen produktionsfähig
- Widerstandsfähig gegen technologische Einflüsse wie Herstellung und Lagerung

(Fuller, 1989; Fuller, 1992; Gibson *et al.*, 1997; Collins und Gibson, 1999; Ouwehand *et al.*, 2002; Galdeano und Perdigon, 2004; Lauková *et al.*, 2004)

2.6.4 Probiotika in der Tierernährung

Seit dem europaweiten Verbot von antibiotischen Leistungsförderern im Tierfutter im Jahr 2006 (European Commission, IP/05/1687), werden Probiotika in der Nutztierhaltung vermehrt zu leistungs- und gesundheitsfördernden Zwecken eingesetzt. Hierbei wurde ein positiver Einfluss von Probiotika auf die Lebendmassezunahme, Futteraufnahme und -verwertung, sowie ein vermindertes Auftreten von Durchfallerkrankungen und eine reduzierte Sterblichkeitsrate in der Ferkelaufzucht festgestellt (Ohashi und Ushida, 2009; Socol *et al.*, 2010; Cho, 2011). Es werden verschiedene Mikroorganismen als dem Futter zugesetzte

Probiotika verwendet. Viele der unterschiedlichen Bakterien- und Hefespezies, die als Probiotikum in der Schweineaufzucht angewendet werden, sind dabei Teil der intestinalen Mikrobiota des Wirtstieres selbst (Jin *et al.*, 2000a; De Champs *et al.*, 2003; Quigley, 2010). Eine Liste der aktuell als Futtermittelzusatzstoffe zugelassenen Probiotika ist in Tabelle 4 dargestellt. Diese Mikroorganismen werden in unterschiedlicher Form verabreicht, als vegetative Zellen oder, wie im Falle der Bazillus-Präparate, als Sporen. Bazillus-Sporen gelten hierbei als die stabilste Form, da sie sowohl hitzeresistent sind als auch längere Lagerzeiten, sowie die Passage des sauren Magenmilieus schadfrei überstehen (Simon *et al.*, 2005). Da durch ein einzelnes Probiotikum in der Regel nicht alle gewünschten Eigenschaften (Tabelle 3) erfüllt werden, gibt es auf dem Markt sowohl Einzel- als auch Kombinationspräparate.

Tabelle 4: Liste der gegenwärtig in der EU als Futtermittelzusatzstoffe zugelassenen Mikroorganismen (European Union Register of Feed Additives. Edition 224. Annex I, Stand: 19.07.2016)

EG-Nr.	Zusatzstoff	Tierart
E 1700	<i>B. licheniformis</i> (DSM 5749), <i>B. subtilis</i> (DSM 5750) (im Verhältnis 1:1)	Masthühner, Kälber, Sauen, Ferkel, Mastschweine
E 1702/ 4b 1702	<i>S. cerevisiae</i> (NCYC Sc 47)	Mastrinder, Milchkühe, Mastlamm, Ferkel (abgesetzt), Sauen
E 1703	<i>S. cerevisiae</i> (CNCM I-1079)	Ferkel, Sauen
4a 1704	<i>S. cerevisiae</i> (CBS 493.94)	Pferde, Milchkühe, Mastrinder, Kleinvieh
E 1705/ 4b 1705	<i>E. faecium</i> (NCIMB 10415)	Ferkel, Mastschweine, Sauen
4b 1706	<i>E. faecium</i> (DSM 7134), <i>L. rhamnosus</i> (DSM 7133)	Kälber
E 1707/ 4b 1707	<i>E. faecium</i> (DSM 10663/NCIMB 10415)	Kälber, Masthühner, Ferkel, Hunde
4b 1708	<i>E. faecium</i> (NCIMB 11181)	Kälber, Ferkel (abgesetzt)
4b 1710	<i>S. cerevisiae</i> (MUCL 39885)	Sauen, Ferkel (abgesetzt), Milchkühe, Mastrinder, Pferde
E 1711/ 4a 1711/ 4b 1711	<i>S. cerevisiae</i> (CNCM I-1077)	Milchkühe, Mastrinder, Pferde, Lamm, Ziege, Schaf
E 1712/ 4d 1712	<i>P. acidilactici</i> (CNCM MA 18/5 M)	Mastschweine, Ferkel (abgesetzt), Masthühner, Legehennen, Fisch
E 1713/ 4b 1713	<i>E. faecium</i> (CECT 4515)	Ferkel (abgesetzt), Masthühner
E 1714	<i>L. farciminis</i> (CNCM MA 67/AR)	Ferkel (abgesetzt)
E 1715/ 4b 1715	<i>L. acidophilus</i> (D2/CSL CECT 4529)	Legehennen

4b 1820	<i>B. subtilis</i> (DSM 15544)	Ferkel (abgesetzt), Masthühner, Legehennen
4b 1821	<i>B. subtilis</i> (DSM 17299)	Masthühner
4b 1822	<i>B. amyloliquefaciens</i> (CECT 5940)	Masthühner
4b 1823	<i>B. subtilis</i> (ATCC PTA-6737)	Sauen, Ferkel (abgesetzt), Masthühner, Legehennen, Mastenten, Mastgänse, u. a.
4b 1824	<i>B. subtilis</i> (CBS 117162)	Mastschweine, Ferkel (abgesetzt)
4b 1830	<i>C. butyricum</i> (FERM-BP 2789)	Ferkel (abgesetzt), Masthühner, Legehennen
22/ 4b1841	<i>E. faecium</i> (DSM 7134)	Sauen, Mastschweine, Ferkel (abgesetzt), Masthühner, Legehennen
4b 1850	<i>E. faecium</i> (DSM 3530)	Masthühner
4b 1871	<i>S. cerevisiae</i> (NCYC R404)	Milchkühe
4b 1872	<i>S. cerevisiae</i> (NCYC R625)	Ferkel (abgesetzt)
4b 1890	<i>B. animalis</i> (DSM 16284), <i>L. salivarius</i> (DSM 16351), <i>E. faecium</i> (DSM 21913)	Masthühner, Legehennen
4b 1891	<i>E. faecium</i> (NBIMCC 8270), <i>L. acidophilus</i> (NBIMCC 8242), <i>L. helveticus</i> (NBIMCC 8269), <i>L. delbrueckii ssp. lactis</i> (NBIMCC 8250), <i>L. delbrueckii</i> (NBIMCC 8244), <i>S. thermophilus</i> (NBIMCC 8253)	Saugferkel
4d 2	<i>L. rhamnosus</i> (CNCM-I-3698), <i>L. farciminis</i> (CNCM-I-3699)	Ferkel
12	<i>L. farciminis</i> (CNCM MA 67/4R)	Masthühner, Legehennen

B. licheniformis, *Bacillus licheniformis*; *S. cerevisiae*, *Saccharomyces cerevisiae*; *E. faecium*, *Enterococcus faecium*; *L. rhamnosus*, *Lactobacillus rhamnosus*; *P. acidilactici*, *Pediococcus acidilactici*; *C. butyricum*, *Clostridium butyricum*; *S. thermophilus*, *Streptococcus thermophilus*

2.6.5 Bazillussporen als probiotische Futtermittelzusatzstoffe

Zu der Gattung *Bacillus* zählen Sporen-bildende, grampositive Stäbchenbakterien der Größe 0,5 - 2,5 x 1,2 - 10 µm, welche aerob und fakultativ anaerob wachsen können (Coonrod *et al.*, 1971; Hallmann und Burkhardt, 1974). Die verschiedenen, als Probiotika eingesetzten Mikroorganismen zeigen eine unterschiedliche Temperatur- und Lagerungsstabilität. Bazillussporen sind hitzestabil, überstehen lange Lagerungen sowie das saure Milieu des Magens. Die Rate der Sporen, die trotz all dieser Widrigkeiten überlebt, liegt, je nach Gattung, bei bis zu 95 % (Simon *et al.*, 2005). Sie sind damit deutlich stabiler, als z. B. Laktobazillen oder Bifidobakterien, welche als vegetative Zellen eingesetzt werden und zählen insgesamt zu den stabilsten Futtermittelzusatzstoffen (Simon *et al.*, 2005).

2.6.6 *Bacillus toyonensis*

Der penicillin-resistente *Bacillus cereus* ist als Mastitiserreger bei Kühen bekannt (Jones und Turnbull, 1981). Zudem werden ihm Durchfallerkrankungen und Erbrechen nach Lebensmittelinfektionen beim Menschen zugeschrieben (Rolle und Mayr, 2007), wobei jedoch die Aufnahme von hohen Keimzahlen vorausgesetzt ist. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten *Bacillus toyonensis* handelt es sich um einen apathogenen Stamm der Art *B. cereus* (Van Briel, 2002). *B. toyonensis* ist, wie die anderen *B. cereus* Spezies auch, kein Teil der natürlichen Darmmikrobiota des Schweines. Er zählt zu den Sporen-formenden, aeroben Bodenbakterien (Sneath, 1986). Unter ungünstigen Bedingungen, wie Nährstoffmangel, Hitze, Trockenheit, Kälte oder der Anwesenheit von dem Organismus schadenden Chemikalien, bildet er seine Dauerform, eine Endospore (Abbildung 1). Dieser Vorgang wird als Sporulation bezeichnet. Seine Sporen keimen bereits im Magen und Dünndarm abgesetzter Ferkel (Vanbelle *et al.*, 1990; Jadamus *et al.*, 2001). Nach der Überwindung des recht sauren Magenmilieus gehen sie in ihren vegetativen Zustand über, sobald sie das alkalische Darmmilieu erreicht haben, um dort stoffwechselaktiv zu werden (Kuether, 1987; Thelen *et al.*, 2004). Zudem haben Studien gezeigt, dass *B. toyonensis* Sporen auch nach der ersten Keimung dazu in der Lage sind, erneut zu sporulieren. Dies deutet darauf hin, dass *B. toyonensis* diesen Zyklus möglicherweise mehrfach während der Darmpassage durchläuft (Jadamus *et al.*, 1999). Keimt die Spore zur vegetativen Zelle aus, kommt es zur Produktion von Stoffwechselprodukten wie u. a. organischen Säuren wie Dipicolinsäure (Goodacre *et al.*, 2000). Dies führt zu einer Reduktion des pH-Wertes (Guth, 2007). *In-vitro* Studien konnten zudem Acetat, Propionat, Laktat, Succinat und Citrat als Stoffwechselmetabolite nachweisen (Sneath, 1986). In seiner vegetativen Form ist der Organismus ca. 3 - 5 µm lang, 1 µm breit und beweglich.

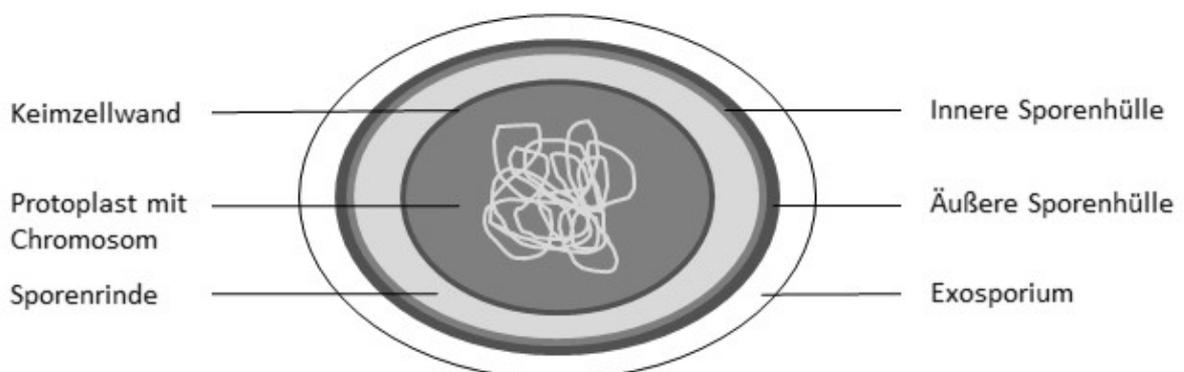


Abbildung 1: Schematischer Aufbau einer Bazillusspore. Modifiziert nach (Paredes-Sabja *et al.*, 2011) und McKenney *et al.* (2013).

2.6.6.1 Einsatz als Futtermittelzusatz

B. toyonensis wurde über viele Jahre auch in der Schweineproduktion verwendet. Hierbei äußerte sich die probiotische Wirkung u. a. durch eine erhöhte Lebendmassezunahme, verbesserte Futtermittelverwertung, sowie eine Reduktion der Durchfallhäufigkeit und Ferkelsterblichkeit (Gedek *et al.*, 1993; Kirchgessner *et al.*, 1993; Alexopoulos *et al.*, 2001; Baum *et al.*, 2002; Taras *et al.*, 2005; Kantas *et al.*, 2015).

Studien mit Mäusen haben zudem eine immunmodulierende Wirkung dieser Bazillusspezies gezeigt, die sich durch eine erhöhte Expression der Cytokine TNF- α and IFN- γ äußerte (Braat *et al.*, 2004). Fütterungsversuche mit *B. toyonensis* beim Schwein zeigten ebenfalls einen stimulierenden Einfluss des Probiotikums auf die systemische Immunität bei Ferkeln (Schierack *et al.*, 2007). In einer Studie mit Sauen und Ferkeln, deren Futter mit *B. toyonensis* ergänzt wurde, konnte zudem eine erhöhte Anzahl CD8 positiver Lymphozyten im jejunalen Epithel abgesetzter Ferkel beobachtet werden (Scharek *et al.*, 2007). Auf welchem Mechanismus diese Immunmodulation beruht, ist bislang nicht vollständig geklärt. Doch wie fast alle *Bacillus* Spezies produziert auch *B. toyonensis* Hämolysin, welches eine lytische Aktivität auf Epithelzellen ausübt (Beecher *et al.*, 1995; Prüss *et al.*, 1999; EFSA, 2012). In Reaktion auf die Produktion von Stressmolekülen durch die Enterozyten, könnte dies wiederum im Zusammenhang mit einer Aktivierung der IELs stehen (Scharek *et al.*, 2007; Schierack *et al.*, 2007).

2.6.6.2 Zulassung als Futtermittelzusatz

B. toyonensis wurde 1994, damals noch unter der Bezeichnung *B. cereus* var. *Toyoi*, durch die Europäische Kommission als Futtermittelzusatz beim Schwein und Ferkel zugelassen. In Deutschland wurde das Probiotikum unter dem Markennamen ToyoCerin® (NCIMB 40112) durch die Lohmann Animal Health GmbH & Co. KG vertrieben.

Im Jahr 2001 bestätigte das *Scientific Committee of Animal Nutrition* (SCAN), dass ToyoCerin® keine der Toxine produziert, die in anderen *B. cereus* Stämmen vorkommen. Außerdem wurde kein Transfer von Antibiotikaresistenzen auf andere Bakterien nachgewiesen und der Einsatz bei Nutztieren wurde als sicher eingestuft (European Commission, 2001). Diverse Lang- und Kurzzeitfütterungsversuche an Hasen, Kälbern, Hühnern, Puten und Schweinen stimmten dabei mit dieser Einschätzung überein (Williams *et al.*, 2009).

Zudem erhielt ToyoCerin® 2009 vom amerikanischen Gesundheitsministerium die Zusatzbezeichnung „*generally recognized as safe*“ in Form eines GRAS Zertifikats.

Die Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) veröffentlichte 2012 ein wissenschaftliches Gutachten zur Sicherheit und Wirksamkeit von ToyoCerin® (EFSA, 2012).

Darin bestätigen sie den positiven Einfluss von ToyoCerin® auf die Leistungsparameter bei Hühnern, Schweinen, Hasen und Rindern. Zudem konnte aber durch die Sequenzierung des Gesamtgenoms u. a. gezeigt werden, dass der Bazillus alle vier Hämolyisin BL (Hbl) kodierenden Gene trägt. Dabei handelt es sich um ein Enterotoxin mit lytischer Aktivität, welches auch von pathogenen *B. cereus* Stämmen produziert wird (Beecher *et al.*, 1995; Prüss *et al.*, 1999). Des Weiteren konnten Antibiotikaresistenzen gegen Tetracycline und Chloramphenicol nachgewiesen werden. Insbesondere die Resistenz gegen Chloramphenicol wurde dabei in Zusammenhang mit der Präsenz des *catQ* Gens gebracht, welches wiederum bei pathogenen Bakterienstämmen, wie *C. perfringens*, *C. difficile*, *S. pneumoniae* and *S. pyogenes*, für die Entwicklung einer Chloramphenicolresistenz verantwortlich ist (Rood *et al.*, 1989; Mingoia *et al.*, 2007; Roberts und Schwarz, 2009; Del Grosso *et al.*, 2011). Zusammengenommen schloss die EFSA daraus, dass es sich bei der Chloramphenicolresistenz, um eine erworbene Resistenz handelt und entschied aufgrund eines möglichen Resistenztransfers, dass es nicht ratsam sei, ToyoCerin® an Nutztiere zu verfüttern (EFSA, 2012). Basierend auf dieser Einschätzung setzte die Europäische Kommission eine neue Regelung in Kraft (288/2013), mit welcher die Verwendung von ToyoCerin® bei Nutztieren europaweit untersagt wurde (European Commission, 2013).

Die Firma Rubinum, Hersteller von ToyoCerin®, reichte Ende 2013, wie in der Regelung 288/2013 festgelegt, neue Daten bezüglich der Sicherheit des Produktes ein. Darunter befand sich u. a. eine Studie, laut derer der Mikroorganismus als neue *Bacillus* Spezies klassifiziert werden sollte (Jimenez *et al.*, 2013). Der Name *Bacillus toyonensis* wurde 2014 offiziell bestätigt und publiziert (Oren, 2014). Basierend auf Genomanalysen entschied die EFSA, dass es sich trotz der neuen Klassifizierung, immer noch zweifellos um ein Mitglied der *B. cereus* Gruppe handelt (EFSA, 2014). Neue Daten bezüglich der Antibiotikaresistenzen wurden vom Ausschuss Zusatzstoffe, Erzeugnisse und Stoffe in der Tierernährung (FEEDAP), als unzureichend befunden. Die Präsenz der beiden Gene *catQ* und *tet(M)* konnte zwar auch bei weiteren, nahe verwandten Stämmen nachgewiesen werden, keiner dieser Stämme zeigte jedoch eine Resistenz gegen Chloramphenicol oder Tetracycline. Demnach ließ sich mit diesen Daten eine erworbene Resistenz nicht ausschließen (EFSA, 2014). Zudem zeigten Versuche mit intestinalen Mauszelllinien, dass ToyoCerin® in seiner Toxizität mit anderen pathogenen *B. cereus* Stämmen vergleichbar ist (Doll *et al.*, 2013). Die von Rubinum vorgelegten Ergebnisse konnten eine Funktionalität der Enterotoxin kodierenden Gene nach den neuesten Richtlinien der EFSA nicht ausschließen (EFSA, 2014). Zusammengenommen wurde zwar eine positive Auswirkung von ToyoCerin® auf die Leistung von Absetzferkeln nochmals bestätigt, jedoch ist der Einsatz des Präparats als Futterzusatz bis heute europaweit weiterhin untersagt (EFSA, 2014).

2.7 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurde der Einfluss des probiotischen Bakteriums *Bacillus toyonensis* auf das jejunale Epithel beim Schwein untersucht. Der Einsatz dieses Probiotikums führte bereits in zahlreichen Studien zu einer Gesundheits- und Leistungsförderung bei Schweinen. Zu den bekannten Wirkmechanismen von Probiotika zählt die Modulation der Immunantwort im Tier. Frühere Studien deuteten auch bei *B. toyonensis* auf eine immunmodulierende Funktion hin. Der genaue Wirkmechanismus konnte bisher jedoch nicht geklärt werden.

In dieser Arbeit sollte daher ein potentieller Einfluss von *B. toyonensis* auf die intestinale Integrität der Darmschranke, sowie mögliche morphologische Veränderungen des Darmepithels untersucht werden und mit der Entwicklung verschiedener intraepithelialer Immunzellpopulationen in Zusammenhang gebracht werden. Hierbei stand vor allem die mit physiologischem Stress verbundene Phase des Absetzens im Fokus. Anhand von Expressionsanalysen des Natürlichen Killerzellen Rezeptors NKG2D wurde zudem die Rolle einzelner Lymphozytenpopulationen in der immunologischen Abwehrfunktion beim Ferkel untersucht.

3 Material und Methoden

3.1 Tierversuch

3.1.1 Haltung, Fütterung und Probennahme der Tiere in der Probiotikastudie

Die Haltung der Schweine wurde in den Stallungen des Instituts für Tierernährung der Freien Universität Berlin unter der Genehmigungsnummer G 0284 / 11 durchgeführt.

Für den ersten Versuchsdurchgang wurden insgesamt 40 Ferkel von acht Sauen eingesetzt. Die Deutsche Landrasse Sauen wurden vom Bundeshybridzuchtprogramm (BHZP, Dahlenburg-Ellringen, Deutschland) gekauft. Die Sauen wurden gegen das porcine Circovirus (PCV), das porcine Parvovirus (PPV) und Schweinerotlauf geimpft, die Ferkel blieben ungeimpft. Es wurden jeweils vier tragende Sauen der Kontroll- und der Probiotikagruppe zugeordnet. Diese wurden ab dem 90. Tag ante partum (a. p.) mit einer Soja-freien Diät ernährt, um eine spätere Übertragung Soja-spezifischer Antikörper auf die Ferkel zu minimieren (Li *et al.*, 1991). Die Sauen der Versuchsgruppe erhielten ab dem 90. Tag a. p., sowie während der Säugeperiode, $3,5 \times 10^8$ KBE / kg *B. toyonensis* Sporen über das Futter. Die Ferkel dieser Gruppe erhielten über ihre Diät ab dem 14. Lebenstag $1,5 \times 10^9$ KBE / kg *B. toyonensis* über das Beifutter (Tabelle 5). Das Futter der Kontrolltiere wurde nur mit dem Trägerstoff (CaCO₃) versetzt. Die Zusammensetzung der Diäten ist in Tabelle 5 dargestellt. Alle Ferkel wurden mit Soja-haltigem Futter ernährt. Die Sauen und Ferkel der Kontrollgruppe wurden räumlich getrennt von den Tieren der Versuchsgruppe, unter identischen räumlichen und klimatischen Bedingungen gehalten. Die Ferkel wurden an Tag 28 post partum (p. p.) abgesetzt. Der jeweilige Wurf der einzelnen Sauen blieb bis zum Ende des Versuchs gemeinsam im gleichen Stall. Zur Darstellung eines zeitlichen Verlaufs verschiedener Parameter während der Absetzphase wurde von jeweils fünf Ferkeln aus beiden Gruppen zu vier verschiedenen Zeitpunkten Probenmaterial gewonnen (Abbildung 2). Dies geschah jeweils im Alter von 17, 32, 34 und 39 Tagen, also sowohl vor als auch nach dem Absetzen. Hierfür wurden die Tiere nach der Entnahme von Fäzesproben zunächst mit Ketaminhydrochlorid (Ursotamin, Serumwerk Berbburg AG, Deutschland) und Azaperon (Stresnil, Jansen-Cilag, Neuss, Deutschland) intramuskulär narkotisiert (0,2 mL / 0,1 mL / kg Körpermasse). Anschließend wurde durch Punktierung des Herzens kardiales Blut genommen (7,5 mL / Tier) und in heparinisierten Röhrchen (16 I.E. Heparin / mL Blut) gesammelt. Daraufhin wurden die Tiere durch die intrakardiale Applikation von Embutramid (T61, Intervet, Unterschleißheim, Deutschland) euthanasiert. Für spätere Arbeiten wurden zudem Gewebeproben des mittleren Jejunums in folgender Reihenfolge entnommen: 2 cm für Genexpressionsanalysen per qRT-PCR, 15 cm zur Isolierung intraepithelialer Lymphozyten, 2 cm zur Bestimmung der absoluten

Zahl der Immunzellen pro Strecke Darmepithel per Immunhistochemie, sowie 5 cm zur Messung der HRP-Durchlässigkeit des Darmepithels mittels Ussing-Kammer.

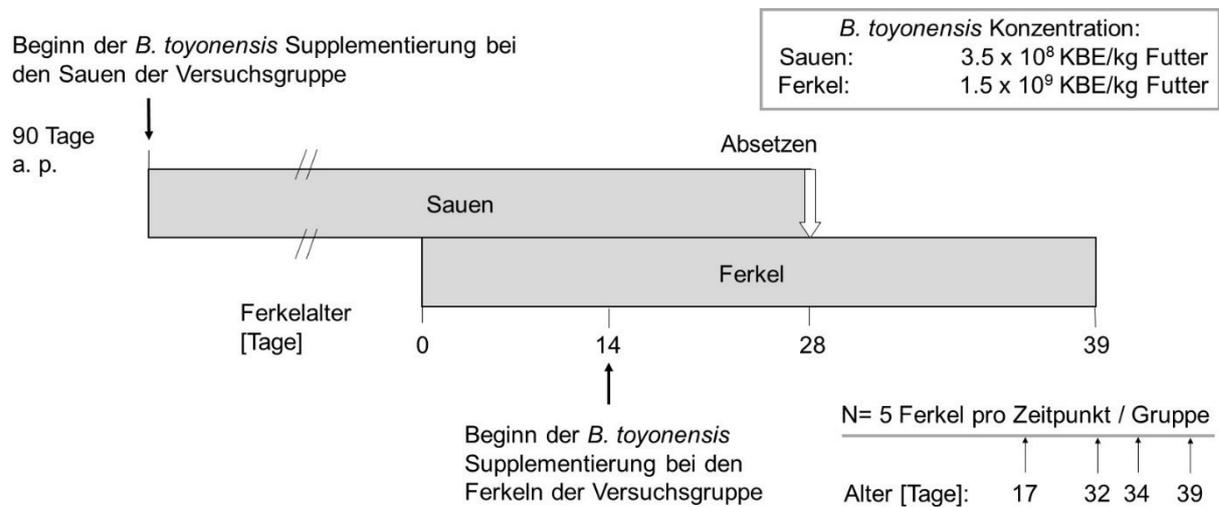


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus der Probiotikastudie

Dargestellt sind die Konzentrationen sowie der jeweilige Startzeitpunkt der *B. toyonensis* Supplementierung bei den Sauen und Ferkeln der Versuchsgruppe, sowie die Zeitpunkte der Probennahme.

3.1.2 Haltung und Fütterung der Ferkel der Antikörper-Aktivierungsstudie

In einem zweiten Tierversuch, mithilfe dessen das Aktivierungspotential des CD3 Antikörpers untersucht wurde, wurden insgesamt fünf, acht Wochen alte Ferkel eingesetzt. Diese erhielten standardisiertes Saugferkelbeifutter (Tabelle 6). Die Ferkel wurden an Tag 24 p. p. abgesetzt und erhielten anschließend bis zum Versuchsende Ferkelaufzuchtfutter (Tabelle 7). Die Haltungsbedingungen, sowie der Euthanasievorgang entsprachen hier denen des ersten Versuchsdurchgangs. Die Probengewinnung beschränkte sich in diesem Versuch auf die Entnahme kardialen Blutes (30 mL / Tier), sowie ca. 20 cm des mittleren Jejunums zur anschließenden Isolierung intraepithelialer Lymphozyten.

3.1.3 Versuchsfutter und Fütterung

Die Berechnung und Mischung der unterschiedlichen Versuchsdäten erfolgten am Institut für Tierernährung der Freien Universität Berlin. Hierbei beruhte die Kalkulation der Nährstoffzusammensetzung auf den Empfehlungen der Gesellschaft für Ernährungsphysiologie (GfE, 2006). Die Ferkel der Probiotikastudie hatten, ab einem Alter von 14 Tagen, Zugang zum entsprechenden Saugferkelbeifutter (Tabelle 5), welches den Tieren bereits vor dem Absetzen angeboten wurde. Die genaue Zusammensetzung der Versuchsdäten sind Tabelle 6 und Tabelle 7 zu entnehmen.

Tabelle 5: Zusammensetzung des Saugferkelbeifutters der Probiotikastudie (Tag 14-28)

Inhaltsstoff	%
Weizen	39
Gerste	30
Sojaextraktionsschrot (44 % XP)	23,2
Kohlensaurer Futterkalk	2
Sonnenblumenöl	1,75
Mineralfutter*	1,5
Maisschrot	1
Monocalciumphosphat	1
L-Lysin-HCl	0,25
Viehsalz	0,2
DL Methionin	0,1
Toyocerin®**	0,1

* Zusammensetzung pro kg Premix: 400000 U Vit. A; 40000 U Vit. D₃; 8000 mg Vit. E (α -Tocopherolacetat); 300 mg Vit. K₃; 250 mg Vit. B₁; 250 mg Vit. B₂; 2500 mg Nikotinsäure; 400 mg Vit. B₆; 2000 μ g Vit. B₁₂; 25000 μ g Biotin; 1000 mg Pantothen säure; 100 mg Folsäure; 80000 mg Cholinchlorid; 5000 mg Zn (Zinkoxid); 1000 mg Cu (Kupfersulfat-pentahydrat); 2000 mg Fe (Eisencarbonat); 45 mg J (Calciumjodat); 30 mg Co (Cobalt- (II)-sulfat-heptahydrat); 35 mg Se (Natriumselenit); 130 g Na (Natriumchlorid); 55 g Mg (Magnesium oxid).

** 1g Toyocerin® / kg Futter

Tabelle 6: Zusammensetzung des Saugferkelbeifutters der Antikörper-Aktivierungsstudie (Tag 14-28)

Inhaltsstoff	%
Weizen	45
Sojaextraktionsschrot (44 % XP)	26
Magermilchpulver	12
Optigrain	10,6
Monocalciumphosphat	1,5
Mineralfutter*	1,3
Kohlensaurer Futterkalk	1,2
Maisschrot	1
Sojaöl	1
L-Lysin	0,3
DL Methionin	0,1

* Zusammensetzung pro kg Premix: 400000 U Vit. A; 40000 U Vit. D₃; 8000 mg Vit. E (α -Tocopherolacetat); 300 mg Vit. K₃; 250 mg Vit. B₁; 250 mg Vit. B₂; 2500 mg Nikotinsäure; 400 mg Vit. B₆; 2000 μ g Vit. B₁₂; 25000 μ g Biotin; 1000 mg Pantothen säure; 100 mg Folsäure; 80000 mg Cholinchlorid; 5000 mg Zn (Zinkoxid); 1000 mg Cu (Kupfersulfat-pentahydrat); 2000 mg Fe (Eisencarbonat); 45 mg J (Calciumjodat); 30 mg Co (Cobalt- (II)-sulfat-heptahydrat); 35 mg Se (Natriumselenit); 130 g Na (Natriumchlorid); 55 g Mg (Magnesium oxid)

Tabelle 7: Zusammensetzung des Ferkelaufzuchtsfutters der Antikörper-Aktivierungsstudie

Inhaltsstoff	%
Gerstenschrot	29,95
Maisschrot	24,77
Sojaextraktionsschrot (44 % XP)	23,41
Weizenschrot	13,7
Sojaöl	3,22
Monocalciumphosphat	1,28
Mineralfutter*	1,2
Kohlensaurer Futterkalk	1,18
Maisstärke	0,75
Lysin	0,35
DL-Methionin	0,12
L-Tryptophan	0,04
L-Threonin	0,03

* Zusammensetzung pro kg Premix: 400000 U Vit. A; 40000 U Vit. D₃; 8000 mg Vit. E (α -Tocopherolacetat); 300 mg Vit. K₃; 250 mg Vit. B₁; 250 mg Vit. B₂; 2500 mg Nikotinsäure; 400 mg Vit. B₆; 2000 μ g Vit. B₁₂; 25000 μ g Biotin; 1000 mg Pantothen säure; 100 mg Folsäure; 80000 mg Cholinchlorid; 5000 mg Zn (Zinkoxid); 1000 mg Cu (Kupfersulfat-pentahydrat); 2000 mg Fe (Eisencarbonat); 45 mg J (Calciumjodat); 30 mg Co (Cobalt- (II)-sulfat-heptahydrat); 35 mg Se (Natriumselenit); 130 g Na (Natriumchlorid); 55 g Mg (Magnesium oxid)

3.1.4 Lebendmassezunahme

Die Tiere wurden beim Einstellen und bis zum Zeitpunkt des Absetzens nach 28 Tagen einmal pro Woche gewogen (DE Plattformwaage DE12K1N, Kern und Sohn GmbH, Balingen, Deutschland). Die mittlere Lebendmassezunahme wurde dann rechnerisch mithilfe der Körpergewichtsdaten ermittelt.

3.1.5 Keimzahlbestimmung

Die Bestimmung der koloniebildenden Einheiten (KBE) von *B. toyonensis* in den Fäzesproben der 40 Ferkel der Probiotikastudie erfolgte mithilfe des Oberflächenverfahrens. Hierfür wurden die eisgekühlten Proben zunächst 1:10 mit Peptonwasser (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) verdünnt, für 15 min bei Raumtemperatur gerührt und anschließend für 10 min bei 80 °C inkubiert. Daraufhin wurde unter sterilen Bedingungen eine dekadische Verdünnungsreihe, ebenfalls mit Peptonwasser als Verdünnungsmedium, hergestellt. Im Oberflächenspatelverfahren wurden jeweils 100 μ L einer Verdünnungsstufe auf eine Platte mit

PEMBA-Medium (Lab M, Heywood, UK), ein spezifisches *Bacillus cereus* Selektionsmedium, aufgebracht. Nach zweitägiger Inkubation bei 30 °C unter anaeroben Bedingungen wurden die geeigneten Verdünnungsstufen ausgezählt und die Koloniebildenden Einheiten berechnet.

$$\text{KBE / g Probe} = \frac{10 \times \text{Summe der gezählten Kolonien}}{\text{Summe der ausgezählten Verdünnungsstufen}}$$

3.2 Elektrophysiologische Methoden

3.2.1 HRP-Durchlässigkeit des jejunalen Epithels

Um die Funktionalität der Darmschranke zu untersuchen, wurde eine vereinfachte Ussing-Kammer-Technik nach Ussing und Zerahn (1951) durchgeführt. Hierfür wurde sofort nach der Probennahme ein 5 cm langes Stück des Jejunums in einen gekühlten und mit Carbogen (95 % O₂; 5 % CO₂) begasten modifizierten Krebs-Henseleit-Puffer überführt (Tabelle 8). Anschließend wurden die Gewebestücke von den serosalen Anteilen des Gewebes getrennt und das isolierte Epithel anschließend in die Ussing-Kammern mit einer Kontaktfläche von 1,31 cm² eingespannt. In den beiden Kammern befanden sich jeweils 15 mL 38 °C warmer Puffer, der beide Seiten des Gewebestückes kontinuierlich umspülte. Um die Zirkulation und Sauerstoffversorgung sicher zu stellen, wurden beide Kammern durchgehend mit Carbogen begast. Um den parazellulären Fluss zu bestimmen, wurde eine Endkonzentration von 0,4 mg / mL Meerrettichperoxidase (HRP, 10 mg / mL, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) in der Kammer auf der mukosalen Seite des Gewebestückes eingesetzt. Der Aufbau einer Ussing-Kammer ist schematisch in Abbildung 3 dargestellt. Für jedes Tier wurden insgesamt drei Ussing-Kammern verwendet. Nach 30, 60, 90 und 120 min wurden jeweils 2 mL Probe aus der Kammer der serosalen Seite entnommen und bei -80 °C eingefroren. Die HRP-Konzentration in der Kammer der serosalen Seite repräsentiert hierbei die Durchlässigkeit des Gewebes (Wijten *et al.*, 2011).

Die HRP-Konzentration wurde mithilfe des QuantaBlu Fluorogenic Peroxidase Substrate Kits (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) bestimmt. Hierfür wurde aus der HRP Stammlösung (10 mg / mL) und dem verwendeten Krebs-Henseleit-Puffer eine Standardreihe hergestellt. Von den auf serosaler Seite entnommenen Proben wurden jeweils 5 µL pro *well* auf einer 96-*well* Platte (Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland) eingesetzt. Die Reaktion wurde anschließend durch Zugabe von 100 µL der mitgelieferten Substratlösung gestartet und nach 30 min leichtem Schütteln im Dunkeln durch Zugabe von 100 µL mitgelieferter Stopplösung beendet. Nach etwa 10 min wurde die Emission bei einer Wellenlänge von 410 nm mit dem Tecan infinite 200 Plattenlesegerät gemessen (Tecan, Männedorf, Schweiz).

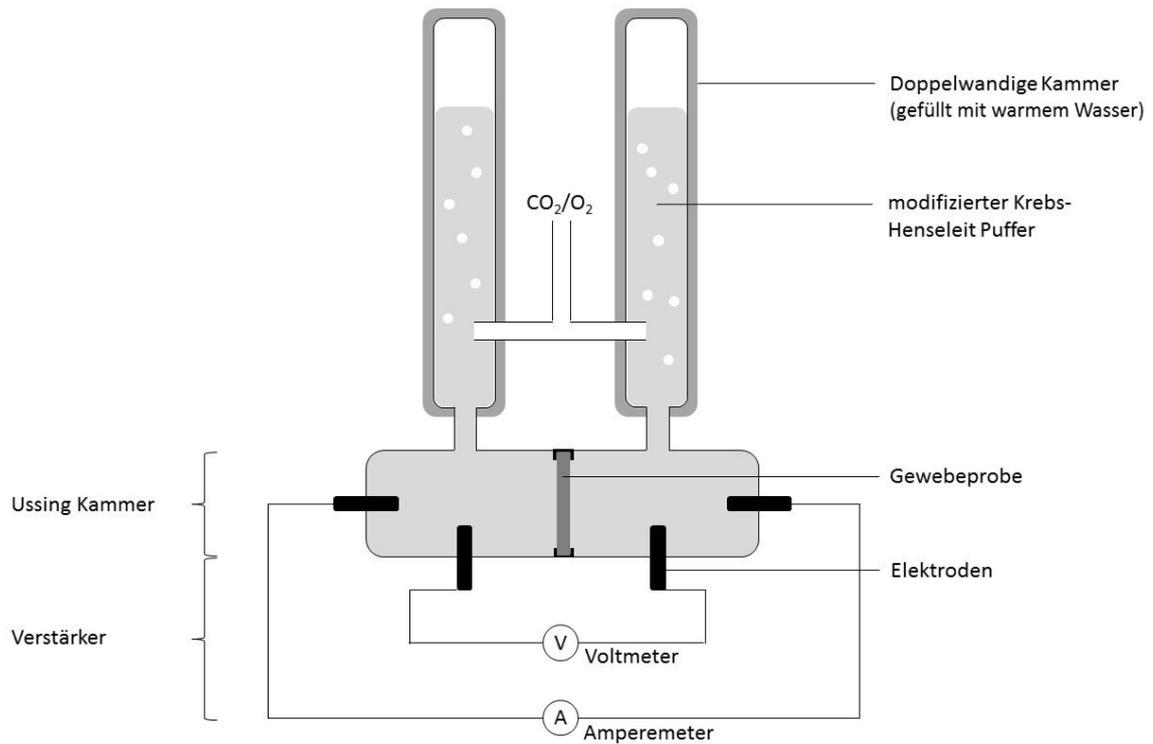


Abbildung 3: Schematischer Aufbau einer Ussing-Kammer

Tabelle 8: Zusammensetzung des für die Ussing-Kammer verwendeten modifizierten Krebs-Henseleit Puffers (pH = 7,4)

Bestandteile	mmol/l
CaCl ₂ * 2 H ₂ O (Kalziumchloriddihydrat)	1,5
MgCl ₂ * 6 H ₂ O (Magnesiumchloridhexahydrat)	1,2
Na ₂ HPO ₄ * 12 H ₂ O (Dinatriumhydrogenphosphat)	2,4
NaH ₂ PO ₄ * H ₂ O (Natriumdihydrogenphosphat)	0,6
NaHCO ₃ (Natriumhydrogencarbonat)	25,0
KCl (Kaliumchlorid)	5,0
NaCl (Natriumchlorid)	115,0
C ₆ H ₁₄ O ₆ (Mannitol)	2,0
C ₆ H ₁₂ O ₆ (Glukose)	10,0

Tabelle 9: Für die HRP-Durchflussmessung verwendete Geräte und Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller	Ort, Staat
96 well Platte Half Area, schwarz	Greiner bio-one	Frickenhausen, Deutschland
C ₂₁ H ₂₄ O ₁₀ (Phlorizin)	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
C ₆ H ₁₂ O ₆ (Glucose)	Merck	Darmstadt, Deutschland
C ₆ H ₁₄ O ₆ (Mannitol)	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
C ₆ H ₁₅ ClN ₂ O ₂ (Carbachol)	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
CaCl ₂ * 2 H ₂ O (Kalziumchloriddihydrat)	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
KCl (Kaliumchlorid)	Merck	Darmstadt, Deutschland
Meerrettichperoxidase (HRP; 250 U)	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
MgCl ₂ * 6 H ₂ O (Magnesiumchloridhexahydrat)	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Na ₂ HPO ₄ * 12 H ₂ O (Dinatriumhydrogenphosphat)	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
NaCl (Natriumchlorid)	Merck	Darmstadt, Deutschland
NaHCO ₃ (Natriumhydrogencarbonat)	Merck	Darmstadt, Deutschland
QuantaBlu Fluorogenic Peroxidase Substrate Kit	Thermo Scientific	Waltham, MA, USA
Tecan infinite 200 Plattenlesegerät	Tecan	Männedorf, Schweiz

3.3 Immunologische Methoden

3.3.1 Isolierung intraepithelialer Lymphozyten aus jejunalem Epithel

Die Isolierung der intraepithelialen Lymphozyten (IEL) erfolgte aus einem 15 - 20 cm langen Stück des proximalen Jejunums der Versuchstiere im Alter von 32, 34 und 39 Tagen. Hierfür wurden zunächst die Peyerschen Platten entfernt. Das Gewebestück wurde anschließend längs aufgetrennt und in *Hanks balanced salt solution* mit Dithiothreitol (HBSS-DTT) überführt und dort für fünf Minuten bei 37 °C und einer Geschwindigkeit von 110 rpm auf einem Orbitalschüttler inkubiert. Daraufhin wurde das Medium durch HBSS-EDTA ersetzt und für weitere 30 min bei 37 °C geschüttelt. Anschließend wurde das Medium gesammelt, bei 4 °C und 500 g für 10 Minuten zentrifugiert und das Sediment in ca. 5 mL HBSS aufgenommen. Der Inkubationsschritt des Gewebes wurde zweimal wiederholt und beide Sedimente wurden vereint und mit HBSS auf 30 mL aufgefüllt. Nach der Zugabe von DNase (20 µg / mL Endkonzentration) wurden die Zellen für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und bei 4 °C und 500 g für 10 min zentrifugiert. Die Sedimente wurden in 25 % Percoll in HBSS resuspendiert und bei 4 °C und 600 g für 20 min zentrifugiert. Anschließend wurde das restliche Medium zusammen mit den Zelltrümmern und der Mukusschicht abgenommen und verworfen. Das Sediment wurde einmal durch Zentrifugation bei 4 °C und 300 g mit 50 mL RPMI gewaschen und für 10 min bei 300 g zentrifugiert. Nach der Resuspension in 5 mL RPMI mit 25 mL Erylysepuffer wurden die Zellen für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und daraufhin bei 4 °C und 600 g für 10 min zentrifugiert. Das entstandene Sediment wurde je nach Größe in 1 bis

maximal 5 mL RPMI aufgenommen. Die Anzahl lebender Zellen wurde mittels Trypanblau Exklusion (Invitrogen, MA, USA) bestimmt. Die Suspension, welche Leukozyten und Epithelzellen enthielt, wurde anschließend zur Durchflusszytometrie und parallel zum *magnetic cell sorting* (MACS) eingesetzt. Die Zusammensetzung der für die Extraktion der IELs verwendeten Medien und Puffer ist Tabelle 10 zu entnehmen.

3.3.2 Isolierung von PBMCs aus kardialem Blut

Die Isolierung der mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) erfolgte aus 30 mL kardialem Blut. Dieses wurde im Verhältnis 1:2 mit phosphatgepufferter Lösung (PBS) verdünnt. Anschließend wurden bis zu 40 mL der Mischung vorsichtig auf 10 mL Bicol (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) geschichtet und für 30 min bei 500 g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die PBMCs wurden aus der entstandenen Interphase entnommen und mit PBS gewaschen. Die Erythrozyten wurden anschließend mittels eines Ammoniumchlorid-Puffers lysiert. Nach zweimaligem Waschen in PBS wurden die PBMCs in FACS Puffer resuspendiert und die Anzahl lebender Zellen wurde mittels Trypanblau Exklusion (Invitrogen, MA, USA) bestimmt. Die Zusammensetzung der für die Extraktion der PBMCs verwendeten Medien und Puffer ist Tabelle 10 zu entnehmen.

Tabelle 10: Zusammensetzung der für die IEL und PBMC Extraktion verwendeten Medien und Puffer

Bestandteile	
HBSS-DTT-Medium:	
HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution ohne CaCl ₂ und MgSO ₄)	
1,4-Dithiothreitol (DTT)	2 mM
Hepes	10 mM
HBSS-EDTA-Medium:	
HBSS (ohne CaCl ₂ und MgSO ₄)	
Hepes	1 mM
Erylyse-Puffer (Ammoniumchlorid-Lösung):	
NH ₄ Cl (Ammoniumchlorid)	55 mM
KHCO ₃ (Kaliumhydrogencarbonat)	10 mM
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	0,1 mM
Percoll (90%):	
10 x HBSS (ohne NaHCO ₃ , CaCl ₂ und MgSO ₄)	10 mL
NaHCO ₃ (Natriumhydrogencarbonat)	0,175 g
Percoll	90 mL
FACS-Puffer:	
PBS	
BSA	5 %

3.3.3 Durchflusszytometrie

Die fluoreszierende Zellanalyse (FACS, *fluorescence activated cell sorting*) ist ein Messverfahren zur Differenzierung und Zählung von Zellen. Durch eine zuvor durchgeführte Markierung mittels Fluoreszenzfarbstoffen ist dabei eine Einteilung in Zelltypen und Subtypen möglich. Die so markierten Zellen passieren einen monochromatischen Laserstrahl entsprechender Wellenlänge und das emittierende Licht wird von Photodetektoren gemessen. Hierbei werden Vorwärts- (*forward*-) und Seitwärtsstreulicht (*sideward scatter*) unterschieden. Das Vorwärtsstreulicht verhält sich proportional zur Größe der Zelle, je größer die Zelle, desto höher die detektierte Emission des Streulichts. Das Seitwärtsstreulicht ist ein Maß für die Granularität der Zelle, wodurch eine Aussage über die Morphologie der Zelle möglich ist. Durch eine Markierung mit spezifischen Primär-Antikörpern ist es möglich, Zellen auf bestimmte Merkmale zu untersuchen. Darauf folgend werden fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper gebunden, wodurch die Lichtintensität gemessen werden kann. Die emittierte Photonenkonzentration verhält sich dabei proportional zur Menge an gebundenem Antikörper und basiert auf der Grundlage einer Antigen-Antikörperreaktion. Zur Phänotypisierung verschiedener Populationen intraepithelialer Lymphozyten (IELs) wurden die entsprechenden Oberflächenmoleküle (Tabelle 1) verwendet. Die hierfür verwendeten Antikörper sind Tabelle 11 zu entnehmen. Die verwendeten Sekundärantikörper waren mit den Fluoreszenzfarbstoffen PE (Phycoerythrin) bzw. FITC (Fluoresceinisothiocyanat) markiert (Tabelle 11). Nachdem ein Optimum von 1×10^6 Zellen einer gesättigten Konzentration an Primärantikörpern in einem Volumen von 100 mL PBS mit 0,2 % bovinem Serumalbumin (BSA) ausgesetzt waren, wurden sie gewaschen und mit den fluoreszenz-markierten Sekundärantikörpern (goat anti-mouse IgG, Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland) für 25 min auf Eis inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen erneut mit PBS mit 0,2 % BSA gewaschen, bei 4 °C und 300 g für 10 min zentrifugiert und in 300 µL PBS mit 0,2 % BSA resuspendiert. Die CD3 und CD8 Oberflächenmoleküle wurden abweichend in einer Ein-Schritt Inkubation gefärbt, indem Phycoerythrin (PE)-konjugierte Primärantikörper verwendet wurden. Die Zellen wurden daraufhin genauso gewaschen wie oben beschrieben und anschließend für die Durchflusszytometrie eingesetzt. Zum methodischen Abgleich der Bestimmung CD3 positiver Lymphozyten mittels immunhistochemischer Färbung (siehe 3.5.2) und Durchflusszytometrie, wurde für beide Versuche der gleiche CD3 Antikörper (PPT3) verwendet. Die für die durchflusszytometrischen Analysen benötigten Geräte und Materialien sind Tabelle 12 zu entnehmen.

Auswertung der FACS-Daten

Die Auswertung der gemessenen Daten erfolgte mit dem Computerprogramm CellQuest pro® (Becton Dickinson Bioscience, San José, USA). Darin wurde die Granularität, Größe sowie Fluoreszenz der Zellen in einem Streudiagramm dargestellt (Abbildung 4). Hierbei wurden zunächst

die CD45+ Zellen, definiert als die Gesamtheit der intraepithelialen Leukozyten, anhand ihrer antikörperspezifischen Fluoreszenz dargestellt und innerhalb des Streudiagramms eine Region festgelegt, in welcher sich fluoreszierende Zellen mit ähnlicher Größe und Granularität befanden. Daraufhin wurde der Anteil (%) der CD45+ Zellen an der Gesamtheit der isolierten Epithelzellen bestimmt. Dieselbe, zuvor definierte, Region wurde anschließend bei der Auswertung der verschiedenen IEL Sub-Populationen als Grundlage (*gate*) gewählt. Die Angaben der Auswertung erfolgten hierbei als Anteil, bezogen auf die gesamte Leukozytenfraktion, und wurden anschließend mit den mikroskopisch gezählten CD3 positiven IELs verrechnet (siehe Abschnitt 3.5.2).

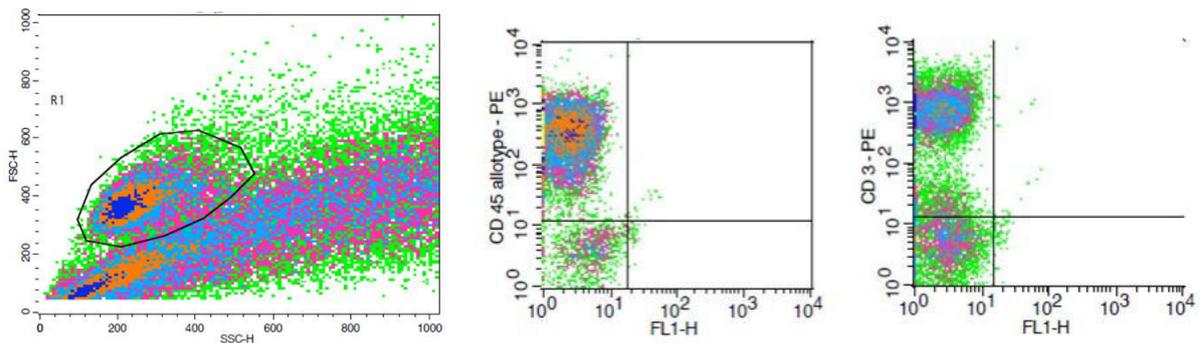


Abbildung 4: Beispielhafte Darstellung der durchflusszytometrischen Streudiagramme

Links: Gating der Gesamt-Leukozytenpopulation anhand ihrer Größe und Granularität

Mitte und Rechts: Beispielhafte Bestimmung der Häufigkeit der CD45+ und CD3+ Zellen anhand der antikörperspezifischen Fluoreszenz. Im unteren linken Quadranten sind jeweils die negative, im oberen linken Quadranten die positive Fraktion dargestellt.

Tabelle 11: Liste der für die Quantifizierung der IEL und PBMC verwendeten Antikörper

Spezifität	Klon	Isotyp	Cytochrom	Hersteller
CD2	MSA4	IgG2a		VMRD, Pullman, WA, USA
CD5	9G12	IgG1		VMRD, Pullman, WA, USA
CD8 α	76-2-11	IgG2a	PE	Southern Biotech, Birmingham, USA
CD8 β	PG164A	IgG2a		VMRD, Pullman, WA, USA
TcR1-N4 ¹	PGLBL22A	IgG1		VMRD, Pullman, WA, USA
CD3	PPT3 ²	IgG1	PE	Southern Biotech, Birmingham, USA
CD16	G7	IgG1		Acris, Herford, Deutschland
CD11R1	MIL-4	IgG1		Biozol, Eching, Deutschland
CD45	MAC323	IgG2a		Biozol, Eching, Deutschland
goat anti-mouse IgG		IgG2a	PE	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschl.
goat anti-mouse IgG		IgG1	FITC	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschl.
goat anti-mouse IgG		IgG1	PE	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschl.
goat anti-mouse IgG		IgG2b	FITC	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschl.

¹ Primärantikörper zum Nachweis von $\gamma\delta$ positiven Zellen

² Der CD3 Primärantikörper PPT3 wurde auch für den immunhistochemischen Nachweis verwendet
PE = Phycoerythrin; FITC = Fluoresceinisothiocyanat

Tabelle 12: Für die durchflusszytometrischen Untersuchungen verwendete Geräte und Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller	Ort, Staat
Albumin Fraktion V (BSA)	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
CellQuest pro® Software	Becton Dickinson Bioscience	San José, USA
DNase	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
DTT (1,4-Dithiothreitol) >99 %	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Durchflusszytometer FACS Calibur®	Becton Dickinson Bioscience	San José, USA
EDTA > 99 %	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
FACS Clean	Becton Dickinson Biosciences	San José, USA
FACS Flow TM	Becton Dickinson Biosciences	San José, USA
FACS Rinse	Becton Dickinson Biosciences	San José, USA
FACS-Röhrchen	Falcon (Becton Dickinson)	San José, USA
HBSS	Biochrom AG	Berlin, Deutschland
Hepes Pufferan® >99 %	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
Heraeus MEGAFUGE 1.0 Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA
Mikroskop Axiostar plus	Carl Zeiss	Jena, Deutschland
PBS Dulbecco 9,55g/L w/0 Ca ²⁺ , Mg ²⁺	Biochrom AG	Berlin, Deutschland
Percoll™	GE Healthcare Bio Science	Uppsala, Schweden
RPMI, 1640-Medium	Biochrom AG	Berlin, Deutschland
Schüttelinkubator MaxQ 6000	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA

3.3.4 Magnetic activated cell sorting (MACS)

Mithilfe der magnetischen Zellsortierung (MACS; *magnetic activated cell sorting*) ist eine positive bzw. negative Selektion bestimmter Zellpopulationen möglich. Hierbei sind Metallpartikel (*beads*) an Sekundärantikörper (Anti-mouse IgG MicroBeads) gekoppelt, welche wiederum gegen den Isotypen der verwendeten Primärantikörper gerichtet ist. Die Zellen passieren daraufhin ein magnetisches Feld, in dem die markierten Zellen in einer Säule gebunden werden.

Für die Isolation verschiedener IEL Populationen wurden MACS Säulen und Chemikalien der Firma Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland) verwendet (Tabelle 13). Es wurden jeweils 2×10^7 Zellen eingesetzt und zunächst mit den entsprechenden Primärantikörpern (Tabelle 11) für 20 min auf Eis inkubiert. Nach einem Waschschriff mit MACS Puffer erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper für 15 min bei 4 °C. Für den ersten Versuchsteil der Probiotikastudie wurden hierbei spezifische Anti-mouse IgG MicroBeads verwendet, für

den zweiten Versuchsteil Anti-PE MicroBeads, da die hier verwendeten Primärantikörper beide jeweils PE-gebunden waren. Anschließend wurde die Zellsuspension auf eine im Magnetfeld platzierte Säule gegeben. Dabei verblieben die mit Metallpartikeln markierten Zellen in der Säule zurück und die unmarkierten Zellen passierten die Säule unbeeinflusst. Nach dem Entfernen des Magneten konnten auch die markierten Zellen mit 1 mL MACS Puffer aus der Säule gelöst werden. Sowohl die markierten, als auch die unmarkierten Fraktionen wurden mittels Durchflusszytometrie (siehe 3.3.3) auf ihre Reinheit geprüft. Die Zellen wurden dann in 100 - 200 μ L RNAlater (Qiagen, Düsseldorf, Deutschland) aufgenommen, für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und bis zur weiteren Bearbeitung bei -80 °C gelagert.

Tabelle 13: Für die magnetische Zellsortierung (MACS) verwendete Geräte und Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller	Ort, Staat
Anti-mouse IgG MicroBeads	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, Deutschland
Anti-PE MicroBeads	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, Deutschland
autoMACS Running Buffer	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, Deutschland
Heraeus MEGAFUGE 1.0 Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA
MACS Pre- Separation Filter	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, Deutschland
MACS Separation Unit TM	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, Deutschland
MS Columns	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, Deutschland
RNAlater RNA Stabilization Reagent	Qiagen	Düsseldorf, Deutschland

3.3.5 Inkubation isolierter Zellpopulationen mit anti-CD3

Um das Aktivierungspotential, des in dieser Arbeit verwendeten CD3 Antikörpers, auf die Expression unterschiedlicher Gene durch verschiedene Zellpopulationen zu testen, wurden sowohl aufgereinigte IELs als auch PBMCs verwendet (siehe 3.3.1 und 3.3.2). Diese wurden jeweils mittels MACS (siehe 3.3.4) unter der Verwendung der entsprechenden Antikörper (Tabelle 11) in CD8 β bzw. $\gamma\delta$ positive Zellen unterteilt. Die Zellen wurden anschließend in RPMI Medium aufgenommen (100 μ L / 10⁶ Zellen) und in zwei Gruppen unterteilt. Diese wurden jeweils für 30 min bei Raumtemperatur mit dem CD3 bzw. zu Kontrollzwecken mit dem CD5 Antikörper (1 μ L / 10⁶ Zellen) inkubiert (Abbildung 5). Im Anschluss an die Inkubation wurden die Zellen für 10 min bei 300 g abzentrifugiert und in 200 μ L RNAlater (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) aufgenommen, für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und bis zur weiteren Verwendung mittels Genexpressionsanalysen (siehe 3.4) bei -30 °C gelagert.

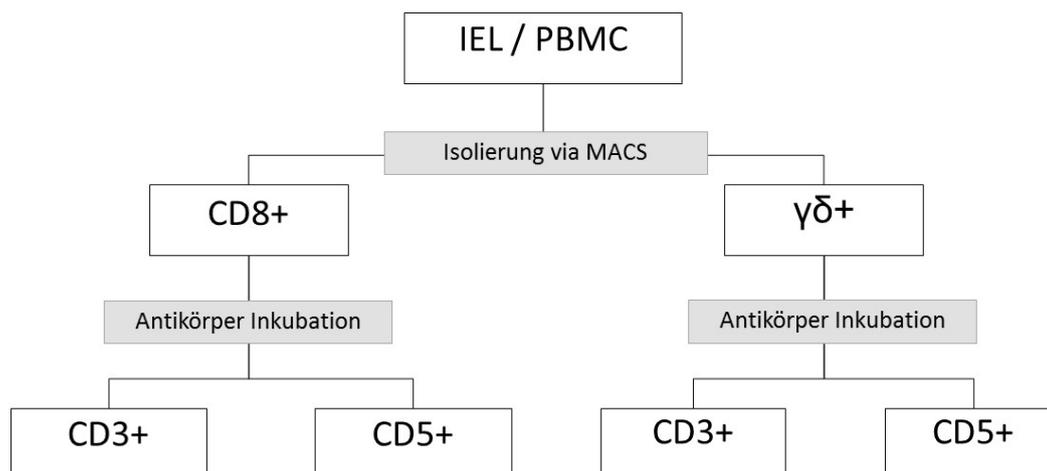


Abbildung 5: Schematische Versuchsdarstellung des Antikörper-Inkubationsansatzes

3.3.6 Sojaprotein Antikörper-Titerbestimmung

Die Bestimmung des Sojaprotein Antikörpertiters im Blutserum von Ferkeln erfolgte mittels *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). Zur Erfassung der humoralen Immunantwort wurden hierbei spezifische Antikörper gegen das Sojaprotein Glycinin im Ferkelserum gemessen (Christensen *et al.*, 2004). Um die Übertragung maternaler Antikörper auf die Ferkel zu minimieren, wurden die Sauen beider Gruppen ab dem 90. Tag a. p. mit einer Soja-freien Diät ernährt. Für diese Fragestellung war bereits ein spezifisches Tierversuchsmodell etabliert, das für diese Versuche übernommen wurde (Li *et al.*, 1991). Um die Ferkel für die Sojaproteine zu sensibilisieren, erhielten sie ab dem 14. Lebenstag ein Soja-haltiges Beifutter (Tabelle 5). Dieses Vorgehen wurde bereits zur Sensibilisierung von Ferkeln gegen Sojaproteine erfolgreich eingesetzt. Unterschiedlich hohe IgG-Titer gegen unterschiedlich aufbereitetes Sojamehl konnten dabei erfasst werden (Li *et al.* 1991). Nach dem Absetzen erhielten die Ferkel weiterhin eine Soja-haltige Diät. Im Zuge der Probenentnahme wurde von jedem Ferkel eine Blutprobe entnommen (siehe 3.1.1) und für 10 min bei 800 *g* und Raumtemperatur zentrifugiert. Das sich absetzende Blutserum wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

Zur Bestimmung der Antikörper-Titer wurden Mikrotiterplatten mit 100 µg / mL Glycinin in Carbonat-Bicarbonat Puffer (0,05 M; pH 9,6) beschichtet und bei 4 °C über Nacht inkubiert. Die Platten wurden anschließend zweimal mit PBST (PBS, 0,1 % Tween 20) gewaschen und die freien Bindungsstellen mit 1 % BSA in PBS für 30 min geblockt. Daraufhin wurden jeweils 100 µL Serumproben in drei verschiedenen Verdünnungsstufen (1:100, 1:200, 1:400) aufgetragen und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBST wurden jeweils 100 µL des spezifischen Meerrettichperoxidase(HRP)-gekoppelten Antikörpers

(1:2500) aufgetragen und die Platten nach 1 h Inkubation bei Raumtemperatur erneut dreimal mit PBST gewaschen. Anschließend wurde durch die Zugabe von 100 µL, der zuvor auf Raumtemperatur erwärmt, Peroxidasesubstratlösung (Tetramethylbenzidine) die Färbereaktion, durch das an die Antikörper gekoppelte HRP, gestartet und nach 20 min durch Zugabe einer Stopplösung (2 M Schwefelsäure) beendet. Die Auswertung der Emission erfolgte mit einem Mikrotiterplattenlesegerät (Tecan sunrise basic) bei einer Wellenlänge von 450 nm mithilfe des Computerprogramms Magellan6 (Tecan, Männedorf, Schweiz).

Tabelle 14: Für die Bestimmung des Sojaprotein-Antikörpertiters verwendeten Geräte und Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller	Ort, Staat
Albumin Fraktion V (BSA)	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
Anti-Swine IgG (H+L) Antikörper, perox.	KPL	Gaithersburg, USA
Carbonat-Bicarbonat Puffer	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Glycinin	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Heraeus MEGAFUGE 1.0 Zentrifuge	Thermo Fisher	Waltham, MA, USA
Magellan6 V.6.4	Tecan	Männedorf, Schweiz
Mikrotiterplatten	Geiner bio-one	Frickenhausen, Deutschland
Mikrotiterplattenlesegerät	Tecan	Männedorf, Schweiz
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Biochrom Dulbecco	Berlin, Deutschland
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	Merck	Darmstadt, Deutschland
Tetramethylbenzidine	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Tween 20	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland

3.4 Genexpressionsanalysen mittels quantitativer Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR)

Mithilfe der quantitativen Reverse-Transkriptase-PCR ist die Messung eines spezifischen RNA-Transkripts in einem Ausgangsmaterial möglich. Für die Durchführung einer PCR ist der Einsatz von DNA als Template nötig. Daher wird die vorliegende RNA zunächst mittels des Enzyms reverse Transkriptase in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Daraufhin werden mit spezifischen Primern (Tabelle 19) bestimmte Abschnitte dieser cDNA durch eine Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert. Durch den Einsatz des interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes SYBR®Green, der sich zwischen die DNA-Stränge einlagert und bei Anregung emittiert, kann die Fluoreszenz in jedem Reaktionsschritt gemessen werden. Die Menge der gebildeten DNA verhält sich dabei proportional zur Fluoreszenzintensität und mithilfe einer eingesetzten Standardreihe (Sammelproben aus 12 RNA Extrakten) ist so eine

quantitative Bestimmung der exprimierten mRNA möglich. Zusätzlich zum Detektionsfluoreszenzfarbstoff wird ein Farbstoff mit konstanten Fluoreszenzeigenschaften eingesetzt, um systematische Messfehler ausgleichen zu können. In dieser Arbeit handelte es sich dabei um den Referenzfluoreszenzfarbstoff ROX. Alle für die Genexpressionsanalyse verwendeten Geräte und Chemikalien sind in Tabelle 20 aufgeführt.

3.4.1 RNA Extraktion

Die Extraktion der Gesamt-RNA erfolgte mithilfe des NucleoSpin™ RNA II Kits (Machery-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland) nach Herstellerangaben. Dafür wurden 30 mg jejunales Gewebe eingesetzt bzw. durchschnittlich 5×10^7 Zellen der via MACS (3.3.4) sortierten IEL Fraktionen und 5×10^5 Zellen der ebenfalls sortierten und mit CD3 bzw. CD5 inkubierten IEL Populationen. Die Nukleinsäureextrakte wurden bis zur weiteren Verwendung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt. Die Qualität und Gesamtkonzentration der extrahierten RNA wurde mittels Bioanalyzer bestimmt (Agilent 2100, Agilent, Waldbronn, Deutschland) und eine RNA *integrity number* (RIN) von min. 6,5 (Gewebe) bzw. 9 (Zellen) als minimale Reinheitsqualität für die spätere Verwendung vorausgesetzt. Für weitere Analysen wurde die aus Gewebe gewonnene RNA mit RNase-freiem Wasser äquimolar auf eine Gesamtkonzentration von $100\text{ ng} \setminus \mu\text{L}$ eingestellt, die aus Zellen gewonnene RNA aufgrund einer geringeren Ausgangskonzentration auf $2,5\text{ ng} \setminus \mu\text{L}$.

3.4.2 Quantitative Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR)

In einer reversen Transkription (rT) wurde die isolierte RNA in *first strand*-cDNA umgeschrieben, welche in der anschließenden qPCR als Template diente. Beide Schritte erfolgten innerhalb eines Ansatzes unter Verwendung des *one-step* RT-qPCR master mix Kits (Brilliant®II SYBR®Green, Agilent Technologies, USA) in PCR-Reaktionsgefäßen. Die Durchführung der RT-qPCRs erfolgte in MX3000p und MX3005p Thermocyclern der Firma Agilent, die Auswertung mithilfe des Softwareprogramms MxPro (Agilent Technologies, Amsterdam, Niederlande). Zur Detektion unspezifischer PCR-Produkte erfolgte bei jeder durchgeführten RT-qPCR im Anschluss an den letzten Elongationsschritt eine Schmelzkurvenanalyse (Tabelle 16). Für die Messung der Genexpression der Stressfaktoren MIC2 und ULBP, des Natürlichen Killerzellen Rezeptors NKG2D, sowie der Cytokine IL-1 β , IL-8 und IL-10 wurden die in Tabelle 19 aufgeführten Primerpaare verwendet. Als Referenzgene wurden in dieser Arbeit die ribosomalen Proteine RPLa13 und RPL19, die Untereinheit A der Succinat-Dehydrogenase (SDHA), sowie beta-2 Mikroglobulin (Bet2G), als Teil des MHC-Klasse-I-Proteinkomplexes, verwendet. Die Transkripte dieser Gene werden zeitpunkt- und zellunabhängig sowie unabhängig von veränderten externen Bedingungen konstant exprimiert (Czechowski *et al.*, 2005). Hierdurch ist eine Normalisierung eventueller

Unterschiede in der cDNA Syntheseeffizienz, der Probenpräparation und weiterer probenindividueller Abweichungen möglich (Pfaffl *et al.*, 2004). Für die statistische Auswertung wurden hierfür die in der PCR gemessenen Ct-Werte (*cycle threshold*) der Zielgene mit denen der Referenzgene verrechnet (Pieper *et al.*, 2012; Martin *et al.*, 2013). Das Design der verwendeten Primerpaare erfolgte basierend auf den Sequenzen der Zielgene mithilfe des NCBI Onlineprogramms Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>). Zur Beschreibung der NKG2D Expression auf den verschiedenen isolierten IEL Populationen wurde die gesamte RNA Expression, die in einem einzelnen PCR-Durchlauf bestimmt wurde, mit 100 % gleichgesetzt. Der Gehalt der NKG2D RNA, welche in den einzelnen isolierten Zellpopulationen detektiert wurde, wurde anschließend als Anteil der gesamten NKG2D RNA des einzelnen PCR-Durchlaufs definiert. Die in Abbildung 10 dargestellten Durchschnittswerte wurden aus insgesamt vier Wiederholungen erstellt. Die PCR-Bedingungen wurden entsprechend des Probenmaterials und der analysierten Zielgene angepasst (Tabelle 15; Tabelle 16).

3.4.3 cDNA-Synthese und qPCR

Für die Bestimmung der Genexpression isolierter und inkubierter IEL und PBMC Populationen wurden die PCR-Bedingungen der in diesem Institut, speziell für Probenmaterial mit geringer RNA Konzentration, etablierten *two-step* RT-qPCR angepasst. Hierbei wurde die extrahierte RNA zunächst mithilfe des SuperScript® III Reverse Transcriptase First-Strand complementary DNA Synthesis System (Invitrogen, MA, USA) in cDNA umgeschrieben (Villodre Tudela *et al.*, 2015). Unter Verwendung des *two-step* qRT-PCR Kits (Brilliant®II SYBR®Green, Agilent Technologies, CA, USA) und den genspezifischen Primern (Tabelle 19) wurde diese anschließend amplifiziert. Die genauen Reaktionsansätze für die cDNA Synthese und die speziellen PCR-Bedingungen sind Tabelle 17 und Tabelle 18 zu entnehmen.

Tabelle 15: Reaktionsansätze für die *one-step* RT-qPCR

	RNA aus jejunalem Epithel [100 ng / µL]	RNA aus MACS isolierten IEL Populationen [2,5 ng / µL]
Brilliant II SYBR® one-step		
QRT-PCR MasterMix	12,5 µL	12,5 µL
Forward Primer (10µM)	0,5 µL	1,5 µL
Reverse Primer (10µM)	0,5 µL	1,5 µL
RT/RNase block enzyme mix	1 µL	1 µL
RNase freies Wasser	8,5 µL	0,5 µL
RNA-Probe	2 µL	10 µL

Tabelle 16: Reaktionsbedingungen für die *one-step* RT-qPCR

	Anzahl der Zyklen	Temperatur	Dauer
Reverse Transkription	1	50 °C	30 min
Aktivierung	1	95 °C	10 min
Denaturierung der cDNA Stränge	40	95 °C	15 sec
Annealing der Primermoleküle		60 °C	30 sec
Elongation der DNA-Fragmente		72 °C	30 sec
Schmelzkurvenanalytik	1	+	+

Tabelle 17: Reaktionsansätze für die cDNA-Synthese

	RNA aus MACS isolierten und inkubierten IEL und PBMC Populationen [2,5 ng / µL]
Random Hexamer-Primer (200 ng / µL)	2 µL
dNTP Mix (10 mM)	2 µL
RNA-Probe (2,5 ng / µL)	22 µL
RNAse freies Wasser	2 µL
Denaturieren der Probe bei 65 °C für 5 min	
5x First-Strand Buffer	8 µL
DTT (0,1 M)	2 µL
SuperScript® III RT (200 u / µL)	2 µL

Tabelle 18: Reaktionsansätze für die qPCR

	cDNA aus MACS isolierten und inkubierten IEL und PBMC Populationen
Brilliant®II QRT-PCR MasterMix	12,5 µL
Forward Primer (10µM)	0,5 µL
Reverse Primer (10µM)	0,5 µL
RNAse freies Wasser	10,5 µL
cDNA-Probe	1 µL

Tabelle 19. Verwendete Primer für die qPCR und RT-qPCR

Ziel-Gen	Primersequenz (5' → 3')	Produktgröße	Annealing-temp.	Referenz
MIC2	GCACAGACAACCTCACATGC CATTCCCATCAGGCAGGACA	129 bp	60 °C	Etabliert im Institut für Tierernährung
ULBP	GACACACGAGTGGATCCTGG AGGAAGGTGGTCACAATGGC	148 bp	60 °C	Etabliert im Institut für Tierernährung
NKG2D	GCTCCAGAGCCAAGCTTCTT GAACCATCTTCCCCTGCCA	156 bp	60 °C	Etabliert im Institut für Tierernährung
IL-1 β	TGAAGTGCCGCACCCAAAACCT CGGCTCCTCCTTTGCCACAATCA	137 bp	60 °C	Pieper et al. (2012)
IL-8	GGTCTGCCTGGACCCCAAGGAA TGGGAGCCACGGAGAATGGGTT	128 bp	60 °C	(Liu <i>et al.</i> , 2014)
IL-10	GTCCGACTCAACGAAGAAGG GCCAGGAAGATCAGGCAATA	83 bp	60 °C	Pieper et al. (2012)
RPLa13	CCATCTCAAGGTGTTCGA GGATCTTGGCCTTCTCCTTC	208 bp	60 °C	(Liu <i>et al.</i> , 2014)
RPL19	GCTTGCCTCCAGTGTCTCCTC GCGTTGGCGATTTTCATTAG	76 bp	60 °C	Pieper et al. (2012)
Bet2G	CCCCGAAGGTTTCAGGTTTAC CGGCAGCTATACTGATCCAC	203 bp	60 °C	Martin et al. (2013)
SDHA	CAAACCTCGCTCCTGGACCTC CCGGAGGATCTTCTCACAGC	236 bp	60 °C	Etabliert im Institut für Tierernährung

Tabelle 20: Geräte und Chemikalien für die RNA-Extraktion, Bestimmung der RNA-Konzentration, cDNA Synthese und PCR

Bezeichnung	Hersteller	Ort, Staat
2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies	Stanta Clara, USA
2100 Bioanalyzer Software	Agilent Technologies	Stanta Clara, USA
5x First-Strand Buffer (10 mM)	Agilent Technologies	Santa Clara, USA
AccuBlock™ Digital Dry Bath	Labnet International Inc.	Edison, USA
Brilliant II SYBR® one-step	Agilent Technologies	Santa Clara, USA
QRT-PCR MasterMix Kit		
Brilliant®II QRT-PCR MasterMix Kit	Agilent Technologies	Santa Clara, USA

Chip Priming Station	Agilent Technologies	Stanta Clara, USA
DNase PureLink	Invitrogen	Darmstadt, Deutschland
dNTP Mix (200 ng / μ L)	Invitrogen	Darmstadt, Deutschland
DTT (0,1 M)	Agilent Technologies	Santa Clara, USA
Ethanol ROTIPURAN® \geq 99,8 %, p.a.	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
Gusto™ High-Speed Mini-Centrifuge	Heathrow Scientific	Nottingham, UK
IKA MS 3 Vortex	Agilent Technologies	Santa Clara, USA
MaxQ 6000 Inkubator	Thermo Scientific	Waltham, MA, USA
MiniStar Silverline Mikrozentrifuge	VWR	Wien, Österreich
MxPro QPCR Software	Agilent Technologies	Santa Clara, USA
NucleoSpin RNA II Kit	Macherey & Nagel	Düren, Deutschland
PCR GefäÙe Optical tube + cap strips	Agilent Technologies	Santa Clara, USA
PCR Primer	Eurofins MWG Operon	Ebersberg, Deutschland
PCR Workstation mit UV / Air circulator	Peqlab	Erlangen, Deutschland
Random Hexamer-Primer	Invitrogen	Darmstadt, Deutschland
RNA 6000 Nano Chips	Agilent Technologies	Stanta Clara, USA
RNA 6000 Nano Kit	Agilent Technologies	Stanta Clara, USA
RNA/ater®-ICE	Ambion	Darmstadt, Deutschland
RNase Zap Dekontaminationslsg.	Life Technologies	Darmstadt, Deutschland
RT/RNase block enzyme mix	Agilent Technologies	Santa Clara, USA
Safe-Lock Tube 0,5 mL	Agilent Technologies	Santa Clara, USA
Safe-Lock Tube 1,5 mL / 2 mL	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
β -Mercaptoethanol	Sigma Aldrich	St. Louis, USA
Stratagene Mx3000P / Mx3005P Thermocycler	Agilent Technologies	Santa Clara, USA
SuperScript® III RT (200 u/ μ L)	Agilent Technologies	Santa Clara, USA
SureCycler 8800 Thermocycler	Agilent Technologies	Santa Clara, USA
Vortex Genie	Scientific Industries	West Palm Beach, USA
Waage Sartorius BP 110 S	Sartorius AG	Göttingen, Deutschland
Wasser, nuklease-frei, sterilfiltriert	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
Zentrifuge Eppendorf 5430	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland

3.5 Histologische Methoden

3.5.1 Histologische Aufarbeitung der Darmgewebeproben

Die histologische Bearbeitung der jejunalen Gewebeproben erfolgte in direktem Anschluss an die Probenentnahme. Zu Vergleichszwecken wurden zwei unterschiedliche Fixierungsmittel verwendet, zum einen eine Bouin'sche Lösung, zum anderen eine 4 %-ige, neutral gepufferte Formalinlösung. Ca. 4 cm² große Gewebestücke wurden mit der Schleimhautoberfläche nach oben mithilfe von Igelstacheln auf Korkplatten aufgespannt und für 24 h (Formalin) bzw. 48 h (Bouin'sche Lösung) fixiert. Anschließend wurden die fixierten Darmstücke auf ca. 1 cm lange und 0,5 cm breite Stücke zugeschnitten und in Einbettungskassetten verbracht. Ab diesem Schritt wurden die Proben aus beiden Fixierungslösungen gleich behandelt. Zur Einbettung der Proben in Paraffin wurden diese folgendem Dehydrierungsschema ausgesetzt:

70 % EtOH	24 h
80 % EtOH	24 h
96 % EtOH	2 h
2-Propanol	2 h
Xylol	1 h
Xylol	1 h
Paraffin	über Nacht
Paraffin	2 h

Die entwässerten Gewebestücke wurden anschließend in 60 °C warmem Paraffin für spätere sagittale Gewebeschnitte entlang der Krypten-Villus-Achse eingebettet und für mindestens einen Tag bei 4 °C gekühlt. Die erkalteten Paraffinblöcke wurden mithilfe eines Schlittenmikrotoms (Leitz, Wetzlar, Deutschland) in einer Stärke von 5 µm geschnitten, in einem Wasserbad bei 40 °C gestreckt und vorsichtig auf silanisierte Glasobjektträger aufgezogen. Die fertigen Schnitte wurden über Nacht bei 37 °C getrocknet und anschließend bis zur weiteren Verwendung bei Raumtemperatur gelagert.

Tabelle 21: Zusammensetzung der verwendeten Fixiermedien

Bestandteile	
Bouin'sche Lösung (525 mL):	
Pikrinsäure	375 mL
Formalin (37 %)	125 mL
Essigsäure	25 mL
4 % Formalinlösung (500 mL):	
Formalin (37 %)	54 mL
PBS	446 mL

3.5.2 Immunhistochemischer Nachweis CD3 positiver Zellen im jejunalen Epithel

Durch die Immunhistochemie ist es mithilfe einer Antigen-Antikörperreaktion möglich, gezielt Proteine in Gewebeschnitten zu detektieren und durch anschließende enzymatische Färbungen zu visualisieren. Dabei unterscheidet man die direkte Methode, bei welcher der, an das Antigen bindende, Primärantikörper bereits enzymgekoppelt ist und somit eine direkte Visualisierung erlaubt, sowie die in dieser Arbeit angewandte indirekte Methode. Hierbei handelt es sich um eine Zwei-Schritt-Methode, bei der ein spezifischer Antikörper zunächst an das zu detektierende Antigen bindet. In einem zweiten Schritt wird ein enzymgekoppelter Sekundärantikörper eingesetzt, welcher sich gegen den Primärantikörper richtet und durch eine Enzym-Substrat-Reaktion eine Farbreaktion auslöst. Der hier verwendete monoklonale Primärantikörper PPT3 entspricht dem für die durchflusszytometrischen Messungen verwendeten Antikörper (Tabelle 11). Dieser wurde für den Nachweis CD3 positiver intraepithelialer T-Zellen im jejunalen Epithel verwendet und bindet an die ϵ -Ketten des TCR/CD3-Proteinkomplexes. Der Primärantikörper wurde mit 1 % BSA in PBS auf eine Proteinkonzentration von 5 $\mu\text{g} / \text{mL}$ eingestellt. Zum Ausschluss falsch positiver Ergebnisse wurden in jedem Durchgang zusätzliche Präparate mitgeführt, die anstelle des Primärantikörpers lediglich mit dem Verdünnungsmedium (1 % BSA in PBS) benetzt wurden. Jeder Durchgang erstreckte sich über zwei Tage und verlief nach folgendem Schema:

1. Tag

Entparaffinierung:

Xylol	10 min
Xylol	10 min
2-Propanol	2 min
99 % EtOH	2 min
0,6 % H ₂ O ₂ in 80 % EtOH	30 min
70 % EtOH	2 min
3 x PBS	5 min

Das eingesetzte Wasserstoffperoxid diente hierbei der Inaktivierung endogener Peroxidasen, um eine unspezifische Hintergrundfärbung im zweiten Schritt zu vermindern.

Antigen-Demaskierung:

Bei der Gewebefixierung mit Formaldehyd kann es zur Bildung von Schiff'schen Basen und Methylenbrücken kommen (Dapson, 2007). Eine mögliche Folge hierbei ist eine Veränderung des Proteinmakromoleküls (Montero, 2003). Dies kann wiederum zu einer Maskierung des zu detektierenden Epitops führen und einen Nachweis des Proteins verringern oder sogar verhindern (Cattoretto *et al.*, 1993). Zu den Möglichkeiten diese Verbindungen zu spalten,

zählen u. a. die Proteolyse mittels einer Pronaselösung (Huang, 1975), sowie die Zufuhr von Wärme (HMAR, *heat mediated antigen retrieval*) (Shi *et al.*, 1991). Zudem kann hierdurch auch das Signal bereits detektierbarer Proteine verstärkt werden (Jasani und Rhodes, 2001). Beide Methoden wurden in dieser Arbeit getestet, wobei die Wärmebehandlung der Schnitte in Zitratpuffer (Cattoretti *et al.*, 1993) die bessere Demaskierung und größere Signalverstärkung erzielte.

Die enzymatische Demaskierung durch Proteolyse erfolgte durch den Einsatz einer 0,1 %-igen Pronaselösung (Demaskierungslösung P), mit welcher die Schnitte benetzt und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert wurden.

Die Wärmebehandlung der Schnitte erfolgte in 96 °C warmem Zitratpuffer für 30 min im Inkubationsschrank. Der Puffer wurde dabei täglich frisch aus zwei unterschiedlichen Stammlösungen (Tabelle 22) hergestellt (Hornickel, 2009). Dabei wurden jeweils 18 mL der Lösung A in 82 mL Lösung B verbracht und auf 1000 mL destilliertes Wasser aufgefüllt. Nach dem jeweiligen Vorbehandlungsschritt wurden die Schnitte für jeweils dreimal 5 min mit PBS gewaschen.

Tabelle 22: Bestandteile der zur Desmaskierung verwendeten Zitronensäurelösung

Bestandteile	
Stammlösung A (0,1 M Zitronensäurelösung):	
Zitronensäure	21 g
Aqua dest.	1000 mL
Stammlösung B (0,1 M Na-Zitratlösung):	
Natriumzitrat	29,4 g
Aqua dest.	1000 mL

Antikörperreaktion:

Um unspezifische Antikörperbindungen zu minimieren, wurden die Schnitte mit normalem Ziegen Serum vorbereitet. Hierbei wurde das Ziegen Serum 1:5 mit PBS verdünnt und für 20 min auf die Gewebeschnitte aufgetragen. Um den Verbrauch an Ziegen Serum und Antikörper möglichst gering zu halten, wurden die Schnitte auf den Objektträgern zunächst mit einem 1-Brompropan haltigen Stift (DAKO Pen) umrandet, um eine wasserabweisende, Ethanol-unlösliche Barriere zu ziehen. Anschließend wurde das Ziegen Serum abgeklopft und der monoklonale Primärantikörper (PPT3) bzw. zu Kontrollzwecken das pure Verdünnungsmedium aufgetragen und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Alle Inkubationsschritte

erfolgten in geschlossenen Gefäßen, in denen durch mit destilliertem Wasser getränkten Zellstofftüchern die Austrocknung der Schnitte verhindert wurde.

2. Tag

Nachweisreaktion mittels Sekundärantikörper

Zur Visualisierung einer erfolgreichen Enzym-Substrat-Reaktion durch den Sekundärantikörper wurden sämtliche Reaktionskomponenten des Envision® (Maus) Systems von DAKO verwendet. Die Schnitte wurden zunächst dreimal für 5 min mit PBS gespült, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen und mit dem aus dem Envision® System verwendeten Sekundärantikörper-Dextran-Polymer-Komplex für 45 min inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS erfolgte eine fünfminütige Inkubation mit 1:100 in HRP Substratpuffer verdünntem Chromogen 3,3' Diaminobenzidin (DAB). DAB wird dabei durch die an den Sekundärantikörper gebundene Meerrettichperoxidase (HRP) und in Gegenwart von Wasserstoffperoxid in ein braunes, unlösliches Präzipitat gewandelt und macht somit eine erfolgreiche Antigen-Primärantikörperbindung sichtbar. Im Anschluss wurden die Schnitte einmal mit PBS gewaschen und für 10 min unter fließendem Wasser gespült. Nach dem Durchlaufen einer aufsteigenden Alkoholreihe wurden die entwässerten Schnitte mit dem Einbettmedium Histokitt eingedeckt und bis zur mikroskopischen Auswertung bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Die für die histologischen und immunhistologischen Arbeiten verwendeten Geräte und Chemikalien sind in Tabelle 23 aufgeführt.

3.5.3 Dokumentation und Auswertung

Die Vermessung der Dünndarmzotten und -krypten erfolgte an den Bouin-fixierten Paraffinschnitten des mittleren Jejunums bei 40-facher, und die immunhistochemische Quantifizierung der CD3 positiven IEL bei 400-facher Vergrößerung. Die Schnitte wurden dabei durch ein Lichtmikroskop (Photomikroskop III, Zeiss, Deutschland) mit einer digitalen Mikroskopkamera (DP72, Olympus, Deutschland) betrachtet und mithilfe des dazugehörigen Analyseprogramms (CellSens Software, Olympus, Deutschland) ausgewertet.

Pro Tier wurden je zwei bis drei Schnitte ausgewertet, wobei bei jedem Schnitt vier bis fünf Zotten und Krypten vermessen, bzw. die in den Zotten angefärbten CD3 positiven IEL gezählt wurden. Die morphologische Analyse und Quantifizierung erfolgte in einer Blindbestimmung durch vorherige Kodierung der Tiernummern als fortlaufende Probennummern. Zur Bestimmung der morphologischen Parameter wurde die Zottenlänge als Abstand zwischen Zottenspitze und Zottenbasis definiert, der Umfang und die Fläche wurden mithilfe des Analyseprogramms CellSens bestimmt, mit der Begrenzung entlang der Zottenbasis. Als

Kryptentiefe wurde die Verbindungslinie von Kryptenöffnung zu Kryptenbasis definiert. In Abbildung 6 ist eine Darstellung der Messbereiche zur Bestimmung der morphologischen Parameter gegeben. Die Quantifizierung der CD3 positiven IEL erfolgte nur an intakten und vollständigen Darmzotten. Die Anzahl der als positiv bestimmten Zellen bezog sich dabei auf 100 Enterozyten und diente dem Abgleich der IEL Quantifizierung mittels Durchflusszytometer (Abschnitt 3.3.3).

Hierbei wurde folgende Formel angewendet:

$$\text{Anzahl der CD3+ Zellen innerhalb 100 EC} \times \frac{\% \text{ des jeweiligen Phänotypen (FACS)}}{\% \text{ CD3+ IEL (FACS)}}$$

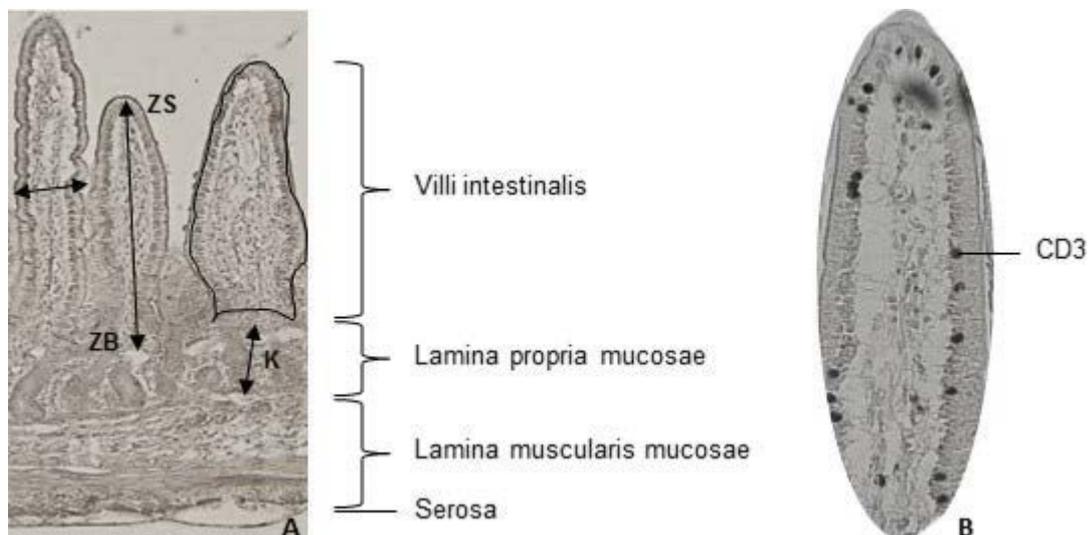


Abbildung 6: A, Darstellung der Dünndarmschleimhaut und schematische Markierung der Bestimmung von Zottenlänge und Kryptentiefe am mittleren Jejunum eines 32 Tage alten Ferkels (LM, HE, 40x); ZS = Zottenspitze, ZB = Zottenbasis, K = Darmkrypte. B, Exemplarisches Beispiel

Tabelle 23: Für die histologischen und immunhistologischen Arbeiten verwendete Geräte und Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller	Ort, Staat
2-Propanol	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
Albumin Fraktion V (BSA)	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
Dako EnVision+System-HRP, Mouse	Dako	Golstrup, Dänemark
Dako Pen	Dako	Golstrup, Dänemark
Deckgläser, 24 x 50 mm	VWR International	Darmstadt, Deutschland
Demaskierungslösung P	Biologo	Kronshagen, Deutschland
EC-350 Paraffin-Ausgießstation	Microm	Walldorf, Deutschland
Eosin	Merck	Darmstadt, Deutschland
Essigsäure 100 %	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
Ethanol 70 %	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
Ethanol 99 %	VWR	Darmstadt, Deutschland
Formalin 37 %	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
Goat serum (normal)	Dako	Golstrup, Dänemark
Grundschlittenmikrotom, Typ 1400	Leitz	Wetzlar, Deutschland
Hämalaun nach Mayer	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
Heraeus® Trockenschrank T5042	Heraeus electronic	Hanau, Deutschland
Histobond® adhäsive Objektträger	Marienfeld GmbH	Lauda-Königshofen, Deutschland
Magnet-Heizrührer, RH-KT/C	IKA Labortechnik GmbH&Co.KG	Staufen, Deutschland
Natriumchlorid	Merck	Darmstadt, Deutschland
Paraffin	Carl Roth GmbH&Co.KG	Karlsruhe, Deutschland
Paraplast	McCormick Scientific, LLC	St. Louis, USA
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Sigma Aldrich	St. Louis, USA
Pikrinsäure	Merck	Darmstadt, Deutschland
Roti Histokitt	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
Rotilabo®-Einbettkassette Macro	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
Trichlormethan/Chloroform	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
Natriumcitrat	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
Wasserstoffperoxid 30 % Rotipuran®	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
Xylol	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
Zitronensäure	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland

3.6 Statistische Auswertungen

Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe des Programms SPSS 22.0 (SPSS Inc., Chicago Illinois, USA). Die Daten wurden hierbei zunächst mittels Shapiro-Wilk-Test (mit Signifikanzkorrektur nach Lilliefors) auf ihre Normalverteilung getestet, wobei Signifikanzen größer als 0,05 als normalverteilt definiert wurden. Normalverteilte Daten wurden durch den Mittelwert dargestellt, nicht normalverteilte Daten als Median, sowie Minimum und Maximum. Bei normalverteilten Daten basierte der Nachweis möglicher Unterschiede auf einer einfaktoriellen Varianzanalyse (allgemeines lineares Modell). Die Nullhypothese, dass keine signifikanten Unterschiede zwischen zwei Versuchsgruppen bestehen wurde verworfen, sofern die Überschreitungswahrscheinlichkeit (p-Wert) bei einem Wert von $p \leq 0,05$ lag. Um in diesem Fall vorliegende Gruppenunterschiede festzustellen, erfolgte anschließend die Anwendung des Tukey-Tests als Post-Hoc-Signifikanztest. Nicht normalverteilte Daten wurden mittels Mann-Whitney-U-Test auf Signifikanz überprüft. Hier wurde ebenfalls eine Überschreitungswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$ zur Widerlegung der Nullhypothese vorausgesetzt.

4 Ergebnisse

4.1 Lebendmasse, Lebendmassezunahme und Gesundheitszustand

Innerhalb der ersten drei Wochen des Versuchsverlaufs der Probiotikastudie wurden die Ferkel der Versuchs- und Kontrollgruppen wöchentlich gewogen. Die Tiere wurden dabei einzeln gewogen und anschließend die gruppenspezifischen Mittelwerte gebildet. Zu Beginn des Fütterungsversuches zeigten die Ferkel beider Gruppen keine signifikant unterschiedlichen Einstallgewichte ($p = 0,81$). Durch die Verteilung der Probennahme auf einen Zeitraum von insgesamt drei Wochen wurde die Lebendmasse und -zunahme bei einigen Ferkeln bis zum Ende der dritten Woche rechnerisch interpoliert, um die Daten vergleichen zu können. Dabei handelte es sich um die Tiere, von denen im Alter von 17 Tagen Proben genommen wurden. Zwischen der Kontroll- und Versuchsgruppe konnten in den ersten drei Versuchswochen keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Lebendmasse und damit einhergehend der Lebendmassezunahme beobachtet werden. Die mittleren Lebendmassen beider Gruppen sind in Tabelle 24 dargestellt, die jeweiligen mittlere Lebendmassezunahmen in Tabelle 25.

Die Tiere beider Gruppen zeigten keine gesundheitlichen Auffälligkeiten und mussten während des Versuchszeitraums nicht medikamentös behandelt werden. Die statistische Auswertung erfolgte mittels student t-Test (SPSS, Version 22.0, Chicago Illinois, USA).

Tabelle 24: Mittlere Lebendmasse der Ferkel mit *B. toyonensis* supplementierter Diät zum Ende der einzelnen Versuchswochen [kg]

	Kontrolle	<i>B. toyonensis</i>	p
Lebendmasse Versuchsbeginn	1,22 ± 0,21	1,24 ± 0,22	0,810
Lebendmasse 1. Woche	2,30 ± 0,23	2,16 ± 0,36	0,159
Lebendmasse 2. Woche	3,96 ± 0,38	3,70 ± 0,67	0,138
Lebendmasse 3. Woche	5,60 ± 0,60	5,49 ± 0,84	0,653

Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte und Standardabweichungen; $n = 20$ pro Gruppe; $p =$ Überschreitungswahrscheinlichkeit ($p \leq 0,05$; student t-Test).

Tabelle 25: Mittlere wöchentliche Lebendmassezunahme der Ferkel mit *B. toyonensis* supplementierter Diät zum Ende der einzelnen Versuchswochen [g/Tag]

	Kontrolle	<i>B. toyonensis</i>	p
Lebendmassezunahme 1. Woche	153 ± 29,7	131 ± 48,6	0,092
Lebendmassezunahme 2. Woche	238 ± 42,7	220 ± 60,8	0,289
Lebendmassezunahme 3. Woche	234 ± 58,9	256 ± 65,8	0,260
Lebendmassezunahme gesamt	625 ± 88,5	608 ± 123	0,613

Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte und Standardabweichungen; n = 20 pro Gruppe; p = Überschreitungswahrscheinlichkeit ($p \leq 0,05$; student t-Test).

4.2 Gehalt koloniebildender Einheiten (KBE) von *Bacillus toyonensis* in Fäzesproben

Bei einem Alter von 17 Tagen konnten bei den Saugferkeln, deren Muttersauen bereits 90 Tage a. p. über das Futter $3,5 \times 10^8$ KBE / kg der *B. toyonensis* Sporen erhielten, $7,55 \times 10^3$ KBE / g Fäzes nachgewiesen werden. Im Alter von 32 Tagen, vier Tage nach dem Absetzen, erhöhte sich die Anzahl der koloniebildenden Einheiten in den Fäzesproben signifikant auf durchschnittlich $1,5 \times 10^5$ KBE / g Fäzes ($p \leq 0,01$). Zwei Tage später, im Alter von 34 Tagen, verhielt es sich ähnlich mit einer Durchschnittsmenge von $1,4 \times 10^5$ KBE / g Fäzes ($p \leq 0,01$). Im Alter von 39 Tagen sank die Anzahl der koloniebildenden Einheiten drastisch auf $3,7 \times 10^4$ KBE / g Fäzes ($p \leq 0,05$) und ist damit statistisch nicht mehr von der an Tag 17 gemessenen Konzentration zu unterscheiden ($p > 0,50$). Abbildung 7 zeigt eine Übersicht zum Wachstumsverhalten von *B. toyonensis* aus den Fäzesproben beider Gruppen. Lediglich zu einem Zeitpunkt, an Tag 32, und nur in einem Tier der Kontrollgruppe konnten $1,3 \times 10^3$ KBE / g Fäzes nachgewiesen werden.

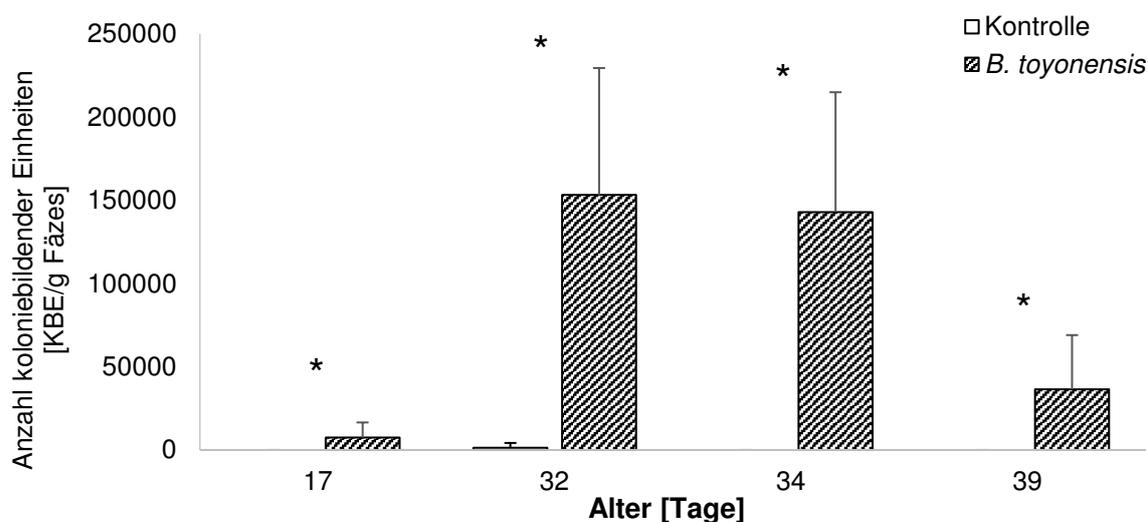


Abbildung 7: Wachstum von *B. toyonensis* in Fäzesproben von Ferkeln mit *B. toyonensis* supplementierter Diät, n = 5; p = Überschreitungswahrscheinlichkeit (* $p \leq 0,05$; ANOVA, Tukey-HSD).

4.3 Integrität der intestinalen Darmschranke

4.3.1 Meerrettichperoxidase-Permeabilität des jejunalen Epithels

Um einen möglichen Einfluss von *B. toyonensis* auf die Barrierefunktion des jejunalen Epithels zu untersuchen, wurde die Durchlässigkeit des Gewebes beider Gruppen zu verschiedenen Zeitpunkten analysiert. Die Untersuchung der Darmwandpermeabilität erfolgte dabei mithilfe einer vereinfachten Ussing-Kammer-Technik nach Ussing und Zerahn (1951), wobei die Meerrettichperoxidase(HRP)-Durchflussrate bestimmt wurde. In

Abbildung 8 sind die arithmetischen Mittelwerte von jeweils fünf Tieren samt Standardabweichung dargestellt. Zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten, nach dem Absetzen, wurden Proben entnommen. Diese wurden in der Ussing Kammer bis zu 120 min inkubiert. Die am 32. und 34. Lebenstag gewonnenen jejunalen Gewebeproben der mit *B. toyonensis* gefütterten Tiere wiesen dabei eine signifikant erhöhte HRP-Permeabilität, im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p \leq 0,01$ und $p \leq 0,05$) auf. Am 39. Lebenstag konnte in der Versuchsgruppe eine altersabhängige Stabilisierung der Darmschranke im Vergleich zu den jüngeren Tieren beobachtet werden ($p \leq 0,05$). Darüber hinaus waren zwischen den beiden Gruppen, keine signifikanten Unterschiede mehr zu beobachten. Eine altersabhängige Entwicklung der Darmwandpermeabilität ließ sich für die Kontrollgruppe statistisch nicht belegen.

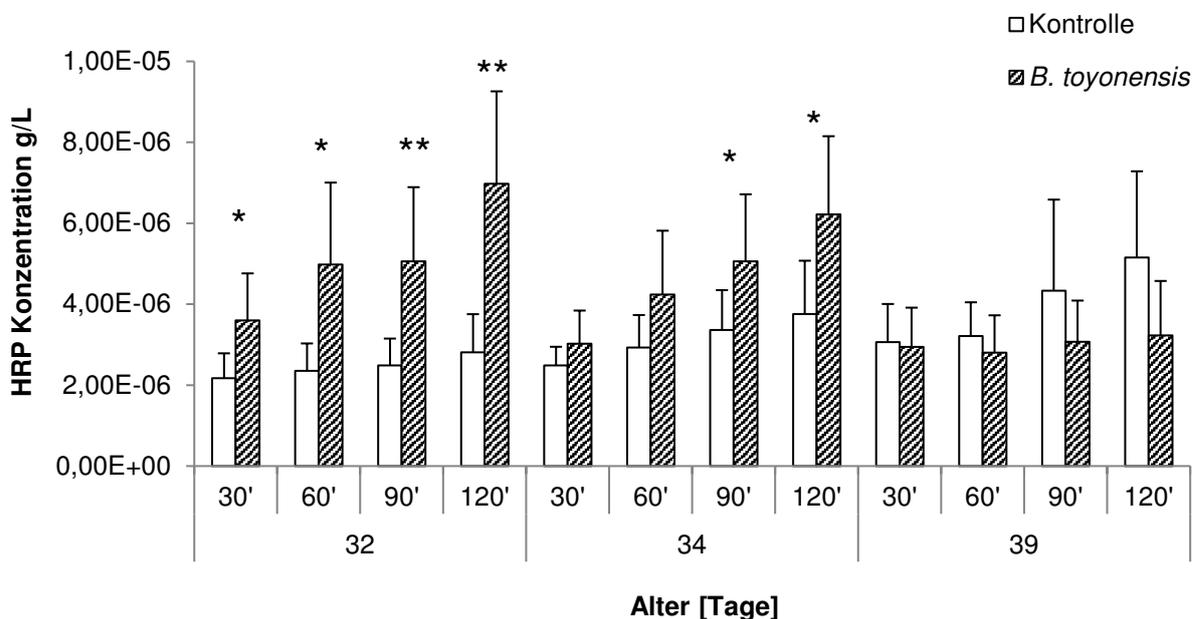


Abbildung 8: Mittlere jejunale Darmwandpermeabilität für Meerrettichperoxidase (HRP) bei Ferkeln mit *B. toyonensis* supplementierter Diät

Die Messung der HRP erfolgte in der Ussing-Kammer jeweils nach 30, 60, 90 und 120 Minuten. Dargestellt sind arithmetische Mittelwerte und Standardabweichungen; $n = 5$ pro Gruppe und Zeitpunkt. p = Überschreitungswahrscheinlichkeit (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; student t-Test).

4.3.2 Sojaprotein-Antikörper Entwicklung im Blutserum

Die Bestimmung der Antikörpermengen gegen das Sojaprotein Glycinin erfolgte in Blutserumproben der Ferkel beider Gruppen mittels indirektem ELISA (EIA). Die mittleren Glycinin-Antikörpertiter sind in Tabelle 26 aufgeführt. Dargestellt ist dabei die gemessene optische Dichte in drei Verdünnungsstufen. Um den Einfluss des Alters auf die Antikörpertiter und Gruppenunterschiede darzustellen, wurden die gemessenen Daten einer der Verdünnungsstufen beispielhaft in Abbildung 9 grafisch veranschaulicht. Alle drei Verdünnungsstufen zeigten vergleichbare Ergebnisse. Am 17. Lebenstag konnte im Serum, der mit *B. toyonensis* gefütterten Gruppe, ein signifikant geringerer Glycinin Antikörpertiter im Vergleich zur Kontrollgruppe gemessen werden ($p \leq 0,01$). Dieses Verhalten scheint sich nach dem Absetzen umzukehren. Im Alter von 32 und 34 Tagen konnten jeweils tendenziell höhere Antikörpertiter in der Versuchsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe gemessen werden. Am 39. Lebenstag war dieser Anstieg noch deutlicher ($p \leq 0,03$). Mithilfe einer einfaktoriellen Varianzanalyse (SPSS, Version 22.0, Chicago Illinois, USA) konnte insgesamt ein signifikanter Einfluss des Bacillus Stammes ($p \leq 0,02$) auf den gemessenen Glycinin-Antikörpertiter, sowie auch ein klarer Alterseffekt beobachtet werden ($p \leq 0,01$).

Tabelle 26: Mittlerer Glycinin-Antikörpertiter im Blutserum der Versuchs- und Kontrollgruppe

Alter [Tage]	Kontrolle				<i>B. toyonensis</i>				SEM	Gruppe	p	
	17	32	34	39	17	32	34	39			Alter	Gruppe x Alter
1:100	1,36	1,72	2,06	1,94	1,28	2,34	2,55	2,97	0,125	0,015	0,002	0,321
1:200	0,88	0,95	1,32	1,20	0,56	1,80	1,97	2,39	0,125	0,003	0,002	0,045
1:400	0,62	0,61	0,86	0,86	0,31	1,16	1,34	1,59	0,092	0,016	0,007	0,097

Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte; $n = 5$ pro Gruppe und Zeitpunkt; $p =$ Überschreitungswahrscheinlichkeit ($p \leq 0,05$; ANOVA).

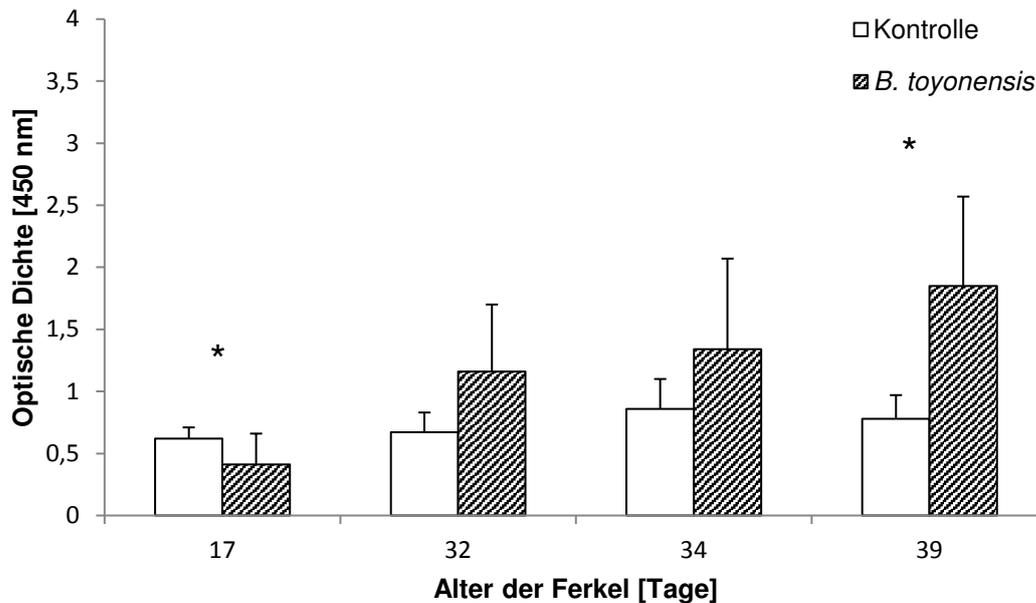


Abbildung 9: Entwicklung der Sojaprotein-Antikörper in Serumproben

Dargestellt sind arithmetische Mittelwerte und Standardabweichung der 1:400 verdünnten Serumproben, n = 5. p = Überschreitungswahrscheinlichkeit (*p ≤ 0,05; student t-Test).

4.4 Verteilung verschiedener intraepithelialer Lymphozyten im Darmepithel

Um den Einfluss von *B. toyonensis* auf die verschiedenen IEL Populationen zu unterschiedlichen Zeitpunkten zu untersuchen, wurde deren Häufigkeiten mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Mithilfe von immunhistologischen Färbungen konnten diese Häufigkeiten in Zellzahlen konvertiert werden (Tabelle 35). Die CD3 positiven Zellen im jejunalen Epithel konnten dabei deutlich als dunkle Punkte erfasst und gezählt werden (siehe 3.5.2) und dienten anschließend als Grundlage zur Berechnung der Zellzahlen. Die mittleren Zellzahlen sind in Tabelle 27 aufgeführt. Dargestellt sind dabei für die CD45+ Zellen der prozentuale Anteil an allen Zellen des Epithels. Für alle weiteren Zelltypen sind die errechneten Zellzahlen als Anteil an den Gesamt-Leukozyten (CD45) dargestellt. Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigten die Tiere der Versuchsgruppe im Alter von 32 Tagen eine deutlich geringere prozentuale Häufigkeit der Gesamt-Leukozyten (CD45; p ≤ 0,05). Dieser Effekt kehrte sich zum Zeitpunkt 39 jedoch um und der Anteil der Leukozyten war in der Versuchsgruppe deutlich erhöht (p ≤ 0,05). Innerhalb der intraepithelialen Lymphozyten zeigte sich vor allem ein reduziertes Vorkommen der T-Zellen (CD3; p ≤ 0,01). Dies wiederum war insbesondere auf eine deutlich reduzierte Zellzahl zytotoxischer T-Zellen zurückzuführen (CD8β+/CD16-, p ≤ 0,01; CD8α+/γδ-, p > 0,05). Ein Einfluss des Probiotikums auf die Häufigkeit der natürlichen Killerzellen war nicht nachzuweisen (CD2+/CD5-, p > 0,05; CD16+/CD8β-, p > 0,05; CD11R1, p > 0,05).

Neben dem Einfluss von *B. toyonensis* auf die unterschiedlichen intraepithelialen Zelltypen wurde zudem die altersabhängige Entwicklung dieser Zellpopulationen bestimmt. Dabei zeigte sich zunächst, dass die Häufigkeit der Gesamt-Leukozyten innerhalb der Kontrollgruppe nach dem Absetzen abnimmt. Zum Zeitpunkt 39 wurde weniger als die Hälfte an Leukozyten bestimmt als zu Tag 32, kurz nach dem Absetzen (29,5 % / 13,6 %, $p \leq 0,01$). Vor allem die Anzahl der CD3+ T-Zellen war kurz nach dem Absetzen besonders erhöht (24,1). Tendenziell verhielten sich die meisten Lymphozytenpopulationen der Kontrollgruppe ähnlich und waren in ihrer Anzahl deutlich geringer, je älter die Tiere waren. Ebenso verhielt es sich auch für die Zellen der angeborenen Immunantwort (CD2+/CD5-, $p \leq 0,05$; CD16+/CD8 β -, $p \leq 0,05$; CD11R1, $p > 0,05$).

Bezüglich der Lymphozytenhäufigkeit zeigte sich bei der mit *B. toyonensis* supplementierten Gruppe ein gegensätzliches Bild. Die Gesamthäufigkeit der Leukozyten war in dieser Gruppe zum Zeitpunkt 39 drastisch erhöht, im Vergleich zu den gemessenen Zeitpunkten kurz nach dem Absetzen ($p \leq 0,01$). Zu den Zellpopulationen, die einen entsprechenden Anstieg in ihrer Häufigkeit aufwiesen, gehörten insbesondere die CD3+ ($p > 0,05$) und CD5+ T-Zellen ($p > 0,05$). Die CD8 β + / CD16- zytotoxischen T-Zellen wiesen ebenfalls einen altersbedingten Anstieg der Zellzahl auf ($p > 0,05$). Für die CD8 α + / $\gamma\delta$ - Zellen konnte dies jedoch nicht nachgewiesen werden. Die Zellfraktionen der natürlichen Immunantwort verhielten sich jedoch tendenziell vergleichbar mit denen der Kontrollgruppe. Die Zellzahl der natürlichen Killerzellen sank mit größerem Abstand zum Absetzdatum und ihre Häufigkeit halbierte sich vom 32. zum 39. Tag (CD2+/CD5-, $p > 0,05$).

Aufgrund einer hohen Zelltodrate, während der Präparation, konnten die Zellen der 17 Tage alten Ferkel nicht durchflusszytometrisch bestimmt werden.

Tabelle 27: Anteile verschiedener IEL im jejunalen Epithel von Ferkeln (mittels immunhistologischer Zählung CD3 positiver Zellen in absolute Zellzahlen konvertiert)

Alter [Tage]	Kontrolle			<i>B. toyonensis</i>			SEM	p		
	32	34	39	32	34	39		Gruppe	Alter	Gruppe x Alter
CD45+ ¹	29,5	22,5	13,6	5,34	8,79	32,1	2,689	0,107	0,307	≤ 0,001
CD3+	24,1	16,9	17,8	9,45	12,2	12,3	1,426	0,003	0,754	0,232
CD5+/ $\gamma\delta$ -	15,8	8,36	8,09	4,50	5,69	6,51	0,919	≤ 0,001	0,170	0,026
CD8 β +/ $\gamma\delta$ -	11,7	6,36	7,18	1,94	3,17	4,27	0,734	≤ 0,001	0,275	0,025
CD8 α +/ $\gamma\delta$ -	31,9	14,0	7,09	17,9	6,54	10,6	2,125	0,075	0,002	0,102
CD2+/ $\gamma\delta$ -	24,8	12,8	7,12	26,8	15,8	13,4	2,599	0,474	0,079	0,936
CD16+/ $\gamma\delta$ -	19,4	9,49	4,63	19,7	12,4	11,1	1,813	0,360	0,044	0,770
CD11R1+	4,15	0,86	1,68	3,92	1,47	0,70	0,407	0,771	0,006	0,605
CD8+/ $\gamma\delta$ +	6,63	5,15	6,38	4,93	4,09	3,97	0,592	0,195	0,775	0,900
CD5-/ $\gamma\delta$ +	1,86	1,67	2,22	3,02	2,06	0,86	0,391	0,940	0,704	0,484
CD5+/ $\gamma\delta$ +	6,19	3,95	4,50	3,32	3,34	3,24	0,434	0,096	0,594	0,597

¹ CD45+ beschreibt den Prozentanteil der CD45 positiven Zellen an allen aus dem Epithel isolierten Zellen [%]. Die Häufigkeit aller anderen Phänotypen wurde als prozentualer Anteil der verschiedenen Lymphozyten im Epithel (CD45+) bestimmt und in absolute Zellzahlen umgerechnet [Zellen / 100 Enterozyten].

4.5 Genexpressionsanalyse von Stressfaktoren, Cytokinen und dem Natürlichen Killerzellen Rezeptor NKG2D

4.5.1 Expression von Stressfaktoren auf jejunalem Epithel

Die Bestimmung der Genexpressionsrate der Stressfaktoren ULBP16 und MIC2, sowie des Natürlichen Killerzellen Rezeptors NKG2D, erfolgte mittels qRT-PCR mit Gesamt-RNA aus jejunalem Gewebe. In Tabelle 28 sind die Medianwerte, sowie Minimum und Maximum zu vier verschiedenen Zeitpunkten von jeweils fünf Tieren pro Gruppe dargestellt. Die angegebenen Werte wurden dabei mit denen der Referenzgene RPLa13, RPL19 und Bet2g normalisiert (Pieper *et al.*, 2012; Martin *et al.*, 2013). Für die beiden Stressfaktoren ULBP16 und MIC2 konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Genexpression zwischen den beiden Gruppen gezeigt werden. Bei beiden Stressfaktoren wurde jedoch ein deutlicher altersbedingter Einfluss auf das Expressionsverhalten festgestellt. Innerhalb der Versuchsgruppe zeigte sich das mit einer jeweils signifikant niedrigeren Expressionsrate am 39. Lebenstag im Vergleich zum 17. Lebenstag und somit vor dem Absetzen ($p \leq 0,05$). Ein ähnliches Verhalten konnte auch in der Kontrollgruppe numerisch aufgezeigt werden. Ein schnell eintretendes verändertes Expressionsverhalten kurz nach dem Absetzen am 32. Lebenstag konnte in beiden Gruppen statistisch nicht untermauert werden.

4.5.2 Expression des Natürlichen Killerzellen Rezeptors NKG2D auf jejunalem Epithel

Der Natürliche Killerzellen Rezeptor NKG2D zeigte bei Tieren im Alter von 32 Tagen, vier Tage nach dem Absetzen, zunächst eine deutlich niedrigere Expression in der Versuchsgruppe (s. Tabelle 28, $p \leq 0,05$). Am 39. Lebenstag kehrte sich dieser Effekt jedoch um. Bei den mit *B. toyonensis* gefütterten Tieren konnte eine signifikant erhöhte Genexpression des Rezeptors ($p \leq 0,05$) beobachtet werden. In beiden Gruppen stieg die NKG2D Genexpression am 39. Lebenstag im Vergleich zum Zeitpunkt vor dem Absetzen signifikant an ($p \leq 0,01$). In der Kontrollgruppe fand dieser Anstieg bereits kurz nach dem Absetzen, an Tag 32, statt ($p \leq 0,01$).

4.5.3 Expression von Cytokinen auf jejunalem Epithel

Parallel zu den Stressfaktoren wurde auch eine Genexpressionsanalyse verschiedener pro- und anti-inflammatorischer Cytokine durchgeführt. Diese erfolgte ebenfalls in, aus jejunalem Gewebe isolierter, Gesamt-RNA für die pro-inflammatorischen Interleukine IL-1 β , IL-8, sowie das anti-inflammatorische IL-10. In Tabelle 29 sind die arithmetischen Mittelwerte und Standardfehler dargestellt. Die angegebenen Werte wurden mittels Division durch den

Mittelwert der Referenzgene RPLa13, SDHA und Bet2g transformiert (Pieper *et al.*, 2012; Martin *et al.*, 2013). Für das pro-inflammatorische IL-1 β zeigte sich ein deutlicher Gruppenunterschied ($p \leq 0,05$). Besonders vor und sechs Tage nach dem Absetzen ist die Expression in der Versuchsgruppe stark erhöht. Kurz nach dem Absetzen, an Tag 32, zeigen beide Gruppen jedoch ein ähnliches Expressionsverhalten. Für IL-8 und IL-10 konnten keine signifikanten Unterschiede gezeigt werden. Innerhalb der Versuchsgruppe wurde eine deutlich verminderte IL-1 β Expression kurz nach dem Absetzen festgestellt. Diese regulierte sich kurze Zeit später. An Tag 34 war die Expressionsrate mit der vor dem Absetzen vergleichbar. Tendenziell zeigen sowohl IL-1 β als auch das anti-inflammatorische IL-10 innerhalb der Versuchsgruppe eine deutlich verminderte Expression am 39. Lebenstag. Eine solche Entwicklung wurde in der Kontrollgruppe nicht festgestellt. Bezüglich des Expressionsverhaltens von IL-8 zeigen beide Gruppen einen Anstieg an Tag 32 und, im Unterschied zu dem ebenfalls pro-inflammatorischen IL-1 β , einen deutlichen Anstieg der Expression an Tag 39 ($p \leq 0,03$).

Tabelle 28: Mittlere Genexpression der Stressfaktoren ULBP, MIC2 und des NKG2D-Rezeptors in jejunalen Epithelzellen

Alter [Tage]	Kontrolle ¹				<i>B. toyonensis</i> ¹			
	17	32	34	39	17	32	34	39
ULBP	1,49 (0,05 - 2,42)	1,20 (0,01 - 2,74)	0,87 (0,34 - 4,95)	0,91 (0,03 - 2,21)	1,74 ^b (1,01 - 6,95)	1,11 (0,59 - 2,97)	1,87 (0,42 - 5,54)	0,77 ^a (0,02 - 3,43)
MIC2	0,74 (0,03 - 5,15)	1,16 (0,20 - 8,31)	0,91 (0,46 - 1,71)	0,65 (0,02 - 7,14)	1,34 ^b (0,47 - 9,67)	0,82 (0,43 - 3,08)	1,07 (0,47 - 5,80)	0,59 ^a (0,06 - 1,19)
NKG2D	0,36 ^a (0,33 - 0,42)	1,08 ^{B,b} (0,57 - 2,18)	0,88 ^b (0,29 - 1,96)	0,88 ^{A,b} (0,50 - 1,61)	0,43 ^a (0,19 - 0,89)	0,52 ^{A,a} (0,31 - 1,34)	0,70 ^a (0,39 - 1,49)	1,51 ^{B,b} (0,56 - 2,65)

¹ Keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontroll- und Versuchsgruppe ($p \leq 0,05$; Mann-Whitney-U). ^{A,B} Zeitpunktabhängige Gruppenunterschiede, ^{a,b} Gruppenabhängige Zeitpunkunterschiede. Werte mit unterschiedlichen Superskripten unterscheiden sich signifikant ($p \leq 0,05$; Mann-Whitney-U). Die angegebenen Werte wurden mittels Division durch den Mittelwert der Referenzgene RPLa13, RPL19 und Bet2g transformiert. Dargestellt sind Medianwerte, sowie Minimum und Maximum; n = 5 pro Gruppe und Zeitpunkt. ULBP, UL16 binding protein; MIC2, MHC class I-related molecule 2; NKG2D, natural killer receptor 2D; p = Überschreitungswahrscheinlichkeit.

Tabelle 29: Mittlere Genexpression der pro-inflammatorischen Cytokine IL-1 β , IL-8 und des anti-inflammatorischen Cytokins IL-10 in jejunalen Epithelzellen

Alter [Tage]	Kontrolle				<i>B. toyonensis</i>				SEM	p		
	17	32	34	39	17	32	34	39		Gruppe	Alter	Gruppe x Alter
IL-1 β	1,23	1,35	0,73	1,38	3,41	1,10	2,93	0,19	0,208	0,046	0,016	0,002
IL-8	0,51	0,81	0,67	1,26	0,59	1,78	0,95	1,17	0,101	0,106	0,023	0,205
IL-10	1,06	1,25	0,79	1,21	2,40	0,98	2,33	0,81	0,173	0,104	0,357	0,081

Die angegebenen Werte wurden mittels Division durch den Mittelwert der Referenzgene RPLa13, SDHA und Bet2g transformiert. Dargestellt sind arithmetische Mittelwerte; n = 5 pro Gruppe und Zeitpunkt; p = Überschreitungswahrscheinlichkeit ($p \leq 0,05$; ANOVA).

4.6 NKG2D Genexpressionsanalysen

4.6.1 NKG2D Expression auf isolierten IEL Populationen

Um herauszufinden, welche intraepithelialen Lymphozyten dazu in der Lage sind, den Natürlichen Killerzellen Rezeptor NKG2D zu exprimieren, wurden verschiedene IEL Populationen durch *magnetic cell sorting* isoliert und via qRT-PCR auf mRNA Expression des Rezeptors untersucht. Wie in Abbildung 10 dargestellt, konnte erstmalig die Expression von NKG2D durch $\gamma\delta$ T-Zellen des Schweins nachgewiesen werden. Porzine $\gamma\delta$ T-Zellen ließen sich in CD5 positive und negative Populationen aufteilen. Hierbei schienen die CD5 negativen $\gamma\delta$ T-Zellen kaum NKG2D zu exprimieren (1,62 %), wohingegen die CD5 positiven $\gamma\delta$ T-Zellen eine deutliche Expression zeigten (21,5 %). CD8 β + Zellen, stellvertretend für zytotoxische T-Zellen im intestinalen Epithelium, zeigten den Messungen zufolge ebenfalls eine mäßig starke Expression des aktivierenden NK Rezeptors (7,55 %). NK-Zellen (CD2+/CD5-/CD16+) des Darmepithels exprimieren im Unterschied zu denen des Blutes kein NKG2D. Dies steht im Einklang mit Ergebnissen, die an NK-Zellen aus humanem Darmgewebe erzielt wurden. Auch diese exprimieren kein NKG2D (Rankin *et al.*, 2013). Die im Verhältnis stärkste Expression des NK Rezeptors mit 29,8 % konnte in CD3 positiven IEL festgestellt werden, also Zellen, die mithilfe eines CD3 Antikörpers (PPT3) isoliert wurden. Im Vergleich dazu zeigten die mittels CD5 Antikörper isolierten Zellen nur eine Expressionsrate von 2,54 %.

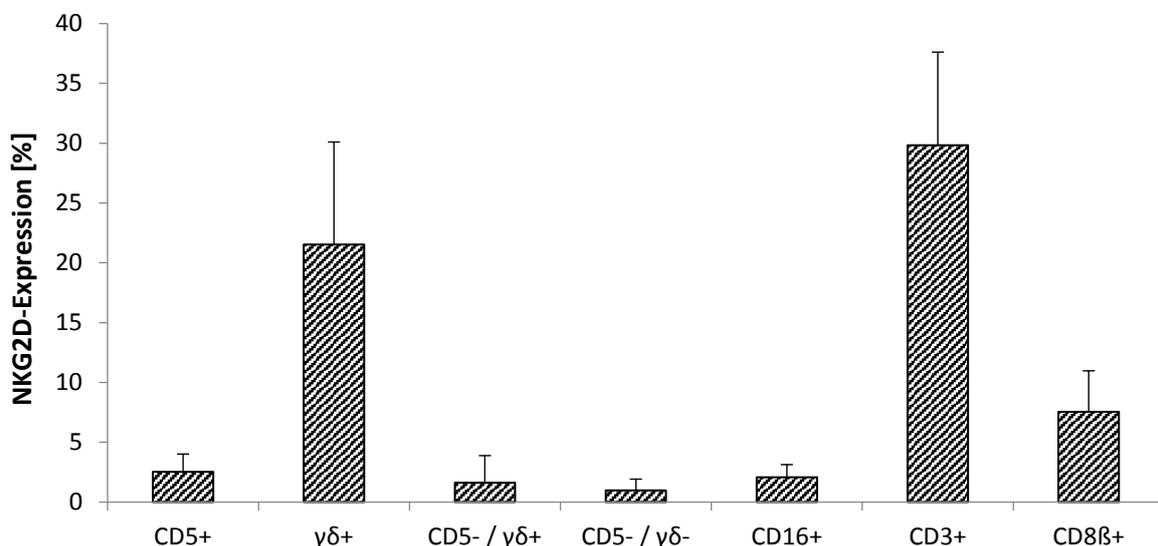


Abbildung 10: Mittlere RNA-Expression des NKG2D-Rezeptors in isolierten IEL Populationen

Zur Darstellung der NKG2D Expression auf den unterschiedlichen IEL Populationen wurde die Gesamtsumme der NKG2D RNA-Expression einer rT-PCR bestimmt und als 100 % festgelegt. Der gemessene NKG2D RNA-Gehalt der verschiedenen Zellpopulationen wurde dann als prozentualer Anteil dessen berechnet. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung aus vier DNA-Extraktionsansätzen.

4.6.2 Vergleich der NKG2D Expression auf isolierten T-Zellen nach Inkubation mit anti-CD5 (9G12) bzw. anti-CD3 Antikörpern (PPT3)

Um das Aktivierungspotential, des in dieser Arbeit verwendeten anti-CD3 Antikörpers, auf die Expression unterschiedlicher Gene durch verschiedene Zellpopulationen zu testen, wurden sowohl IELs als auch PBMCs verwendet und mittels MACS sortiert (Abbildung 5). In Tabelle 30 und Tabelle 31 ist die jeweilige relative Genexpression als Mittelwert dargestellt. Als Kontrolle diente dabei die Expression von Zellen, die mit dem anti-CD5 Antikörper (PG114A) inkubiert wurden.

Die Genexpressionsanalyse via RT-qPCR zeigte innerhalb der positiv selektierten CD8 β IELs eine 2,26-fach erhöhte NKG2D Expression nach der Inkubation mit dem CD3 Antikörper ($p = 0,032$). Dieser Effekt konnte bei den $\gamma\delta$ positiven IELs nicht gezeigt werden, hier war die Expressionsrate mit der der Kontrolle vergleichbar. Rein numerisch zeigte sich der gleiche, erhöhende Einfluss des CD3 Antikörpers auf die NKG2D Expression in CD8 β positiven PBMCs ($p > 0,05$). Zudem konnte in derselben Zellfraktion eine signifikante, zweifache Erhöhung der Expression des Stressfaktors MIC2 nachgewiesen werden ($p = 0,026$). Dies konnte wiederum numerisch auch in den CD8 β positiven IELs gezeigt werden. Sowohl für die $\gamma\delta$ isolierten IELs als auch PBMCs konnte kein Einfluss des CD3 Antikörpers auf die Expression von MIC2 gezeigt werden. Der zweite untersuchte Stressfaktor ULBP schien in allen isolierten Zellpopulationen unbeeinflusst. Auch für die pro- und anti-inflammatorischen Cytokine konnte kein aktivierender Effekt des CD3 Antikörpers nachgewiesen werden.

Tabelle 30: Relative Genexpression des NKG2D Rezeptors, pro- und anti-inflammatorischen Cytokinen und Stressfaktoren aus isolierten Lymphozytenpopulationen aus jejunalem Gewebe (IEL) nach Inkubation mit einem CD3 Antikörper (PPT3).

Gen	CD8 β + IEL				$\gamma\delta$ + IEL			
	Expression	p	Standardfehler	95% C.I.	Expression	p	Standardfehler	95% C.I.
NKG2D	2,259	0,032	1,275 - 3,771	1,058 - 6,655	1,123	0,825	0,478 - 3,083	0,250 - 5,040
IL-1 β	1,896	0,600	0,262 - 16,53	0,064 - 80,22	0,885	0,891	0,126 - 6,283	0,018 - 32,93
IL-8	1,724	0,162	1,045 - 3,438	0,636 - 4,040	0,951	0,796	0,646 - 1,405	0,488 - 1,804
IL-10	1,564	0,145	0,993 - 2,160	0,845 - 3,217	0,726	0,578	0,267 - 4,533	0,069 - 6,984
TGF- β	1,097	0,925	0,082 - 17,13	0,019 - 66,84	0,353	0,587	0,015 - 10,62	0,001 - 205,7
MIC2	1,844	0,106	1,015 - 2,858	0,805 - 4,818	0,799	0,686	0,381 - 1,899	0,170 - 3,427
ULBP	0,488	0,226	0,097 - 1,014	0,069 - 1,425	0,726	0,797	0,091 - 5,729	0,027 - 43,72
RPL19	0,915		Referenzgen		0,987		Referenzgen	
RPL13	1,093		Referenzgen		1,013		Referenzgen	

Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte der relativen Genexpression im Vergleich zu Zellen die mit einem CD5 Antikörper inkubiert wurden (PG114A). Anzahl der Wiederholungen: 1000; n = 4; C.I. = Konfidenzintervall; p = Überschreitungswahrscheinlichkeit ($p \leq 0,05$; t-Test).

Tabelle 31: Genexpressionsanalyse des NKG2D Rezeptors, pro- und anti-inflammatorischen Cytokinen und Stressfaktoren aus isolierten Lymphozytenpopulationen aus mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) nach Inkubation mit einem CD3 Antikörper (PPT3).

Gen	CD8B+ PBMC				γδ+ PBMC			
	Expression	p	Standardfehler	95% C.I.	Expression	p	Standardfehler	95% C.I.
NKG2D	3,667	0,191	0,973 - 14,96	0,456 - 29,77	0,686	0,781	0,124 - 5,451	0,014 - 26,53
IL-1β	1,569	0,725	0,127 - 17,81	0,089 - 226,2	1,960	0,595	0,319 - 14,25	0,146 - 39,08
IL-8	4,037	0,226	0,683 - 23,35	0,074 - 65,26	1,549	0,721	0,168 - 18,84	0,025 - 53,59
IL-10	4,185	0,141	1,031 - 14,72	0,557 - 36,85	2,491	0,272	0,779 - 13,76	0,165 - 28,65
TGF-β	2,717	0,474	0,197 - 42,01	0,103 - 145,6	2,161	0,672	0,136 - 33,30	0,098 - 183,6
MIC2	2,014	0,026	1,096 - 3,177	1,036 - 4,790	0,973	0,958	0,524 - 2,138	0,386 - 2,959
ULBP	4,621	0,235	0,677 - 22,16	0,339 - 53,54	0,506	0,190	0,214 - 1,182	0,144 - 1,736
RPL19	0,679		Referenzgen		1,175		Referenzgen	
RPL13	1,473		Referenzgen		0,851		Referenzgen	

Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte der relativen Genexpression im Vergleich zu Zellen die mit einem CD5 Antikörper inkubiert wurden (PG114A). Anzahl der Wiederholungen: 1000; n = 4; C.I. = Konfidenzintervall; p = Überschreitungswahrscheinlichkeit ($p \leq 0,05$; t-test).

4.6.3 Korrelation der Expression von NKG2D, Stressfaktoren und Cytokinen mit den Zellzahlen verschiedener IEL Populationen im jejunalen Epithel

Um einen Zusammenhang zwischen dem Expressionsverhalten von NKG2D und den beiden Stressfaktoren MIC2 und ULBP mit dem vermehrten Auftreten verschiedener IEL Populationen im jejunalen Gewebe zu bestimmen, wurden Korrelationsanalysen durchgeführt. Die entsprechenden Daten sind gruppenabhängig in Tabelle 32 und Tabelle 33 als Korrelationskoeffizienten dargestellt. Zunächst konnte hier in beiden Gruppen eine starke Korrelation zwischen der Expression des NKG2D Rezeptors und der Häufigkeit der CD45+ Leukozyten nachgewiesen werden (Kontrolle: 0,69; $p = 0,01$; *B. toyonensis*: 0,64; $p > 0,05$). Zudem korrelierte die Expression des Rezeptors in der Kontrollgruppe auch tendenziell mit dem Vorkommen von NK-Zellen, definiert als CD2/CD5- (0,44; $p > 0,05$), sowie den CD8 α / $\gamma\delta$ -Zellen (0,57; $p > 0,05$). Es konnte kein Zusammenhang zwischen der Rezeptorexpression und der Häufigkeit der CD8/ $\gamma\delta$ zytotoxischen T-Zellen nachgewiesen werden, jedoch tendenziell mit den CD8 β /CD16- zytotoxischen T-Zellen innerhalb der *B. toyonensis* Gruppe (0,60; $p > 0,05$). Die Expression der beiden Stressfaktoren ULBP und MIC2 korrelierte in keiner der beiden Gruppen mit der Expression des NKG2D Rezeptors. In der Kontrollgruppe konnte ein Zusammenhang der NK-Zellhäufigkeit mit der Expressionsrate der gemessenen Stressfaktoren MIC2 (0,71; $p = 0,02$) und ULBP (0,52; $p > 0,05$) festgestellt werden, welcher in der Versuchsgruppe nicht beobachtet werden konnte. Des Weiteren konnte in beiden Gruppen eine numerische Korrelation in der Häufigkeit der NK-Zellen mit den $\gamma\delta$ /CD5- T-Zellen (Kontrolle: 0,58, *B. toyonensis*: 0,35; $p > 0,05$), sowie eine negative Korrelation mit $\gamma\delta$ /CD5 T-Zellen (Kontrolle: -0,43, *B. toyonensis* -0,43; $p > 0,05$) gezeigt werden. Außerdem konnte innerhalb der Kontrollgruppe eine starke Korrelation der Häufigkeit der CD3 positiven Zellen mit der Expression des Stressfaktors ULBP gezeigt werden (0,67; $p = 0,03$), welche in der Versuchsgruppe hingegen als negative Korrelation beobachtet wurde (-0,76; $p = 0,01$). Die ULBP Expression korrelierte zudem mit dem Vorkommen der CD8/ $\gamma\delta$ Zellen in der Kontrollgruppe (0,66; $p = 0,04$) und gruppenunabhängig mit dem Vorkommen der $\gamma\delta$ /CD5-T-Zellen (Kontrolle: 0,67; $p = 0,05$; *B. toyonensis*: 0,66; $p = 0,04$), jedoch nicht mit den $\gamma\delta$ /CD5 T-Zellen.

Zudem konnte eine starke, gruppenübergreifende Korrelation der Expression von ULBP und MIC2 mit der des pro-inflammatorischen Cytokins IL-1 β beobachtet werden ($p \leq 0,01$). Ein ähnlicher Zusammenhang zeigte sich zwischen der Expression von MIC2 und dem anti-inflammatorischen IL-10 ($p \leq 0,01$). Des Weiteren konnte in beiden Gruppen eine starke Korrelation in der Expression von IL-1 β und IL-10 beobachtet werden ($p \leq 0,01$).

Tabelle 32: Korrelation der Expression von NKG2D und Stressfaktoren in jejunalem Gewebe mit der verschiedener Cytokine und der Zellzahl isolierter IEL Populationen innerhalb der Kontrollgruppe

		Korrelation - Kontrollgruppe													
	NKG2D	CD45	CD3	CD8 β / CD16-	CD8/ $\gamma\delta$	CD5/ $\gamma\delta$	CD5-/ $\gamma\delta$	CD2/ CD5-	CD16/ CD8 β -	CD8 α / $\gamma\delta$ -	ULBP	MIC2	IL-1 β	IL-8	IL-10
NKG2D	1,00	0,69**	0,25	0,28	0,11	0,09	0,15	0,44	0,44	0,57	0,01	0,20	-0,16	-0,01	-0,15
CD45	0,69**	1,00	0,60	0,65*	0,21	0,23	-0,12	0,61	0,69*	0,84**	0,08	0,35	-0,21	-0,70*	-0,09
CD3	0,25	0,60	1,00	0,85**	0,83**	-0,01	0,46	0,60*	0,66*	0,61*	0,67*	0,15	0,36	0,01	0,66*
CD8 β /CD16-	0,28	0,65*	0,85**	1,00	0,52	-0,12	0,18	0,48	0,62*	0,73**	0,62	0,08	0,45	-0,25	0,50
CD8/ $\gamma\delta$	0,11	0,21	0,83**	0,52	1,00	0,21	0,65*	0,63*	0,64*	0,32	0,66*	0,26	0,47	0,24	0,74**
CD5/ $\gamma\delta$	0,09	0,23	-0,01	-0,12	0,21	1,00	-0,03	-0,43	-0,22	-0,26	-0,23	-0,06	-0,47	0,33	-0,28
CD5-/ $\gamma\delta$ +	0,15	-0,12	0,46	0,18	0,65*	-0,03	1,00	0,58	0,39	0,26	0,67*	0,36	0,57	0,30	0,58
CD2/CD5-	0,44	0,61	0,60*	0,48	0,63*	-0,43	0,58	1,00	0,92**	0,71*	0,52	0,71*	0,50	-0,40	0,48
CD16/CD8 β -	0,44	0,69*	0,66*	0,62*	0,64*	-0,22	0,39	0,92**	1,00	0,78**	0,49	0,70*	0,47	-0,48	0,45
CD8 α / $\gamma\delta$ -	0,57	0,84**	0,61*	0,73**	0,32	-0,26	0,26	0,71*	0,78**	1,00	0,50	0,55	0,26	-0,53	0,17
ULBP	0,01	0,08	0,67*	0,62	0,66*	-0,23	0,67*	0,52	0,49	0,50	1,00	0,54**	0,71**	-0,30	0,71**
MIC2	0,20	0,35	0,15	0,08	0,26	-0,06	0,36	0,71*	0,70*	0,55	0,54**	1,00	0,67**	-0,15	0,76**
IL-1 β	-0,16	-0,21	0,36	0,45	0,47	-0,47	0,57	0,50	0,47	0,26	0,71**	0,67**	1,00	-0,09	0,92**
IL-8	-0,01	-0,70*	0,01	-0,25	0,24	0,33	0,30	-0,40	-0,48	-0,53	-0,30	-0,15	-0,09	1,00	-0,60
IL-10	-0,15	-0,09	0,66*	0,50	0,74**	-0,28	0,58	0,48	0,45	0,17	0,71**	0,76**	0,92**	-0,06	1,00

Zur Bestimmung der Korrelationskoeffizienten wurde der Spearman rho Test angewandt; *p \leq 0,05; **p \leq 0,01; n = 20. p = Überschreitungswahrscheinlichkeit.

Tabelle 33: Korrelation der Expression von NKG2D und Stressfaktoren in jejunalem Gewebe mit der verschiedenen Cytokine und der Zellzahl isolierter IEL Populationen innerhalb der *B. toyonensis* Gruppe

Korrelation - <i>B. toyonensis</i> Gruppe															
	NKG2D	CD45	CD3	CD8β/ CD16-	CD8/ γδ	CD5/ γδ	CD5-/ γδ	CD2/ CD5-	CD16/ CD8β-	CD8α/ γδ-	ULBP	MIC2	IL-1β	IL-8	IL-10
NKG2D	1,00	0,64	0,72*	0,60	0,25	-0,19	0,24	0,30	0,20	0,46	-0,05	-0,11	-0,41*	0,29	-0,15
CD45	0,64	1,00	0,87**	0,75*	0,28	-0,23	0,23	0,70*	0,57	0,95*	-0,52	0,07	-0,38	-0,20	1,12
CD3	0,72*	0,87**	1,00	0,65	0,48	0,13	0,15	0,27	0,12	0,77*	-0,76*	0,14	-0,71*	0,23	0,19
CD8β/CD16-	0,60	0,75*	0,65	1,00	0,22	-0,28	0,25	0,46	0,24	0,56	-0,21	0,43	-0,22	-0,11	0,29
CD8/γδ	0,25	0,28	0,48	0,22	1,00	0,69*	0,80**	0,08	0,10	0,06	0,19	0,31	0,22	-0,46	0,05
CD5/γδ	-0,19	-0,23	0,13	-0,28	0,69*	1,00	0,43	-0,54	-0,43	-0,51	-0,08	0,13	0,06	-0,21	0,19
CD5-/γδ+	0,24	0,23	0,15	0,25	0,80**	0,43	1,00	0,35	0,45	0,11	0,66*	0,41	0,67*	-0,45	-0,03
CD2/CD5-	0,30	0,70*	0,27	0,46	0,08	-0,54	0,35	1,00	0,94**	0,82**	0,09	-0,20	0,15	0,02	-0,46
CD16/CD8β-	0,20	0,57	0,12	0,24	0,10	-0,43	0,45	0,94**	1,00	0,68*	0,14	-0,21	0,18	0,09	-0,52
CD8α/γδ-	0,46	0,95**	0,77*	0,56	0,06	-0,51	0,11	0,82**	0,68*	1,00	-0,36	-0,10	-0,29	0,18	-0,23
ULBP	-0,05	-0,52	-0,76*	-0,21	0,19	-0,08	0,66*	0,09	0,14	-0,36	1,00	0,29	0,64**	-0,16	0,17
MIC2	-0,11	0,07	0,14	0,43	0,31	0,13	0,41	-0,20	-0,21	-0,10	0,29	1,00	0,71**	-0,23	0,83**
IL-1β	-0,41*	-0,38	-0,71*	-0,22	0,22	0,06	0,67*	0,15	0,18	-0,29	0,64**	0,71**	1,00	-0,52**	0,68**
IL-8	0,29	-0,20	0,23	-0,11	-0,46	-0,21	-0,45	0,02	0,09	0,18	-0,16	-0,23	-0,52**	1,00	-0,23
IL-10	-0,15	0,12	0,19	0,29	0,45	0,19	-0,03	-0,46	-0,53	-0,23	0,17	0,83**	0,68**	-0,23	1,00

Zur Bestimmung der Korrelationskoeffizienten wurde der Spearman rho Test angewandt; *p ≤ 0.05; **p ≤ 0.01; n = 20. p = Überschreitungswahrscheinlichkeit.

4.6.4 Morphologische Veränderungen im jejunalen Darmepithel

Zur Evaluierung morphologischer Veränderungen im intestinalen Epithel wurden Zottenlänge, -breite, -fläche und -umfang, sowie die Kryptentiefe bestimmt. Die Mittelwerte dieser Messungen sind in Tabelle 34 dargestellt. Bezüglich der Zottenlänge konnte mithilfe der histologischen Messung ein deutlicher Unterschied zwischen Versuchsgruppe und Kontrollgruppe festgestellt werden. Vor allem an Tag 17 wurden bei den Ferkeln der Versuchsgruppe deutlich längere Zotten gemessen ($p \leq 0,01$). Auch kurz nach dem Absetzen zeigte die Versuchsgruppe an Tag 32 und 34 immer noch verlängerte Zotten im Vergleich zur Kontrolle ($p \leq 0,01$; $p = 0,02$). An Tag 39 jedoch kehrte sich dieser Effekt um. Zu diesem Zeitpunkt wurden in der Versuchsgruppe signifikant kürzere Zotten gemessen als in der Kontrollgruppe ($p \leq 0,01$). In beiden Gruppen waren die Zotten vor dem Absetzen deutlich länger als kurz nach dem Absetzen ($p \leq 0,01$). In der Zottenbreite konnte kein Gruppenunterschied festgestellt werden. Es zeigte sich jedoch, dass die Zotten der Tiere in der Versuchsgruppe von Tag 17 bis zu Tag 39 verschmälern ($p = 0,01$), in der Kontrollgruppe hingegen verbreiterten sich die Zotten im Laufe dieser Zeit ($p = 0,02$). Auch in der Kryptentiefe unterschieden sich die beiden Gruppen nicht signifikant. Es zeigte sich jedoch ein ähnlicher Verlauf wie bei der Zottenbreite. In der Kontrollgruppe wurden zu Tag 39 deutlich tiefere Krypten gemessen als zu früheren Zeitpunkten, bei der Versuchsgruppe deutlich kürzere Krypten ($p \leq 0,05$). Bedingt durch die Abweichungen der beiden Gruppen in der Zottenlänge, wurden auch signifikante Unterschiede in Zottenfläche und -umfang gemessen ($p \leq 0,01$). Beide Faktoren sind bei der Versuchsgruppe deutlich größer als bei der Kontrollgruppe ($p \leq 0,01$). Wie bei der Zottenlänge auch, scheint sich diese Entwicklung zu einem späteren Zeitpunkt, hier an Tag 39, umzukehren ($p \leq 0,01$).

Zusätzlich wurde zudem das Verhältnis von Zottenlänge zu Kryptentiefe bestimmt. Die entsprechenden Werte sind ebenfalls in Tabelle 34 dargestellt. Hier konnte ebenfalls zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe differenziert werden. Im Unterschied zur Zottenlänge unterscheiden sich die Werte beider Gruppen jedoch im Zottenlänge zu Kryptentiefe Verhältnis deutlich weniger ($p = 0,05$). Altersbedingt konnte bei beiden Gruppen ein ähnlicher Verlauf festgestellt werden. Von Tag 17 bis Tag 39 wird das Verhältnis von Zottenlänge zu Kryptentiefe immer geringer ($p \leq 0,01$). Das heißt, bei gering veränderter Kryptentiefe verkürzen sich die Zotten im Laufe dieses Zeitraums.

Tabelle 34: Veränderungen unterschiedlicher morphologischer Parameter im jejunalen Darmepithel

Alter [Tage]	Kontrolle				<i>B. toyonensis</i>				SEM	Gruppe	p	
	17	32	34	39	17	32	34	39			Alter	Gr. x Alter
Zottenlänge [μm]	550	304	320	364	688	384	381	306	17,3	$\leq 0,001$	$\leq 0,001$	$\leq 0,001$
Zottenbreite [μm]	112	120	112	151	130	119	122	119	2,44	0,754	0,022	$\leq 0,001$
Kryptentiefe [μm]	107	89,4	108	131	133	98,7	117	98,5	2,57	0,499	$\leq 0,001$	$\leq 0,001$
Zottenfläche [μm^2]	57900	32800	33400	49500	83800	42400	42800	35300	2250	0,002	$\leq 0,001$	$\leq 0,001$
Zottenumfang [μm]	1400	840	870	1050	1680	1050	1020	860	37,1	$\leq 0,001$	$\leq 0,001$	$\leq 0,001$
Zotte / Krypte	5,13	3,47	3,04	2,80	5,22	4,01	3,29	3,10	0,13	0,049	$\leq 0,001$	0,755

Angegeben sind die arithmetischen Mittelwerte; n = 10 pro Gruppe und Zeitpunkt; p = Überschreitungswahrscheinlichkeit ($p \leq 0,05$; ANOVA).

Tabelle 35: Mittlere Anzahl der CD3+ Lymphozyten im jejunalen Darmepithel

Alter [Tage]	Kontrolle				<i>B. toyonensis</i>				SEM	Gruppe	p	
	17	32	34	39	17	32	34	39			Alter	Gr. x Alter
CD3+ / Darmzotte	16,9	28,7	22,4	24,8	14,9	14,6	18,9	14,6	1,42	0,010	0,480	0,360
CD3+ / 100 Epithelzellen	11,3	24,1	17,0	17,8	8,80	9,45	12,2	12,3	1,15	0,010	0,120	0,170

Angegeben sind die arithmetischen Mittelwerte; n = 5 pro Gruppe und Zeitpunkt; p = Überschreitungswahrscheinlichkeit ($p \leq 0,05$; ANOVA).

5 Diskussion

5.1 Hintergrund und Ziel der Arbeit

Probiotische Futtermittelzusatzstoffe werden in der Tierernährung, insbesondere bei Ferkeln, häufig eingesetzt. Seit dem europaweiten Verbot von antibiotischen Leistungsförderern im Jahr 2006, sind Probiotika in der Nutztierhaltung besonders interessant geworden und werden vermehrt zu gesundheits- und leistungsfördernden Zwecken eingesetzt. Erhöhte Lebendmassezunahmen, verbesserte Futteraufnahmen und -verwertungen, sowie eine Reduktion der Durchfallinzidenz und der Sterblichkeitsrate in der Ferkelzucht konnten dabei auf den Einsatz von Probiotika zurückgeführt werden. Einer der wichtigen Wirkmechanismen der Probiotika beruht dabei auf einer Modulation der Immunantwort im Tier.

Die vorliegende Studie wurde durchgeführt, um den Einfluss des probiotischen Bakteriums *Bacillus toyonensis* auf das jejunale Epithel des Schweins zu untersuchen. Dabei wurden Veränderungen in der intestinalen Integrität der Tiere untersucht und mit der Entwicklung unterschiedlicher Immunzellpopulationen in Zusammenhang gebracht. Außerdem wurde der Einfluss des Probiotikums auf die Gesundheit der intestinalen Epithelzellen untersucht, indem die Signalisierung von Stress an die Immunzellen erfasst wurde. Des Weiteren wurden Veränderungen der intestinalen Morphologie sowie der Einfluss auf die Leistungsparameter der Ferkel untersucht. Des Weiteren wurden Untersuchungen zum immunologischen Reaktionsverhalten während der Phase des Absetzens durchgeführt, um einen besseren Einblick in die Entwicklung verschiedener Lymphozytenpopulationen zu erhalten. Abschließend erfolgten genauere Untersuchungen einzelner Lymphozytenpopulationen und deren Rolle in der Abwehrfunktion. Besonderes Augenmerk lag dabei auf ihrer Fähigkeit den NKG2D Rezeptor zu exprimieren und dadurch mit den sie umgebenden Enterozyten zu kommunizieren.

5.2 Versuchsteil I: Der Einfluss des probiotischen *B. toyonensis* auf die Integrität und Morphologie des Darmepithels und die intestinale Immunantwort beim Ferkel

5.2.1 Lebendmasseentwicklung

Bei der Betrachtung der Leistungsdaten in der durchgeführten *B. toyonensis* Studie, konnten während des gesamten Betrachtungszeitraums keine Unterschiede in der Lebendmasse bzw. Lebendmassezunahme zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden. Frühere Studien, bei welchen jedoch nur die Ferkel und nicht die Sauen der Versuchsgruppe mit dem Probiotikum gefüttert wurden, zeigten hingegen positive Effekte des Probiotikums auf die Gewichtsentwicklung bei Ferkeln (Alexopoulos *et al.*, 2001; Taras *et al.*, 2005). Hierbei ist jedoch zu beachten, dass vor allem im Alter von sechs bis acht Wochen eine erhöhte Lebendmassezunahme in der Probiotikagruppe nachgewiesen wurde (Taras *et al.*, 2005) und erst ab der siebten Woche ein Unterschied in der Lebendmasse beobachtet wurde (Alexopoulos *et al.*, 2001). Bis zu diesem Zeitpunkt konnte auch in vorherigen Studien kein fördernder Einfluss von *B. toyonensis* auf die Lebendmasseentwicklung gezeigt werden.

Insgesamt betrachtet entwickelten sich die Ferkel beider Gruppen in den ersten drei Lebenswochen entsprechend der Erwartungen. Verglichen mit der durchschnittlichen Lebendmasseentwicklung wachsender Ferkel nach Kirchgeßner (2004) befanden sich die Tiere beider Gruppen jederzeit im oberen Drittel des durchschnittlichen Lebendmassebereichs.

Während der ersten drei Lebenswochen war kein Einfluss von *B. toyonensis* auf die Leistungsparameter der Ferkel zu beobachten. Des Weiteren gab es keine Hinweise auf positive oder negative Effekte auf die Tiergesundheit. Der gesundheitliche Status der Ferkel war während der gesamten Studie unauffällig und unbeeinträchtigt von der Probiotikazugabe. Durch die Zählung koloniebildender Einheiten im Kot der Ferkel konnte das Vorhandensein von *B. toyonensis* in der Versuchsgruppe bereits vor dem Absetzen deutlich nachgewiesen werden ($7,55 \times 10^3$ KBE/g Fäzes). Studien haben gezeigt, dass Saugferkel durch die Aufnahme von bis zu 20 g Fäzes von den Muttertieren pro Tag auch wesentliche Mengen der supplementierten probiotischen Bakterien aufnehmen (Sansom und Gleed, 1981; Taras *et al.*, 2005). Die Menge an so aufgenommenen *B. toyonensis* Zellen schien in dieser Studie jedoch gering zu sein. Die an Tag 17 bestimmte Anzahl koloniebildender Einheiten unterschied sich in der Probiotikagruppe zwar signifikant von

der Kontrolle, war insgesamt jedoch sehr gering. Zudem erhielten die Ferkel das Probiotikum ab einem Alter von 14 Tagen über das Saugferkelbeifutter (Tabelle 5), weshalb die hier bestimmte Menge an *B. toyonensis* vermutlich eher auf die Supplementierung des Ferkelfutters zurückzuführen ist.

Da beide Gruppen keine Anzeichen von Krankheiten aufwiesen, lässt dies einen Effekt von *B. toyonensis* auf potentielle Krankheitserreger jedoch nicht ausschließen. Um den gesundheitsfördernden Einfluss des Probiotikums belegen zu können, wäre die Durchführung von *challenge* Versuchen interessant. Ähnliche Studien zeigten diesbezüglich eine protektive Wirkung von *B. toyonensis* bei einer Infektion mit dem krankheitserregenden *Salmonella* Typhimurium DT104 (Scharek-Tedin *et al.*, 2013).

5.2.2 Veränderungen der Integrität der intestinalen Barriere

Während der Phase des Absetzens kommt es zu einer Vielzahl von Veränderungen beim Ferkel (siehe 2.4). Kurz nach dem Absetzen, was in der heutigen Tierhaltung meist zwischen dem 21. und 28. Tag durchgeführt wird, wird dabei häufig eine reduzierte Futteraufnahme, bis hin zur Unterernährung beobachtet (Le Dividich und Sève, 2000). Die in dieser Zeit häufig auftretenden Durchfallerkrankungen, die oftmals auch bis zur Unterernährung führen, verursachen auch heute noch einen erheblichen wirtschaftlichen Schaden in der Schweineproduktion (Madec *et al.*, 1998; Melin *et al.*, 2000). Oft stehen Futtermittelallergien, bzw. -hypersensitivitäten mit diesen Durchfallerscheinungen und einer schlechten Lebendmasseentwicklung im Zusammenhang (Li *et al.*, 1990b; Li *et al.*, 1991). Studien deuten darauf hin, dass diese Überreaktionen auf Futtermittelantigene dabei wiederum häufig aus einer gestörten Barrierefunktion des Darmepithels resultiert (Groschwitz und Hogan, 2009). Wo genau dieser Kreislauf beginnt, ist jedoch eine häufig diskutierte Frage. *In-vitro* Studien zeigten beispielsweise eine gestörte intestinale Barriere als Resultat einer erhöhten Aktivierung zytotoxischer T-Zellen (Zufferey *et al.*, 2009).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Integrität der intestinalen Darmschranke während und zu mehreren Zeitpunkten nach dem Absetzen beobachtet und insbesondere auf einen Einfluss des probiotischen Bakteriums *B. toyonensis* hin beschrieben.

5.2.2.1 HRP-Permeabilität

Zur Bestimmung der Permeabilität des intestinalen Epithels für größere Moleküle wurde die Meerrettichperoxidase(HRP)-Durchflussrate mittels Ussing-Kammer bestimmt. HRP ist ein 40 kDa großes Protein mit enzymatischer Aktivität. Dadurch lassen sich schon geringe Mengen und Veränderungen einfacher nachweisen als bei anderen Makromolekülen, die

ebenfalls zur Untersuchung der intestinalen Barrierefunktion verwendet werden, wie z. B. Mannitol (Wijten *et al.*, 2011). Der transzelluläre Transport findet größtenteils über Endozytose, direkt durch die Epithelzellen statt, aber auch parazellulär, also zwischen den Zellen durch die *tight junctions* (Bijlsma *et al.*, 1996; Cameron und Perdue, 2007; Keita *et al.*, 2010). Dabei ist eine erhöhte HRP-Durchflussrate ein Indiz für eine gestörte intestinale Barriere (Cameron und Perdue, 2007).

Studien mit *B. toyonensis* haben einen Einfluss des Probiotikums auf die Durchlässigkeit der Darmbarriere dokumentiert. Dabei zeigte die Verabreichung von 10^9 KBE / kg über einen Zeitraum von 21 Tagen eine deutlich reduzierte Mannitol-Fluxrate in Ussing-Kammer Untersuchungen bei wachsenden Ferkeln (Winckler, 1997). Die Autoren schlussfolgerten hieraus einen positiven Einfluss von *B. toyonensis* auf die Barrierefunktion. Ein generell stabilisierender Einfluss des Probiotikums auf die intestinale Barriere konnte in der vorliegenden Untersuchung jedoch nicht bestätigt werden. Innerhalb der ersten Woche nach dem Absetzen ließ sich eine deutlich erhöhte HRP-Durchlässigkeit im mittleren Jejunum, im Vergleich zur Kontrolle, nachweisen. Vor allem an Tag 32, also vier Tage nach dem Absetzen, ist ein deutlicher Gruppenunterschied zu erkennen, was darauf hindeutet, dass die Tiere der Versuchsgruppe stärker von dem Stress des Absetzens beeinflusst sein könnten. Es konnten jedoch zeitgleich keine gesundheitlichen Auffälligkeiten der Tiere in der Versuchsgruppe beobachtet werden. Dies lässt darauf schließen, dass eine erhöhte Durchlässigkeit der Darmschranke nicht direkt als negativ zu bewerten ist. Während eine gestörte intestinale Barriere oft im Zusammenhang mit Futtermittelhypersensibilitäten steht (Groschwitz und Hogan, 2009), könnte eine leicht erhöhte Durchlässigkeit jedoch unterstützend bei der Präsentation von Antigenen und dem Resorptionsverhalten des Epithels wirken. Wann der Punkt erreicht wird, an dem die intestinale Barriere zu durchlässig ist, ist nicht bekannt. Anhand der vorliegenden Daten konnte jedoch kein negativer Einfluss der erhöhten Durchlässigkeit der Darmschranke auf die Tiergesundheit beobachtet werden. Wie die meisten Mitglieder der *Bacillus* Spezies, produziert auch *B. toyonensis* das auf Epithelzellen lytisch wirkende Hämolyisin (Beecher *et al.*, 1995; Prüss *et al.*, 1999; EFSA, 2012). Eine mäßige Ausschüttung dieser funktionalen Toxine könnte dabei im Zusammenhang mit den immunstimulierenden Eigenschaften des Probiotikums stehen, die in mehreren Fütterungsstudien demonstriert wurden (Scharek *et al.*, 2007; Schierack *et al.*, 2007). *In-vitro* Studien mit menschlichen, intestinalen Epithelzellen zeigten jedoch auch eine Störung der intestinalen Barriere durch die Aktivierung zytotoxischer T-Zellen (Zufferey *et al.*, 2009). Eine Aktivierung der intraepithelialen Lymphozyten (IELs) durch eine erhöhte Produktion von Stressmolekülen der Enterozyten könnte dabei die beeinträchtigte Darmschranke in der Versuchsgruppe, vor allem in der Phase des

Absetzens, erklären. Ein derartiges Verhalten konnte jedoch, in der hier durchgeführten Arbeit, nicht bestätigt werden.

Anhand der vorliegenden Ergebnisse scheint sich die Darmschranke innerhalb von fünf Tagen nach dem Absetzen zu stabilisieren. Die jejunale HRP-Durchlässigkeit innerhalb der Versuchsgruppe war zu diesem Zeitpunkt, im Vergleich zu den jüngeren Tieren, deutlich reduziert und unterschied sich nicht mehr von der Kontrolle. Zu diesem Zeitpunkt erhielten die Ferkel der Versuchsgruppe das Probiotikum seit 25 Tagen, die Sauen bereits seit 90 Tagen ante partum. Studien mit einem mit dieser Arbeit vergleichbaren Versuchsmodell konnten keinen signifikanten Einfluss von *B. toyonensis* auf die jejunale Barrierefunktion, weder vor noch nach dem Absetzen, zeigen (Lodemann *et al.*, 2008). Jedoch demonstrierten diese Studien einen gruppenunabhängigen Alterseffekt. An Tag 35, sechs Tage nach dem Absetzen, zeigten sie eine deutliche Reduktion der Mannitol-Durchflussrate und damit eine Probiotika-unabhängige Stabilisierung der Darmschranke. Dieses Ergebnis ist im Einklang mit der in dieser Arbeit demonstrierten sukzessiven Stabilisierung der Darmwandpermeabilität nach dem Absetzen. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch nur in der Versuchsgruppe beobachtet werden.

Frühere Studien dokumentierten bereits eine negative Entwicklung der intestinalen Integrität aufgrund des Absetzens. Dabei spielen viele Faktoren gemeinsam eine Rolle. Zu den wichtigsten gehören dabei das junge Alter der Tiere und der Stress des Absetzens, die reduzierte Futteraufnahme und die Zusammensetzung des Futters nach dem Absetzen, sowie die daraus resultierenden Veränderungen der intestinalen Mikrobiota (Wijten *et al.*, 2011). In dieser Arbeit konnte jedoch kein Probiotika-unabhängiger Einfluss des Absetzens auf die jejunale HRP-Permeabilität festgestellt werden. Um dies genauer beurteilen zu können, wären Ussing-Kammer Untersuchungen zum Zeitpunkt vor dem Absetzen interessant. Trotz der Probennahme an Tag 17 war dies jedoch nicht möglich, da sich das Probenmaterial der sehr jungen Tiere als zu fragil erwies, um in die Ussing-Kammer eingespannt zu werden. Daher wäre es hierbei interessant, das Versuchsmodell zu erweitern und zu mehreren Zeitpunkten vor dem Absetzen, beispielsweise an Tag 27, Gewebeproben zu entnehmen.

Zusammengenommen deutet dies darauf hin, dass *B. toyonensis* zwar keinen verstärkenden Einfluss auf die intestinale Barriere während der kritischen Phase des Absetzens zu haben scheint, sich jedoch bei abgesetzten Ferkeln stabilisierend auf die Darmschranke auswirken kann.

5.2.2.2 Hypersensitivität

Im Zusammenhang mit einer gestörten intestinalen Barriere stehen oft Hypersensitivitäten gegenüber Futtermittelantigenen bis hin zu stärker ausgeprägten Futtermittelallergien und die damit einhergehenden Durchfallerkrankungen und schlechten Lebendmasseentwicklungen der Ferkel. Dabei wird vermutet, dass eine gestörte Barriere des Darmepithels das vermehrte Eindringen von Futtermittelantigenen aus dem Darmlumen ermöglicht und somit Antigen-spezifische Immunreaktionen hervorruft (Groschwitz und Hogan, 2009). Jedoch ist unklar, ob eine gestörte intestinale Barriere zur Futtermittelallergie führt, oder aber durch Allergien verursachte Entzündungsreaktionen zu epithelialen Dysfunktionen führen. Beide Faktoren sind jedoch Teil eines sich selbst-erhaltenden Zyklus (Heyman, 2005).

Zu diesen Hypersensitivitäten auslösenden Futtermittelantigenen zählen unter anderem Sojaproteine, welche jedoch aufgrund ihrer guten Nährstoffeigenschaften oft in der Futtermittelindustrie Verwendung finden. Hauptverantwortlich für die allergieauslösenden Eigenschaften des Sojaproteins sind dabei Glycinin und β -Conglycinin, die Hauptspeicherproteine von Soja (Zhao *et al.*, 2008). Als ein Indiz für potentielle Hypersensitivitätsreaktionen werden häufig die Antikörpertiter gegen diese beiden Proteine im Blutserum untersucht (Li *et al.*, 1990b). Daher wurden in der vorliegenden Arbeit die Glycinin Antikörpertiter in Blutserumproben zu verschiedenen Zeitpunkten vor und während der Phase des Absetzens bestimmt, um die Durchlässigkeit der Darmschranke für Sojaantigene und einen möglichen Einfluss von *B. toyonensis* auf diese zu untersuchen. Dabei zeigte sich ein deutlicher Einfluss des Probiotikums, vor allem aber im Zusammenhang mit dem Absetzen bzw. dem Ausbleiben der Sauenmilch. Vor dem Absetzen ist die Menge an Glycinin Antikörpern in der Versuchsgruppe niedriger als in der Kontrolle. Im Gegensatz zum Absetzferkel (siehe 5.2.2.1) deutet dies also zunächst auf einen barrierestabilisierenden Einfluss des Probiotikums beim Saugferkel hin. Es gibt bisher nur wenige Publikationen, die sich mit der Wirksamkeit von Probiotika auf die Vorbeugung und Linderung von Futtermittelhypersensitivitäten befassen. Bisherige Studien bezogen sich zudem meist auf die Gruppe der Milchsäurebakterien und beziehen sich in den meisten Fällen auf *in-vitro* durchgeführte Versuche (Castellazzi *et al.*, 2013). In einer der wenigen *in-vivo* Studien wurde *Lactococcus lactis* NCC 2287 Ovalbumin sensibilisierten Mäusen über einen Zeitraum von 7 Wochen verabreicht und führte zu einer deutlichen Linderung der Allergieausprägung. Die vorbeugende Verabreichung des Probiotikums vor der Sensibilisierung hatte jedoch keine Auswirkungen (Zuercher *et al.*, 2011).

In der vorliegenden Arbeit konnte nach dem Absetzen ein deutlich erhöhter Glycinin-Antikörpertiter in der Versuchsgruppe beobachtet werden. Die Differenz zwischen den beiden Gruppen stieg dabei ab dem Zeitpunkt kurz nach dem Absetzen stetig an und war elf Tage nach dem Absetzen am deutlichsten. Zusammen mit der gemessenen HRP-Durchlässigkeit ist dies der zweite, in dieser Arbeit untersuchte Parameter, der auf einen barriereverringenden Einfluss von *B. toyonensis* hindeutet.

Hohe Mengen an Soja-Antikörpern können zu intestinalen Störungen und einer ungenügenden Aufnahme von Nährstoffen im Dünndarm führen (Li *et al.*, 1991). Bei Soja-sensibilisierten und mit Sojamehl gefütterten, abgesetzten Ferkeln ging ein erhöhter Soja-Antikörpertiter mit einer reduzierten Wachstumsrate in den ersten Wochen nach dem Absetzen einher. Dabei konnte eine deutliche Villusatrophie nachgewiesen werden, jedoch kein Einfluss auf die Tiefe der Krypten (Li *et al.*, 1990b). Frühere Studien haben gezeigt, dass die deutlich reduzierte Futteraufnahme innerhalb der ersten zwei Tage nach dem Absetzen, welche ebenfalls mit morphologischen Veränderungen (siehe 2.4.1) verbunden ist, die Darmwand durchlässiger für luminale Antigene macht. Dies könnte wiederum eine Erklärung für die generell häufig auftretenden Hypersensitivitätsreaktionen kurz nach dem Absetzen sein (McCracken *et al.*, 1995; McCracken *et al.*, 1999). In der Probiotikagruppe konnten bis zu einer Woche nach dem Absetzen deutlich längere Zotten als in der Kontrollgruppe gemessen werden. An Tag 39 sind diese jedoch deutlich verkürzt im Vergleich zu den früheren Messzeitpunkten. Dies ging zu genau diesem Zeitpunkt mit einem besonders hohen Glycinin-Antikörpertiter in der Probiotikagruppe einher. Die untersuchten Tiere beider Gruppen zeigten jedoch keine gesundheitlichen Auffälligkeiten. Ein Einfluss von *B. toyonensis* auf die Häufigkeit von, eventuell durch Futtermittelhypersensitivitäten verursachte, Durchfallerscheinungen während des Absetzens konnte daher nicht nachgewiesen werden. Die bereits mehrfach beschriebene Villusatrophie nach dem Absetzen (Pluske *et al.*, 1997; van Beers-Schreurs *et al.*, 1998; Lallès *et al.*, 2004) konnte allerdings in beiden Gruppen gleichermaßen beobachtet werden. Zudem konnte in der Kontrollgruppe kein erhöhter Antikörpertiter nach dem Absetzen gemessen werden. Dies deutet, neben den rein morphologischen Veränderungen, auf eine andere, bzw. weitere Ursache für die vermehrte Passage luminaler Antigene ins Blut der mit *B. toyonensis* gefütterten Tiere hin. Die generell gestörte intestinale Barrierefunktion, die in der vorliegenden Arbeit kurz nach dem Absetzen beobachtet wurde, spielt dabei vermutlich ebenfalls eine entscheidende Rolle. In diversen Studien mit unter Allergien leidenden Patienten konnte ebenfalls eine gestörte intestinale Barriere nachgewiesen werden (Heyman, 2005; Ventura *et al.*, 2006). Dabei wird davon ausgegangen, dass es durch die gestörte Barriere ebenfalls zu einer vermehrten Passage der Futtermittelantigene

aus dem Darmlumen kommt, was wiederum zu verstärkten Immunreaktionen führt (Groschwitz und Hogan, 2009).

Hinzu kommen weitere immunologische Veränderungen während der Phase des Absetzens, die auch in dieser Studie beobachtet werden konnten. Diese werden in Kapitel 5.2.3 weiter diskutiert.

5.2.3 Mukosale Immunantwort

Die Darmschleimhaut fungiert, nach dem Magen, als eine der ersten wichtigen Barrieren gegenüber Infektionen. Einen wichtigen Teil der gastrointestinalen Immunantwort bewerkstelligen dabei die Enterozyten (EC) der Darmwand und die sich darunter befindenden intraepithelialen Lymphozyten (IEL). Sie bilden eine erste Abwehrfunktion gegen das Eindringen pathogener Mikroorganismen und dienen der Erkennung nutritiver Antigene (Stokes *et al.*, 1994). Eine Überwachung der epithelialen Immunantwort erfolgt durch die Interaktion angeborener und erworbener Immunmechanismen (siehe 2.1). In früheren Studien konnte bereits ein immunmodulierender Effekt verschiedener Probiotika, darunter auch *B. toyonensis*, verdeutlicht werden (Braat *et al.*, 2004; Scharek *et al.*, 2007; Schierack *et al.*, 2007).

In der vorliegenden Studie wurde dabei die Wirkung des Probiotikums auf das Vorkommen verschiedener IEL Populationen im Darmepithel und sein Einfluss auf die Expression von Stressfaktoren und Cytokinen der angeborenen Immunantwort untersucht.

5.2.3.1 Verteilung der intraepithelialen Lymphozyten im Darmepithel

Um Veränderungen in der Immunantwort festzustellen, wurden durchflusszytometrische Phänotypisierungen durchgeführt und der Anteil verschiedener IEL Populationen innerhalb eines Abschnitts des Darmepithels bestimmt.

Kurz nach dem Absetzen zeigte die Probiotikagruppe dabei eine geringere prozentuale Häufigkeit der Gesamt-Leukozyten (CD45+), was zunächst auf eine generell reduzierte Immunreaktion hindeutet. Den größten Einfluss auf diesen Unterschied scheinen dabei die, zu diesem Zeitpunkt deutlich seltener vorkommenden, T-Zellen zu haben. Die CD3+ Zellen, also die Zellen, die das CD3 Epitop und damit den Pan-T-Zell-Marker tragen, sind an Tag 32 in der Probiotikagruppe um mehr als die Hälfte reduziert ($p \leq 0,05$). Insbesondere die zytotoxischen T-Zellen (CD8 β +) scheinen durch das Probiotikum stark beeinflusst zu sein. Dies steht im Widerspruch zu Ergebnissen früherer Studien, in denen *B. toyonensis* ein immunstimulierender Effekt, insbesondere in Bezug auf die Häufigkeit zytotoxischer T-Zellen, gezeigt werden konnte (Scharek *et al.*, 2007).

Es konnte kein Einfluss des Probiotikums auf die Häufigkeit der IELs der natürlichen Immunantwort belegt werden. Zu keinem der untersuchten Zeitpunkte konnten Gruppenunterschiede in der Zellzahl der CD16+/CD8 β -, CD2+/CD5- und CD11R1+ Zellen beobachtet werden. Im Vergleich zur Kontrollgruppe konnte hier jedoch, im Verhältnis zu den zytotoxischen CD8 β + T-Zellen, deutlich mehr Zellen der angeborenen Immunabwehr, insbesondere NK-Zellen, nachgewiesen werden. Dieses verschobene Verhältnis der nicht-spezifischen Immunzellen zu den zytotoxischen T-Zellen ist besonders zum Messzeitpunkt kurz nach dem Absetzen besonders deutlich. Zu den späteren Zeitpunkten gleicht sich dieses Verhältnis in beiden Gruppen immer mehr an. Diese Beobachtung könnte ebenfalls im Zusammenhang mit der, in der Probiotikagruppe verdeutlichten, gestörten intestinalen Barriere stehen. Je näher sich die Zellzahlen der NK-Zellen und der T-Zellen kommen, desto mehr scheint sich auch die HRP-Durchlässigkeit zu regulieren. Auch in der Kontrollgruppe konnten kurz nach dem Absetzen deutlich weniger zytotoxische T-Zellen als NK-Zellen gemessen werden, jedoch war der Unterschied hier deutlich geringer und die Angleichung der Zellzahl dieser beiden Zellpopulationen fand deutlich schneller statt. Dies deutet darauf hin, dass genau dieses Verhältnis von angeborener und adaptiver Immunabwehr entscheidend ist bei der Entwicklung der Darmschranke.

Bei der Betrachtung der Entwicklung der IELs, gemeinsam mit der intestinalen Integrität, wird dieser Zusammenhang in der Probiotikagruppe besonders gut deutlich (Abbildung 11). Je größer der Anteil an Gesamt-Leukozyten, desto geringer ist die Durchlässigkeit für HRP. Ob die starke Präsenz der Zellen der natürlichen Immunantwort mit den im Verhältnis deutlich geringer vorkommenden spezifischen Immunzellen kurz nach dem Absetzen der Grund für die beeinträchtigte intestinale Barriere zu diesem Zeitpunkt ist oder umgekehrt, lässt sich anhand der vorliegenden Daten nicht abschließend beurteilen. Es konnte jedoch beobachtet werden, dass eine vermehrte Antikörperbildung, durch die Passage von Sojaantigenen aus dem Futter, erst zu späteren Zeitpunkten stattfand. Dies deutet darauf hin, dass die gestörte Darmschranke in diesem Zusammenhang, aufgrund einer erhöhten Durchlässigkeit für Futtermittelantigene, die Grundlage für potentielle Futtermittelallergien sein könnte.

Mithilfe der Messung der IEL Häufigkeit zu verschiedenen Zeitpunkten war es möglich, den Einfluss des Absetzens und des damit verbundenen Stresses auf die intestinale Immunantwort zu untersuchen. Die Entwicklung der Gesamt-Leukozyten während dieser Phase unterschied sich dabei deutlich zwischen den beiden Gruppen. Der Anteil der CD45+ Zellen in der Probiotikagruppe war zunächst sehr niedrig und nahm bis zum letzten gemessenen Zeitpunkt, elf Tage nach dem Absetzen, deutlich zu. In der Kontrollgruppe

verhielt es sich jedoch umgekehrt. Hier war der Anteil der Gesamt-Leukozyten kurz nach dem Absetzen am größten. Frühere Studien zeigten bereits einen verstärkenden Einfluss des Absetzstresses auf die intestinale Immunantwort (Vega-Lopez *et al.*, 1995; McCracken *et al.*, 1999; Solano-Aguilar *et al.*, 2001; King *et al.*, 2003; Scharek *et al.*, 2007). Dies konnte auch in der vorliegenden Studie beobachtet werden. In der Kontrollgruppe zeigte sich im Messzeitraum ein stetiger Abfall der Lymphozytenhäufigkeiten, je weiter der Absetzzeitpunkt zurückliegt. Dies konnte tendenziell in allen untersuchten Lymphozytenpopulationen beobachtet werden. Lediglich die $\gamma\delta$ positiven Zellen zeigten keinen Einfluss des Absetzstresses auf ihre Zellzahl. Diese Zellpopulation trägt nicht, wie die meisten anderen T-Zellen, einen $\alpha\beta$ T-Zell-Rezeptor (TCR), sondern einen, der sich aus einer γ und einer δ Untereinheit zusammensetzt. Sie werden häufig als Brücke zwischen der angeborenen und adaptiven Immunantwort bezeichnet (Holtmeier und Kabelitz, 2005). In der mit *B. toyonensis* gefütterten Gruppe konnte hier ebenfalls kein Einfluss des Absetzstresses festgestellt werden. Auch gruppenunabhängig gab es keine deutlichen Unterschiede in der Zellzahl dieser IEL Population. Die bis heute nicht genaue Zuordnung der $\gamma\delta$ T-Zellen zu der angeborenen, bzw. adaptiven Immunantwort, ist dabei eine mögliche Erklärung des geringeren Einflusses des Absetzstresses auf die Häufigkeit dieser IEL Fraktion.

Insgesamt schienen die Zellen der angeborenen Immunantwort, CD8 α +, CD2+/CD5-, CD16+ und CD11R1, deutlich stärker vom Absetzstress betroffen zu sein. Die zeitliche Entwicklung der Zellzahl war bei diesen Zellpopulationen in beiden Gruppen am deutlichsten und größtenteils signifikant, was auf eine verstärkte nicht-spezifische Immunreaktion während des Absetzens hindeutet.

Ausgeprägte Gruppenunterschiede konnten jedoch auch in der zeitlichen Entwicklung der Zellzahl der T-Zellen beobachtet werden. Anders als in der Kontrollgruppe zeigten die mit *B. toyonensis* gefütterten Tiere kurz nach dem Absetzen einen deutlich geringeren Anteil an T-Zellen als zu später gemessenen Zeitpunkten. Die in der Probiotikagruppe an Tag 39 gemessenen Zellzahlen sind dabei immer noch deutlich niedriger, als die der Kontrollgruppe kurze Zeit nach dem Absetzen. Insgesamt erhöhten sich diese Zellzahlen jedoch, je weiter der Absetzzeitpunkt zurücklag. Diese Entwicklung deutet auf eine verzögerte Entwicklung der T-Zellen, als Teil der spezifischen Immunabwehr, durch den Einsatz des Probiotikums hin. Eine mögliche Erklärung wäre hierbei ein Einfluss des Probiotikums auf die Milch-Zusammensetzung der ebenfalls mit *B. toyonensis* supplementierten Sauen. Dies könnte wiederum zu einer veränderten Darmentwicklung nach dem Absetzen führen. Innerhalb dieser Studie fanden jedoch keine Untersuchungen

der Sauenmilch statt. Weitere Untersuchungen der Milch-Zusammensetzung wären daher eine sinnvolle Ergänzung zu den vorliegenden Daten.

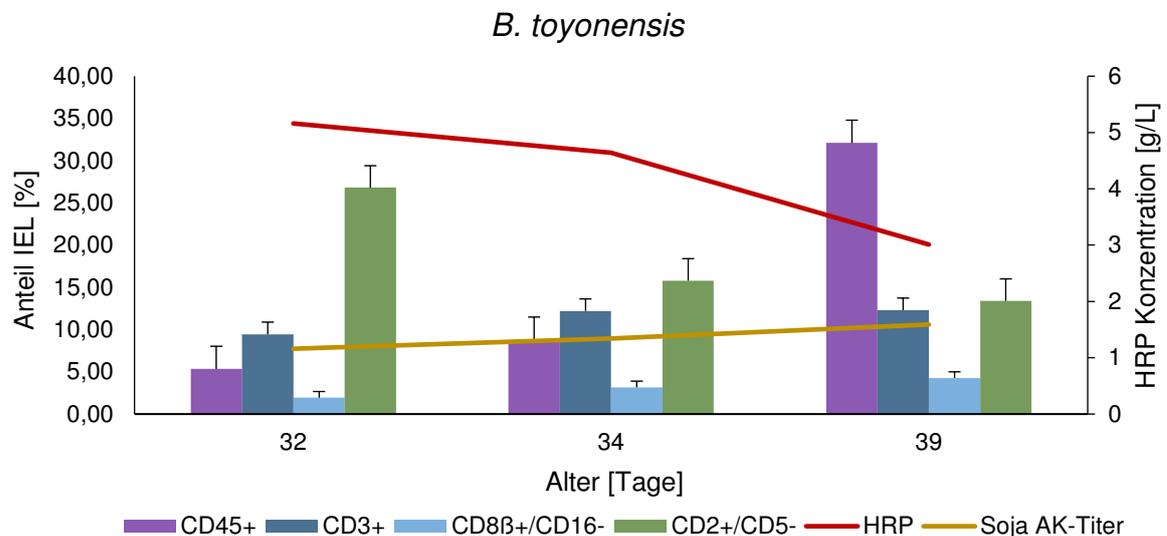


Abbildung 11: Zeitlicher Zusammenhang der intestinalen Barriere und der Häufigkeit verschiedener IELs innerhalb des jejunalen Epithels in der mit *B. toyonensis* supplementierten Gruppe

5.2.3.2 Der NKG2D Rezeptor und seine Liganden MIC2 und ULBP

Um der modulierten Immunreaktion in der Versuchsgruppe auf den Grund zu gehen, wurde zunächst die Expression von Stressfaktoren untersucht. Eine erhöhte Expression dieser Faktoren steht oft im Zusammenhang mit einer verstärkten Immunreaktion, da diese vor allem in gestresstem Gewebe vorkommen (López-Larrea *et al.*, 2008). Für die beiden in dieser Studie untersuchten NKG2D-Liganden MIC2 und ULBP konnte jedoch kein signifikanter Einfluss des Probiotikums auf die Genexpression dieser Moleküle nachgewiesen werden. Die Enterozyten scheinen in ihrer Funktion der Stresssignalisierung durch das Probiotikum nicht beeinträchtigt zu sein. Damit scheinen die untersuchten Stressfaktoren zunächst nicht direkt für die veränderte Immunreaktion in der Probiotikagruppe verantwortlich zu sein und somit auch nicht für die Ausbildung ihrer gestörten intestinalen Barriere.

Analysen innerhalb der Probiotikagruppe zeigten eine negative Korrelation zwischen der Expression von ULBP und der Häufigkeit der Gesamt-Leukozyten, insbesondere der CD3+ T-Zellen. In der Probiotikagruppe war die Expression beider Stressfaktoren vor dem Absetzen, im Vergleich zu Tag 39, deutlich erhöht, wohingegen die Lymphozytenhäufigkeit kurz nach dem Absetzen in dieser Gruppe niedriger war. In der Kontrollgruppe hingegen

zeigte vor allem ULBP eine deutliche, positive Korrelation mit der Häufigkeit der CD3+ T-Zellen. Diese Daten könnten ein weiterer Hinweis auf eine verzögerte Lymphozytenentwicklung der mit *B. toyonensis* gefütterten Tiere sein.

Zudem konnte in dieser Arbeit in beiden Gruppen keine signifikante Korrelation in der Expression der Stressfaktoren mit der Häufigkeit der NK-Zellen nachgewiesen werden. Ebenso zeigte sich in keiner der beiden untersuchten Gruppen ein Zusammenhang der Expression von Stressfaktoren mit der des NK-Zellrezeptors NKG2D. Beide untersuchten Stressfaktoren sind bekannte Liganden des NKG2D Rezeptors (Chardon *et al.*, 2000; López-Larrea *et al.*, 2008). Somit wäre zunächst eine Korrelation in ihrer Expression zu erwarten. *In-vivo* Untersuchungen mit transgenen Mäusen haben jedoch nachgewiesen, dass eine andauernde Expression von NKG2D Liganden zu einer deutlichen Herunterregulierung der Rezeptorexpression in NK-Zellen und zytotoxischen T-Zellen führen kann (Oppenheim *et al.*, 2005).

NKG2D und seine Liganden werden in gesundem Gewebe nur gering exprimiert. Die Stressmoleküle werden durch zellulären Stress induziert und ihre Expression ist in Tumoren und infizierten Zellen deutlich hochreguliert (López-Larrea *et al.*, 2008). Vor allem an Tag 32 ist der NKG2D Rezeptor in der Kontrollgruppe deutlich stärker exprimiert als in der Probiotikagruppe. Dies deutet auf ein erhöhtes Stresslevel im intestinalen Gewebe der Kontrollgruppe während der Phase des Absetzens hin. Aufgrund der vergleichbaren Expression der Stressfaktoren in beiden Gruppen, konnte dies jedoch nicht bestätigt werden. Allerdings ist zum gleichen Zeitpunkt, kurz nach dem Absetzen, in der Kontrollgruppe ebenso das Vorkommen der Lymphozyten, insbesondere der zytotoxischen T-Zellen, deutlich erhöht. Und auch in der Probiotikagruppe geht die zeitlich ansteigende Expressionsrate des Rezeptors mit der, in dieser Arbeit vermuteten, verspäteten Entwicklung der adaptiven Immunantwort, insbesondere der T-Zellen, einher. Im Menschen wurde der Rezeptor sowohl auf NK-Zellen, als auch $\gamma\delta$ - und zytotoxischen T-Zellen nachgewiesen (López-Larrea *et al.*, 2008). Eine Expression von NKG2D auf den Lymphozyten des porcinen Darmgewebes konnte bisher nicht nachgewiesen werden. Die hier beobachtete Korrelation deutet jedoch darauf hin, dass auch die intestinalen zytotoxischen T-Zellen des Schweines zur Expression des Rezeptors und somit zur Erkennung von zellulärem Stress in der Lage sind.

5.2.3.3 Cytokine

Ein weiterer, wichtiger Bestandteil der, mit Leukozyten in Zusammenhang stehenden, Immunreaktion sind die Cytokine (Akdis *et al.*, 2011). In Anbetracht des, in dieser Arbeit untersuchten, *B. toyonensis* waren dabei vor allem die pro- und anti-inflammatorischen Cytokine, insbesondere entsprechend agierende Interleukine (ILs), interessant. Frühere Studien zeigten, dass verschiedene Probiotika die Expression von pro- und anti-inflammatorischen Cytokinen stammabhängig unterschiedlich beeinflussen können (Delcenserie *et al.*, 2008). So erhöhte *Lactobacillus johnsonii* z. B. die Expression des anti-inflammatorischen Cytokins TGF- β *in-vitro*, wohingegen *Lactobacillus sakei* stimulierend auf die Expression der pro-inflammatorischen Cytokine IL-1 β , IL-8 und TNF α wirkte (Haller *et al.*, 2000). Auch in der hier durchgeführten Studie ließ sich ein deutlicher Einfluss des probiotischen *B. toyonensis* auf die Genexpression des pro-inflammatorischen Cytokins IL-1 β beobachten. Dieser Unterschied war vor allem vor dem Absetzen, sowie an Tag 34, also ca. eine Woche nach dem Absetzen, am deutlichsten ($p \leq 0,05$). In früheren Studien konnte ein Zusammenhang zwischen dem Absetzstress und der Expression pro-inflammatorischer Cytokine wie IL-1 β , IL-8 und IFN- γ festgestellt werden (O'Loughlin *et al.*, 2011). Pié *et al.* (2004) dokumentierten bei Ferkeln eine deutliche Hochregulierung der pro-inflammatorischen Cytokine innerhalb der ersten Woche des Absetzens. Eine derartige Entwicklung ließ sich in der Kontrollgruppe jedoch nicht beobachten. Es konnte kein stimulierender Einfluss des Absetzens auf die Expression der pro- oder anti-inflammatorischen Cytokine festgestellt werden. Die Expression des pro-inflammatorischen IL-8 erhöhte sich sogar elf Tage nach dem Absetzen. Dies deutet darauf hin, dass das Stresslevel der mit *B. toyonensis* gefütterten Tiere, im Vergleich zur Kontrollgruppe, ohnehin deutlich erhöht war, da die IL-1 β Expression hier bereits vor dem Absetzen deutlich hochreguliert war. Interessant ist hierbei jedoch der Abfall der IL-1 β Expression an Tag 32. Dieses Ergebnis geht mit einer reduzierten Expression der Stressfaktoren ULBP und MIC2 zu genau diesem Zeitpunkt einher. Auch die Zellzahl der Gesamt-Leukozyten, insbesondere der zytotoxischen T-Zellen, ist an Tag 32, im Vergleich zu späteren Zeitpunkten, noch sehr niedrig. Verschiedene Studien deuten auf einen stimulierenden Einfluss pro-inflammatorischer Cytokine auf die Expression des Apoptose assoziierten Proteins Fas (Kondo *et al.*, 2009) und Stressfaktoren wie ULBP (Song *et al.*, 2008) hin. Dabei zeigte der Einsatz von IL-1 β in menschlichen Krebszellen eine erhöhte zytotoxische Aktivität der NK-Zellen und eine verstärkte Proliferation von *extracellular-signal-regulated* Kinasen (ERKs). Diese Kinasen sind essentiell für die zytotoxische bzw. apoptotische Aktivität der Zellen. Somit scheint die niedrige Expressionsrate von IL-1 β an Tag 32, gemeinsam mit der ebenfalls deutlich reduzierten Expression der beiden

gemessenen Stressfaktoren, in Zusammenhang mit einer reduzierten Anzahl zytotoxisch wirkender Immunzellen zu stehen. Um diesen Zusammenhang genauer zu untersuchen, wäre es interessant den genauen zeitlichen Verlauf aller dieser Faktoren, während der Phase des Absetzens, zu beobachten und tägliche Veränderungen zu korrelieren.

Eine vermehrte Produktion pro-inflammatorischer Cytokine zeigte zudem einen negativen Einfluss auf die Integrität der intestinalen Barriere (McKay und Baird, 1999). Bei der Betrachtung der Ergebnisse zur HRP-Durchlässigkeit der Darmschranke in der vorliegenden Arbeit ist dieser Zusammenhang ebenfalls zu erkennen. Dies scheint jedoch nur bei den, vermutlich stärker vom Absetzstress betroffenen, Tieren der Versuchsgruppe deutlich ausgeprägt zu sein. Während die HRP-Durchlässigkeit in der Versuchsgruppe besonders an Tag 39, im Vergleich zu den Zeitpunkten kurz nach dem Absetzen, deutlich geringer ist, ist auch die IL-1 β Expression zu genau diesem Zeitpunkt signifikant reduziert. Ein numerisch ähnlicher Effekt konnte für das ebenfalls pro-inflammatorische Cytokin IL-8 beobachtet werden. Eine antagonistische Entwicklung im Expressionsverhalten des anti-inflammatorisch wirkenden IL-10 konnte in dieser Arbeit nicht beobachtet werden. Zudem konnte kein abgesicherter Einfluss des Probiotikums auf die IL-10 Expression festgestellt werden. Dies lässt darauf schließen, dass die Regulierung der intestinalen Barriere innerhalb der Probiotikagruppe auf einem anderen Weg funktioniert. Aufgrund der großen Bandbreite anti-inflammatorischer Cytokine, ist der klassische, hemmende Einfluss auf die Expression der pro-inflammatorischen Cytokine jedoch nicht auszuschließen.

5.2.4 Morphologische Veränderungen unter dem Einfluss von *B. toyonensis*

Eine Verkürzung der Zotten, auch Villusatrophie genannt, ist ein häufig mit dem Stress des Absetzens assoziiertes Phänomen (Cera *et al.*, 1988; van Beers-Schreurs *et al.*, 1998). Auch in der hier durchgeführten Studie konnte, wie erwartet, in beiden Gruppen, kurze Zeit nach dem Absetzen, eine drastische Verkürzung der Zotten beobachtet werden. Insgesamt konnten in der *B. toyonensis* Gruppe sowohl vor als auch kurze Zeit nach dem Absetzen, signifikant längere Zotten gemessen werden, als in der Kontrollgruppe. Diese Entwicklung wurde bereits in früheren Studien mit abgesetzten Ferkeln beobachtet (Görke, 2000). Der dieser Veränderung zugrunde liegende Mechanismus konnte bisher jedoch nicht geklärt werden.

Bei der Betrachtung der Kryptentiefe beider Gruppen ist kein signifikanter Unterschied zu erkennen. Beide Gruppen weisen kurz nach dem Absetzen jedoch deutlich verkürzte Krypten auf, welche sich zum sechsten Tag nach dem Absetzen zu normalisieren scheinen.

Diese Normalisierung, bzw. Vertiefung der Krypten, drei bis sechs Tage nach dem Absetzen, ist eine bekannte Begleiterscheinung der Villusatrophie und wird als Kryptenhyperplasie bezeichnet (Tang et al., 1999; Spreeuwenberg et al., 2001; David et al., 2002; Boudry et al., 2004; Montagne et al., 2007). Dabei wird davon ausgegangen, dass die Vertiefung der Krypten durch eine erhöhte Zellproliferation entsteht und durch die Neubildung von Enterozyten der regenerativen Verlängerung der Zotten dienen soll (Hedemann et al., 2003; Miller und Slade, 2003; Zabielski et al., 2008). Diese erhöhte Neubildung von Enterozyten könnte somit eine Erklärung für die verlängerten Zotten der Probiotikagruppe sein. Numerisch betrachtet, sind die Krypten der mit *B. toyonensis* gefütterten Tiere vor und kurz nach dem Absetzen tiefer als die der Kontrollgruppe. Zudem könnte eine akute Vermehrung der Enterozyten in den Zotten bedeuten, dass sich das Verhältnis von Enterozyten zu den dazwischen liegenden IELs verschiebt. Die verlängerten Zotten der Probiotikagruppe gehen zeitgleich mit einer reduzierten Häufigkeit der Gesamt-Leukozyten einher. Immunhistologische Färbungen der CD3+ Lymphozyten ergaben dabei eine fast unveränderte Anzahl dieser Zellen pro Zotte (Tabelle 35). Die an Tag 39, im Vergleich zu früheren Messpunkten und auch im Vergleich zur Kontrolle, deutlich verkürzten Zotten, gehen dabei mit einer erhöhten Häufigkeit der Gesamt-Leukozyten innerhalb der Enterozyten einher.

Oft in Zusammenhang mit Villusatrophien stehen reduzierte Futteraufnahmen und damit verbunden, vorübergehende Unterversorgungen der Ferkel, sowie Durchfallerkrankungen, aufgrund einer verschlechterten Nährstoffaufnahme (Hampson, 1986; Stokes *et al.*, 1987; Gaskins und Kelley, 1995; Pluske *et al.*, 1997; van Beers-Schreurs *et al.*, 1998; Lallès *et al.*, 2004). Die längeren Zotten der Probiotikagruppe und die dadurch vergrößerte Oberfläche, könnten dabei die Nährstoffaufnahme und die Leistung der Tiere verbessern. Es konnten jedoch in dieser Arbeit keine messbaren Unterschiede im Gesundheitszustand oder der Lebendmasseentwicklung der beiden Gruppen festgestellt werden. Die Analyse der Futteraufnahme war kein Bestandteil dieser Arbeit, eine verbesserte Futtermittelnutzung der mit *B. toyonensis* gefütterten Tiere auf dieser Grundlage wäre jedoch denkbar.

5.3 Versuchsteil II: Die Expression des Natürlichen Killerzellen Rezeptors NKG2D auf verschiedenen intraepithelialen Lymphozytenpopulationen und seine mögliche Verbindung zum adaptiven Immunsystem

Wie bereits im vorherigen Abschnitt (siehe Kapitel 5.2) diskutiert, bilden die Enterozyten und intraepithelialen Lymphozyten (IELs) des gastrointestinalen Immunsystems nach der Passage des Magens die erste Hürde, die ein pathogener Mikroorganismus überwinden muss (Stokes *et al.*, 1994). Um in Stresssituationen eine schnelle Immunreaktion auslösen zu können, müssen die Zellen dieser ersten Hürde miteinander kommunizieren. Die Enterozyten stehen dabei in engem Kontakt mit diversen IEL, sowohl der angeborenen als auch der adaptiven Immunantwort, wie u. a. den natürlichen Killerzellen, sowie diversen T-Zell Populationen (Zufferey *et al.*, 2009).

In diesem Kapitel soll nun die Fähigkeit verschiedener, isolierter IEL Populationen dahingehend diskutiert werden, ob sie zu einer Kommunikation mit den Enterozyten und damit dem Einleiten einer prompten Immunreaktion über die NKG2D Signalkaskade im Stande sind und welcher Umstände es bedarf, diese Signalkaskade auszulösen.

5.3.1 Expressionsverhalten des NKG2D Zellrezeptors auf verschiedenen IEL Populationen

Die Daten der in dieser Arbeit durchgeführten durchflusszytometrischen Messungen und nachfolgenden Korrelationsanalysen (siehe Tabelle 32 und Tabelle 33) des ersten Versuchsteils lieferten bereits erste Hinweise auf das Potential verschiedener IEL Populationen, den NKG2D Rezeptor zu exprimieren und auf diesem Wege eventuell mit den umliegenden Enterozyten zu kommunizieren. Eine Expression des porcinen NKG2D konnte bis dato nur in NK-Zellen des Blutes beobachtet werden (Denyer *et al.*, 2006). Auf den Zellen des intestinalen Gewebes konnte eine NKG2D Expression beim Schwein bisher nicht nachgewiesen werden.

Genexpressionsanalysen des Rezeptors auf verschiedenen isolierten IEL Populationen bestätigten jedoch unsere Hypothese, dass auch die Zellen des porcinen intestinalen Gewebes zum Teil zur Expression von NKG2D in der Lage sind. Studien beim Menschen zeigten dieses Potential bereits für NK-Zellen (Ogasawara und Lanier, 2005) und einige weitere sowohl zirkulierende Zellen als auch für die des humanen Darmgewebes, wie u. a. $\gamma\delta$ T-Zellen und CD8+ T-Zellen (Bauer *et al.*, 1999; Roberts *et al.*, 2001; Slavuljica *et al.*, 2011). In der vorliegenden Arbeit konnte eine starke NKG2D Expression auf den $\gamma\delta$ T-Zellen nachgewiesen werden. $\gamma\delta$ T-Zellen tragen, im Gegensatz zu den $\alpha\beta$ T-Zellen,

den namensgebenden T-Zell-Rezeptor (TCR), der sich aus einer γ und einer δ Untereinheit zusammensetzt. Diese machen im proximalen Dünndarm bei Mäusen ca. 70 % der gesamten IELs aus (Tamura *et al.*, 2003).

Die genauen Funktionen der $\gamma\delta$ T-Zellen sind bis heute nicht vollständig geklärt. Sie unterscheiden sich in vielerlei Hinsicht von den $\alpha\beta$ T-Zellen. So trägt u. a. ein Großteil der $\alpha\beta$ T-Zellen das CD4 Epitop, während in der Maus nur eine sehr kleine Fraktion der $\gamma\delta$ T-Zellen diesen Phänotyp aufweist (Mizoguchi *et al.*, 2003). Zudem können intraepitheliale $\gamma\delta$ T-Zellen der Maus nur einmal aktiviert werden. Sie wandern ins intestinale Epithelium und verbleiben dort (Ogata *et al.*, 2014). Sobald sie aktiviert werden, setzen sie Granzyme (GbR) frei. GbR gelangen in der Regel durch Poren in infizierte, bzw. gestresste Zellen und leiten, durch die Aktivierung der sich im Zytoplasma befindenden Caspasen, die Apoptose dieser Zellen ein. Die Bildung der Poren in der Zellwand der Zielzelle wird dabei durch die Ausschüttung von Perforin (Pfn) durch die T-Zelle eingeleitet (Vollmar *et al.*, 2013). Im Gegensatz zu den meisten zytotoxischen $\alpha\beta$ T-Zellen, schütten $\gamma\delta$ T-Zellen der Maus jedoch kein Pfn aus (Ogata und Itoh, 2016). Trotzdem führt die Pfn-unabhängige GrB-Freisetzung der aktivierten $\gamma\delta$ T-Zellen zur sofortigen DNA Fragmentation und Zerstörung der umgebenden Epithelzellen sowie der $\gamma\delta$ T-Zellen selbst (Ogata und Itoh, 2016). Welche Antikörper die $\gamma\delta$ T-Zellen genau erkennen, ist noch immer unbekannt. Zahlreiche Studien mit humanen Blutzellen deuten jedoch darauf hin, dass diese Zellen, im Gegensatz zu den $\alpha\beta$ T-Zellen, nicht von der Erkennung von klassischen MHC-Proteinkomplexen abhängen (Porcelli *et al.*, 1991; Holoshitz *et al.*, 1993; Schild *et al.*, 1994; Weintraub *et al.*, 1994; Morita *et al.*, 2000).

Die Liganden des NKG2D Rezeptors zählen jedoch zur MHC-Klasse-I-Proteinkomplex-Familie (Bauer *et al.*, 1999; Cosman *et al.*, 2001; Sutherland *et al.*, 2002; Romero *et al.*, 2006). Die in dieser Arbeit beobachtete, starke Expression von NKG2D auf den $\gamma\delta$ T-Zellen lässt vermuten, dass die $\gamma\delta$ T-Zellen des porzinen intestinalen Epithels, im Gegensatz zu dem der Maus, stärker über diesen Weg der Signaltransduktion agieren. Auch die aus Blut isolierten $\gamma\delta$ T-Zellen wurden in früheren Studien als negativ für das porzine NKG2D beschrieben (Denyer *et al.*, 2006). Dies deutet weiterhin auf ein sich deutlich unterscheidendes Verhalten der Immunzellen im porzinen intestinalen Epithelium, zu denen des Blutes hin.

Zudem konnte die Expression von NKG2D in der vorliegenden Studie einzig auf der CD5 positiven Fraktion der $\gamma\delta$ T-Zellen nachgewiesen werden. CD5 wird häufig als ein Marker für T-Zellen eingesetzt, da es von nahezu allen T-Zellen exprimiert wird (Lefrançois, 1991). Studien mit Mäusen zeigten jedoch, dass kaum, bis gar keine der intraepithelialen

$\gamma\delta$ T-Zellen das CD5 Epitop tragen (Lefrançois, 1991). In den, in dieser Arbeit durchgeführten durchflusszytometrischen Messungen der porzinen IELs, konnte jedoch ein deutlich häufigeres Vorkommen der CD5 positiven, als dem der CD5 negativen $\gamma\delta$ T-Zellen beobachtet werden. Dies deutet zunächst auf eine sich unterscheidende Funktion des CD5 Epitops bei Schwein und Maus hin. Frühere Studien mit immunsupprimierten Mäusen deuten darauf hin, dass CD5 positive $\gamma\delta$ T-Zellen sich negativ auf die Differenzierung CD4 positiver $\gamma\delta$ T-Zellen im Darm auswirken (Chan *et al.*, 1999; Mizoguchi *et al.*, 2003). Tatsächlich ist die Anzahl der intestinalen CD4 positiven $\gamma\delta$ T-Zellen sehr gering, erhöht sich jedoch in der Abwesenheit von CD5 immens (Hayday und Geng, 1997; Hayday, 2000; Mizoguchi *et al.*, 2003). CD4 positive $\gamma\delta$ T-Zellen haben dabei eine vergleichbare Funktion wie die CD4 positiven $\alpha\beta$ T-Zellen, indem sie u. a. dazu in der Lage sind, große Mengen an Cytokinen zu produzieren (Spits *et al.*, 1991). Untersuchungen mit immunsupprimierten Mäusen deuten zudem darauf hin, dass CD4 positive $\gamma\delta$ T-Zellen potentiell dazu in der Lage sind, chronische Darmentzündungen einzuleiten (Mizoguchi *et al.*, 2003). Ein erhöhtes Vorkommen der CD5 positiven $\gamma\delta$ T-Zellen könnte somit ein Hinweis auf eine immunstabilisierende Wirkung dieser Zellen im porzinen Darmepithel sein.

Des Weiteren zeigten die durchgeführten Rezeptor-Expressionsanalysen einen deutlichen Unterschied zwischen den T-Zellen, welche mittels dem CD3 Antikörper isoliert wurden, zu den T-Zellen, bei denen hierfür der CD5 Antikörper verwendet wurde. Dabei zeigte die mittels CD3 isolierte Fraktion eine mehr als zehnfach erhöhte NKG2D Expression, als die CD5 Fraktion, deren Expressionsrate unter der als aussagekräftig definierten 5 % Grenze lag. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung wäre eine erhöhte Expression des Rezeptors durch eine Aktivierung des TCR/CD3 Komplexes mittels des, zur Isolierung angewandten, anti-CD3 Antikörpers. Durchflusszytometrische Untersuchungen mit murinen IELs haben gezeigt, dass eine intraperitoneale Injektion von anti-CD3 zur Aktivierung des TCR/CD3 Komplexes in den anschließend isolierten IELs führt (Ogata *et al.*, 2014; Ogata und Itoh, 2016). Dieser Komplex ist dabei entscheidend bei der antigenspezifischen, zytotoxischen Aktivität der T-Zellen beteiligt (Groh *et al.*, 2001). Weiterführende Studien diesbezüglich werden in Kapitel 5.3.2 diskutiert.

Trotz der leichten bis mittleren Korrelation der NK Zellhäufigkeit mit der Expression des NKG2D Zellrezeptors konnte in dieser Arbeit keine Expression des Rezeptors auf den NK-Zellen des intestinalen Gewebes nachgewiesen werden. Frühere Studien mit menschlichen intestinalen NK-Zellen führten zu ähnlichen Ergebnissen (Rankin *et al.*, 2013). Die intraepithelialen NK-Zellen scheinen daher nicht zur Expression des Rezeptors in der Lage zu sein und scheinen im Gegensatz zu den zirkulierenden NK-Zellen

(Ogasawara und Lanier, 2005; Denyer *et al.*, 2006) somit auch nicht diesen Weg der Stress-induzierten Signaltransduktion zu nutzen.

Wie beim Menschen bereits gezeigt (Slavuljica *et al.*, 2011), konnte in der vorliegenden Arbeit auch auf den porzinen intraepithelialen CD8 zytotoxischen Zellen eine Expression des NKG2D Rezeptors nachgewiesen werden. Diese ist deutlich schwächer ausgeprägt als auf der Gesamtheit der CD3 positiven, bzw. $\gamma\delta$ T-Zellen. Die CD8 positiven Zellen scheinen jedoch trotzdem zur Kommunikation mit den umgebenden Enterozyten über den NKG2D Rezeptor in der Lage zu sein. Beim Menschen unterscheidet sich die Funktion des Rezeptors in Abhängigkeit vom Zelltyp. So fungiert NKG2D auf menschlichen NK-Zellen als aktivierender Rezeptor und kann die zytotoxische Aktivität der Zelle induzieren und zur Produktion verschiedener pro-inflammatorischer Cytokine wie IFN- γ und TNF- α beitragen (Slavuljica *et al.*, 2011). Auf CD8 Zellen fungiert NKG2D jedoch als co-stimulierender Rezeptor. Damit ist die alleinige Aktivierung des Rezeptors nicht ausreichend, um ein zytotoxisches Verhalten der Zellen auszulösen (Bauer *et al.*, 1999; Ehrlich *et al.*, 2005). Bei Untersuchungen mit CD8 Zellen aus der Maus zeigte sich, dass die Aktivierung des TCR in diesen Zellen zu einer Hochregulierung von NKG2D führt. In ruhenden murinen CD8 Zellen wird der Rezeptor jedoch nicht exprimiert (Diefenbach *et al.*, 2000; Diefenbach *et al.*, 2002; Gilfillan *et al.*, 2002; Jamieson *et al.*, 2002; Ehrlich *et al.*, 2005).

Um ein ähnliches Verhalten der porzinen CD8 Zellen zu untersuchen, wurde die im Folgenden diskutierte TCR/CD3 Aktivierungsstudie (5.3.2) durchgeführt.

5.3.2 Aktivierung des TCR/CD3 Komplexes

Frühere Studien ergaben, dass der NK Zellrezeptor NKG2D beim Menschen in allen NK-Zellen und ruhenden CD8 positiven T-Zellen konstitutiv exprimiert wird (Bauer *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 2000; Rosen *et al.*, 2004). Bei Mäusen hingegen wird NKG2D nur in CD8 positiven T-Zellen exprimiert, wenn es zuvor zu einer Aktivierung des T-Zell-Rezeptors kam (Diefenbach *et al.*, 2000; Diefenbach *et al.*, 2002; Gilfillan *et al.*, 2002; Jamieson *et al.*, 2002; Ehrlich *et al.*, 2005). Zudem wird davon ausgegangen, dass eine NKG2D Expression die T-Zell-Profilierung durch den TCR/CD3 Komplex, einem Multiprotein-Membrankomplex, bestehend aus einem TCR Heterodimer und einem CD3 Molekül (Wegener *et al.*, 1995; Piriou-Guzylack und Salmon, 2008), anregt. Die Aktivierung beider Rezeptoren geht dabei mit einer erhöhten Ausschüttung von IL-2, einem T-Zell-Wachstumsfaktor, einher, wohingegen die alleinige Aktivierung des TCR/CD3 Komplexes eine Zellapoptose begünstigt (Groh *et al.*, 2001; Vollmar *et al.*, 2013).

Die in dieser Arbeit dokumentierte, starke NKG2D Expression auf den mittels dem anti-CD3 Antikörper isolierten intraepithelialen T-Zellen, insbesondere im Vergleich zu den mittels anti-CD5 isolierten Zellen (Abbildung 10), ließen diesbezüglich bereits Ähnlichkeiten zwischen dem murinen und dem porzinen Immunsystem vermuten (siehe auch 5.3.1). Die Inkubation isolierter IELs mit einem anti-CD3 Antikörper zeigte anschließend einen deutlichen Einfluss auf die NKG2D Expression in den intraepithelialen zytotoxischen CD8 β T-Zellen. Im Unterschied zum Mausmodell konnte in der vorliegenden Studie zwar bereits vor der Inkubation mit anti-CD3 eine leichte NKG2D Expression auf den CD8 β Zellen beobachtet werden, diese war jedoch nach dem Kontakt mit dem Antikörper deutlich erhöht. Somit scheint eine Aktivierung des TCR/CD3 Komplexes auch in den porzinen CD8 β IELs stattzufinden. Die NKG2D Expression der intraepithelialen $\gamma\delta$ T-Zellen schien hingegen unbeeinflusst von der anti-CD3 Inkubation zu sein. Neue Untersuchungen deuten darauf hin, dass der TCR/CD3 Komplex auf den intraepithelialen $\gamma\delta$ T-Zellen der Maus durchaus durch eine Stimulation mit anti-CD3 aktiviert wird (Ogata *et al.*, 2014; Ogata und Itoh, 2016). Da die NKG2D Expression auf den porzinen $\gamma\delta$ T-Zellen der vorliegenden Arbeit jedoch auch vor der Inkubation schon stark ausgeprägt war, scheint eine Aktivierung des TCR/CD3 Komplexes für die NKG2D Signalkaskade auf diesen Zellen vermutlich nicht zwingend notwendig zu sein. Dieses sich, je nach Zelltyp, unterscheidende Expressionsverhalten des Rezeptors, weist dabei deutliche Ähnlichkeiten zu den menschlichen IELs auf. Die in dieser Studie gewonnenen Daten lassen vermuten, dass NKG2D auf den porzinen $\gamma\delta$ IELs als aktivierender Rezeptor, auf den CD8 β IELs jedoch, wie beim Menschen auch, als co-stimulierender Rezeptor fungiert (Bauer *et al.*, 1999; Ehrlich *et al.*, 2005; Slavuljica *et al.*, 2011). Um diese Vermutung weiter zu stützen, wäre es für nachfolgende Experimente interessant, die Expression des T-Zell Wachstumsfaktors IL-2 in beiden inkubierten Zellfraktionen zu untersuchen. Dabei wäre eine erhöhte IL-2 Ausschüttung, auf Grundlage der dargelegten Hypothese, nur bei den CD8 β IELs zu erwarten.

Rein numerisch zeigte sich ein ähnliches Expressionsverhalten des Rezeptors in den isolierten und mit anti-CD3 inkubierten mononukleären CD8 β und $\gamma\delta$ T-Zellen des Blutes (PBMCs). Auch hier ist die NKG2D Expression der CD8 β T-Zellen nach dem Kontakt, und der damit vermuteten TCR/CD3 Aktivierung, hochreguliert, auf den $\gamma\delta$ T-Zellen jedoch unverändert, bzw. sogar etwas herunterreguliert. Dieses Ergebnis konnte für die PBMCs statistisch zwar nicht belegt werden, deutet jedoch auf eine ähnliche Funktion dieser spezifischen Signalkaskade im epithelialen Gewebe und im Blut hin.

Innerhalb der aus PBMCs isolierten CD8 β T-Zellfraktion konnte im Anschluss an die anti-CD3 Inkubation außerdem eine erhöhte Expression des NKG2D Liganden MIC2 gezeigt werden. Ein ähnliches, jedoch statistisch nicht abgesichertes, Verhalten konnte für die CD8 β IELs beobachtet werden. Frühere Studien mit menschlichen PBMCs haben eine Expression von MICA, dem menschlichen Homologon von MIC2, auf T-Zellen nachgewiesen, die durch anti-CD3 aktiviert wurden (Molinero *et al.*, 2002). Dabei wurde postuliert, dass die von einer Aktivierung abhängige Expression des Stressmoleküls MICA beim Menschen Teil eines Mechanismus ist, der dazu dient, eine unkontrollierte Aktivierung der T-Zellen während einer akuten Immunreaktion zu regulieren und damit als eine Art Sensor für proliferierende Zellen fungiert (Molinero *et al.*, 2002). Ähnlich wie für die NKG2D Expression, konnte auch für die MIC2 Expression in dieser Studie kein Einfluss der anti-CD3 Inkubation auf den $\gamma\delta$ T-Zellen, weder aus Blut, noch aus Gewebe, gezeigt werden. Die von Molinero *et al.* (2002) postulierte Hypothese wäre somit auch für die porzinen IELs und PBMCs denkbar. Zusammengenommen weisen die in dieser Inkubationsstudie gewonnenen Daten darauf hin, dass eine Aktivierung des TCR/CD3 Rezeptorkomplexes beim Ferkel zu einer vermehrten Expression des NKG2D Rezeptors führt und zeitgleich zu einer vermehrten MIC2 Expression der CD8 β T-Zellen. Daraufhin ist wiederum mit einer verstärkten zytotoxischen Aktivität der Zelle zu rechnen. Dies untermauert zudem die zuvor beschriebene These, dass NKG2D auf den porzinen CD8 β T-Zellen nicht alleine, sondern nur in Abhängigkeit von TCR/CD3 als co-stimulierender Rezeptor in der zytotoxischen Signalkaskade agiert. Des Weiteren zeigen die vorliegenden Daten ein sich davon stark unterscheidendes Verhalten der $\gamma\delta$ T-Zellen. Da keiner der gemessenen Parameter durch die anti-CD3 Inkubation beeinflusst wurde, lässt dies vermuten, dass die Signaltransduktion in diesen Zellen, unabhängig von einer Aktivierung durch anti-CD3, funktioniert. Daraus lässt sich postulieren, dass die $\gamma\delta$ T-Zellen nicht vom TCR/CD3 Komplex abhängen und daher vermutlich auch ruhende T-Zellen den NKG2D Rezeptor exprimieren.

5.4 Schlussfolgerung und Ausblick

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen sollten einen genaueren Einblick in den Einfluss des probiotischen Bakteriums *Bacillus toyonensis* auf die intestinale Immunabwehr beim Ferkel liefern. Zunächst konnten durch den Einsatz des Probiotikums keine Veränderungen im Gesundheitszustand oder der Lebendmasse der Ferkel, innerhalb der ersten drei Lebenswochen, gezeigt werden. Trotz einer erhöhten HRP-Permeabilität des intestinalen Epithels der Probiotikagruppe, kurze Zeit nach dem Absetzen, ließ sich keine erhöhte Durchfallinzidenz beobachten. Etwa eine Woche nach dem Absetzen schien sich das Probiotikum stabilisierend auf die Darmschranke auszuwirken. Es konnte kein Einfluss des Probiotikums auf die Expression von Molekülen der MHC-Klasse-I-Proteinkomplex-Familie durch die Enterozyten beobachtet werden. Somit scheinen die in dieser Arbeit untersuchten Stressfaktoren MIC2 und ULBP nicht für die beeinträchtigte Darmschranke der Probiotikagruppe verantwortlich zu sein.

Die durch durchflusszytometrische Messungen erlangten Daten zur Verteilung der intraepithelialen Lymphozyten deuten auf eine verzögerte Entwicklung der adaptiven Immunabwehr, insbesondere der T-Zellen, durch den Einsatz von *B. toyonensis* hin.

Die in den histologischen Färbungen beobachteten längeren Zotten der Probiotikagruppe und die damit einhergehende vergrößerte Oberfläche, könnten ein Indiz für eine verbesserte Nährstoffaufnahme, unter dem Einfluss von *B. toyonensis*, sein. Zusätzliche Messungen bezüglich der Futtermittelverwertung und eine längerfristige Lebendmasse- und Leistungsentwicklung der Tiere wäre hierbei in weiterführenden Studien eine interessante Ergänzung. Auch die Durchführung eines *challenge* Versuches, wie es in früheren Studien häufig mit *Salmonella* Typhimurium durchgeführt wurde, könnte Aufschluss darüber geben, inwiefern die hier beobachteten morphologischen Veränderungen für die, in diversen Studien beschriebenen, leistungsfördernden Eigenschaften von *B. toyonensis* verantwortlich sind.

Im weiterführenden Teil der vorliegenden Studie wurde die Funktion des Natürlichen Killerzellen Rezeptors NKG2D näher untersucht. Dabei konnte zunächst nachgewiesen werden, dass die intraepithelialen $\gamma\delta$ T-Zellen des Schweins diesen Rezeptor exprimieren und damit, durch die Erkennung von Stressmolekülen der MHC-Klasse-I-Proteinkomplex-Familie, zur Kommunikation mit den sie umgebenden Enterozyten in der Lage sind. Zudem konnte kein Einfluss einer Aktivierung des TCR/CD3 Komplexes auf die NKG2D Expression der $\gamma\delta$ T-Zellen beobachtet werden, was auf eine konstitutive Expression des Rezeptors auf diesen Zellen hinweist. Im Unterschied dazu zeigte die TCR/CD3 Aktivierung einen deutlichen Effekt auf den CD8 β T-Zellen. Die NKG2D Expression war auf diesen Zellen

nach der Aktivierung deutlich erhöht. Dies deutet darauf hin, dass NKG2D auf porzinen intraepithelialen CD8 β T-Zellen, ähnlich wie beim Menschen auch, als co-stimulierender Rezeptor fungiert und von der simultanen Aktivität des TCR/CD3 Komplexes und der damit einhergehenden zytotoxischen Aktivität abhängt.

Somit zeigt der NKG2D Rezeptor durch die Erkennung von MHC-Klasse-I-Proteinkomplex-Familie sowohl Eigenschaften der angeborenen als auch, anhand der Abhängigkeit der durch Antikörper ausgelösten TCR Aktivität, der adaptiven Immunabwehr. Durch diese variierende Funktion des Rezeptors wäre beispielsweise eine Unterscheidung zwischen generellen Stresssituationen, wie u. a. dem Absetzstress, und dem Eindringen von Pathogenen möglich.

Zusammenfassend lässt sich anhand der vorliegenden Daten schließen, dass der NKG2D Rezeptor im porzinen Darmepithel, in Abhängigkeit des Zelltyps auf dem er exprimiert wird, als eine Art Brücke zwischen der angeborenen und der adaptiven Immunabwehr agiert.

6 Zusammenfassung

Einfluss des probiotischen Bakteriums *Bacillus toyonensis* (ToyoCerin®) auf die intestinale Immunantwort beim Ferkel während der Phase des Absetzens

Probiotische Futtermittelzusatzstoffe sind in der Tierernährung, insbesondere seit dem europaweiten Verbot von antibiotischen Leistungsförderern im Jahr 2006, von besonderem Interesse. Aufgrund ihrer gesundheits- und leistungsfördernden Eigenschaften werden sie inzwischen häufig in der Nutztierhaltung eingesetzt. Ein häufig postulierter Wirkmechanismus von Probiotika ist die Modulation der Immunantwort im Tier.

Im Rahmen dieser Studie wurden daher verschiedene Analysen durchgeführt, um insbesondere die Wirkung des probiotischen Bakteriums *Bacillus toyonensis* auf die intestinale Immunantwort beim Ferkel zu untersuchen.

Dazu wurden in einem Fütterungsversuch insgesamt 40 Ferkel von acht Sauen eingesetzt und in eine Versuchs- und eine Kontrollgruppe aufgeteilt. Die Sauen der Versuchsgruppe erhielten ab dem 90. Tag ante partum bis zum Ende der Säugeperiode *B. toyonensis* Sporen über das Futter, die Ferkel dieser Gruppe ab dem 14. Lebenstag als Beifutter. Anschließend wurden zu insgesamt vier verschiedenen Zeitpunkten vor und nach dem Absetzen Blut- und Gewebeproben entnommen und für die Untersuchung der intestinalen Integrität, eventueller morphologischer Veränderungen des Epithels, der Entwicklung verschiedener intraepithelialer Lymphozytenpopulationen während des Absetzens sowie für Genexpressionsanalysen verwendet.

Es konnten keine durch das Probiotikum beeinflussten gesundheitlichen Merkmale oder veränderte Leistungsparameter innerhalb der ersten drei Lebenswochen beobachtet werden. Es zeigten sich jedoch Veränderungen in der Integrität der intestinalen Barriere. Anhand von Ussing-Kammer Versuchen konnte kurze Zeit nach dem Absetzen eine deutlich erhöhte Permeabilität für den Marker Meerrettichperoxidase (HRP) im Jejunumepithel gemessen werden ($p \leq 0,05$). Elf Tage nach dem Absetzen war kein Gruppenunterschied mehr messbar. Untersuchungen der Serumproben mittels ELISA zeigten zudem nach dem Absetzen einen erhöhten Sojaprotein-Antikörpertiter innerhalb der Probiotikagruppe, welcher sich elf Tage nach dem Absetzen deutlich von der Kontrollgruppe unterschied ($p \leq 0,03$).

Der Einsatz des Probiotikums hatte keinen Einfluss auf die Expression von Molekülen der MHC-Klasse-I-Proteinkomplex-Familie durch die Enterozyten. Die in dieser Arbeit

untersuchten Stressfaktoren MIC2 und ULBP scheinen somit nicht für die erhöhte Permeabilität der Darmschranke verantwortlich zu sein.

Durchflusszytometrische Untersuchungen ergaben kurz nach dem Absetzen eine deutlich geringere Anzahl der Gesamt-Leukozyten im Jejunumepithel der Probiotikagruppe ($p \leq 0,05$). Insbesondere die Häufigkeit der intraepithelialen T-Zellen war in der mit dem Probiotikum gefütterten Gruppe niedriger ($p \leq 0,01$). Elf Tage nach dem Absetzen zeigte die Probiotikagruppe jedoch ein deutlich erhöhtes Vorkommen der Gesamt-Leukozyten im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p \leq 0,05$). Dies deutet auf eine verzögerte Entwicklung der intraepithelialen lymphozytären Besiedlung, insbesondere der spezifischen, adaptiven Immunabwehr, durch den Einsatz des Probiotikums hin.

Morphologische Messungen des jejunalen Epithels zeigten deutlich verlängerte Zotten innerhalb der Probiotikagruppe, besonders im Zeitraum vor und kurze Zeit nach dem Absetzen. Die Kryptentiefe scheint dabei von dem Probiotikum unbeeinflusst zu sein.

In einem zweiten, Probiotika-unabhängigen Versuchsteil wurde das immunologische Reaktionsverhalten während der kritischen Phase des Absetzens näher untersucht. Von besonderem Interesse war hierbei die Funktion des Natürlichen Killerzellen Rezeptors NKG2D. Dieser ist durch die Bindung von, durch Enterozyten exprimierten, Stressmolekülen dazu in der Lage, infizierte und gestresste Zellen zu erkennen. Mithilfe von MACS Analysen konnte erstmals die Expression des Rezeptors auf intraepithelialen $\gamma\delta$ T-Zellen des Schweins und somit ihre Fähigkeit zur Kommunikation mit den sie umgebenden Enterozyten gezeigt werden. Mittels Aktivierungsstudien isolierter $\gamma\delta$ T-Zellen und CD8 β T-Zellen konnte zudem ein sich unterscheidendes Expressionsverhalten des Rezeptors auf diesen beiden Lymphozytenpopulationen nachgewiesen werden. Während NKG2D auf den $\gamma\delta$ T-Zellen konstitutiv exprimiert zu sein scheint, resultiert eine vorherige Aktivierung des TCR/CD3 Komplexes auf den CD8 β T-Zellen in einer deutlich erhöhten Rezeptorexpression. NKG2D scheint hier, ähnlich wie beim Menschen, als co-stimulierender Rezeptor zu fungieren. Der NKG2D Rezeptor zeigt somit durch die Erkennung von Stressfaktoren sowohl Eigenschaften der angeborenen Immunabwehr, als auch, durch die Abhängigkeit der TCR Aktivität, der adaptiven Immunabwehr.

Mithilfe der Daten dieser Arbeit konnten somit neue Hypothesen zur Funktion verschiedener intraepithelialer Lymphozytenpopulationen und ihrer Rolle in der stressinduzierten Immunantwort aufgestellt werden.

7 Summary

Impact of the probiotic bacterium *Bacillus toyonensis* (ToyoCerin®) on the intestinal immune response of piglets during the weaning phase

Ever since the ban of antibiotic performance enhancers in Europe in 2006, probiotic feed additives are of special interest in the field of animal nutrition. Due to their health and growth promoting features they are commonly used in livestock rearing. One of the frequently discussed effects of probiotics is their potential for immunomodulation in the animal.

Thus, the objective of this study was to determine the influence of the probiotic *Bacillus toyonensis* (ToyoCerin®) on the intestinal immune response in piglets.

In a feeding trial 40 piglets from eight sows were assigned to a treatment and a control group. The sows of the treatment group received the *B. toyonensis* spores as a feed supplement from day 90 ante partum until the end of the suckling period of 28 days. The piglets of the treatment group began receiving the probiotic 14 days after birth. Blood and tissue samples were collected four separate times before and after weaning. The samples were used to evaluate the intestinal integrity and morphological changes of the epithelium, the development of different populations of intraepithelial lymphocytes during the weaning phase, and gene expression analysis.

The probiotic supplementation did not have an effect on the health or performance status of the piglets during the first three weeks of life.

However, probiotic administration had an impact on the intestinal integrity of the piglets. Ussing chamber analysis revealed a large increase in the permeability of the jejunal epithelium for the marker horseradish peroxidase shortly after weaning compared to the control group ($p \leq 0,05$). Eleven days after weaning the difference between treatment and control group was no longer detectable. Furthermore, ELISA analysis of the blood serum samples showed an elevated antibody titer for soy protein in the treatment group as compared to the control animals. This difference was most notable eleven days after weaning ($p \leq 0,03$).

The supplementation with the probiotic did not affect the expression of the analyzed MHC class I molecules by enterocytes. Consequently, the stress factors MIC2 and ULBP did not appear to be responsible for the enhanced permeability of the intestinal barrier.

Flow cytometry analysis revealed a noticeably decreased frequency of lymphocytes in the jejunal epithelium of the treatment group shortly after weaning ($p \leq 0,05$). The frequency of intraepithelial T cells was especially reduced in the group that received the probiotic ($p \leq 0,01$). However, eleven days after weaning the number of lymphocytes was much higher in the treatment group compared to the control animals ($p \leq 0,05$). This indicates that the development of the intraepithelial lymphocytes is delayed when piglets are supplemented with the probiotic, particularly those of the adaptive immune response.

Morphological measurements revealed elongated villi in the jejunal epithelium of the piglets from the treatment group, especially during the weaning phase. There was however no detectable influence of the probiotic on crypt depth.

In a probiotic-independent study, the immunological response during the crucial weaning phase of the piglets was evaluated in depth. Thereby the function of the natural killer cell receptor NKG2D was of particular interest. By binding stress molecules that are expressed by enterocytes the NKG2D receptor is capable of recognizing infected and stressed cells. The expression of NKG2D was detected via MACS analysis on intraepithelial $\gamma\delta$ T cells and their ability to communicate with surrounding enterocytes was shown for the first time in swine.

Based on activation studies of isolated $\gamma\delta$ T cells and CD8 β T cells differential expression patterns of NKG2D were revealed for both lymphocyte populations. Porcine intraepithelial $\gamma\delta$ T cells seem to express the receptor constitutively, while the expression is enhanced in CD8 β T cells by a previous activation of the TCR/CD3 complex. Therefore NKG2D appears to function as a co-stimulatory receptor on CD8 β T cells, as it does in humans.

NKG2D shows characteristics from both the innate and adaptive immune response due to its ability to recognize stress factors, and its dependence on TCR activity.

The results of this study allowed us to conduct new hypotheses about the function of different intraepithelial lymphocyte populations and their role in the stress induced immune system of piglets.

8 Literaturverzeichnis

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Pillai, S., 2012. Basic immunology: functions and disorders of the immune system, Vol 4. Elsevier Health Sciences.
- Akdis, M., Burgler, S., Cramer, R., Eiwegger, T., Fujita, H., Gomez, E., Klunker, S., Meyer, N., O'Mahony, L., Palomares, O., 2011. Interleukins, from 1 to 37, and interferon- γ : receptors, functions, and roles in diseases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 127, 701-721. e770.
- Alexopoulos, C., Karagiannidis, A., Kritas, S.K., Boscios, C., Georgoulakis, I.E., Kyriakis, S.C., 2001. Field evaluation of a bioregulator containing live *Bacillus cereus* spores on health status and performance of sows and their litters. *Journal of Veterinary Medicine, Series B* 48, 137-145.
- Ammori, B.J., Leeder, P.C., King, R.F., Barclay, G.R., Martin, I.G., Larvin, M., McMahon, M.J., 1999. Early increase in intestinal permeability in patients with severe acute pancreatitis: correlation with endotoxemia, organ failure, and mortality. *Journal of Gastrointestinal Surgery* 3, 252-262.
- Andre, C., Andre, F., Colin, L., Cavagna, S., 1987. Measurement of intestinal permeability to mannitol and lactulose as a means of diagnosing food allergy and evaluating therapeutic effectiveness of disodium cromoglycate. *Annals of allergy* 59, 127-130.
- Asahara, T., Shimizu, K., Nomoto, K., Hamabata, T., Ozawa, A., Takeda, Y., 2004. Probiotic bifidobacteria protect mice from lethal infection with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157: H7. *Infect Immun* 72, 2240-2247.
- Asante-Korang, A., Boyle, G.J., Webber, S.A., Miller, S.A., Fricker, F.J., 1996. Experience of FK506 immune suppression in pediatric heart transplantation: a study of long-term adverse effects. *The Journal of heart and lung transplantation: the official publication of the International Society for Heart Transplantation* 15, 415-422.
- Banchereau, J., Steinman, R.M., 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245-252.
- Barbara, G., 2006. Mucosal Barrier Defects in Irritable Bowel Syndrome. Who Left the Door Open? *The American journal of gastroenterology* 101, 1295-1298.
- Bauer, E., Williams, B.A., Smidt, H., Verstegen, M.W., Mosenthin, R., 2006. Influence of the gastrointestinal microbiota on development of the immune system in young animals. *Current issues in intestinal microbiology* 7, 35-52.
- Bauer, S., Groh, V., Wu, J., Steinle, A., Phillips, J.H., Lanier, L.L., Spies, T., 1999. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* 285, 727-729.
- Baum, B., Liebler-Tenorio, E.M., Enss, M.L., Pohlenz, J.F., Breves, G., 2002. *Saccharomyces boulardii* and *Bacillus cereus* var. *toyoi* influence the morphology and the mucins of the intestine of pigs. *Zeitschrift für Gastroenterologie* 40, 277-284.
- Beecher, D.J., Schoeni, J.L., Wong, A.C., 1995. Enterotoxic activity of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *Infect Immun* 63, 4423-4428.
- Bianchi, A., Zwart, R., Jeurissen, S., Moonen-Leusen, H., 1992. Development of the B- and T-cell compartments in porcine lymphoid organs from birth to adult life: an immunohistological approach. *Vet Immunol Immunopathol* 33, 201-221.
- Bijlsma, P.B., Kiliaan, A.J., Scholten, G., Heyman, M., Groot, J.A., Taminiau, J.A., 1996. Carbachol, but not forskolin, increases mucosal-to-serosal transport of intact protein in rat ileum in vitro. *American journal of physiology* 271, G147-155.
- Bliklager, A.T., Moeser, A.J., Gookin, J.L., Jones, S.L., Odle, J., 2007. Restoration of barrier function in injured intestinal mucosa. *Physiological reviews* 87, 545-564.
- Boudry, G., Péron, V., Le Huërou-Luron, I., Lallès, J.P., Sève, B., 2004. Weaning induces both transient and long-lasting modifications of absorptive, secretory, and barrier properties of piglet intestine. *The Journal of nutrition* 134, 2256-2262.

- Braat, H., van den Brande, J., van Tol, E., Hommes, D., Peppelenbosch, M., van Deventer, S., 2004. *Lactobacillus rhamnosus* induces peripheral hyporesponsiveness in stimulated CD4+ T cells via modulation of dendritic cell function. *The American journal of clinical nutrition* 80, 1618-1625.
- Brandão, R.L., Castro, I.M., Bambirra, E.A., Amaral, S.C., Fietto, L.G., Tropaia, M.J.M., Neves, M.J., Dos Santos, R.G., Gomes, N.C., Nicoli, J.R., 1998. Intracellular Signal Triggered by Cholera Toxin in *Saccharomyces boulardii* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* 64, 564-568.
- Brandtzaeg, P., Halstensen, T.S., Kett, K., Krajci, P., Kvale, D., Rognum, T.O., Scott, H., Sollid, L.M., 1989. Immunobiology and immunopathology of human gut mucosa: humoral immunity and intraepithelial lymphocytes. *Gastroenterology* 97, 1562-1584.
- Brandtzaeg, P., Pabst, R., 2004. Let's go mucosal: communication on slippery ground. *Trends Immunol* 25, 570-577.
- Brenner, M., Trowbridge, I., Strominger, J., 1985. Cross-linking of human T cell receptor proteins: association between the T cell idiotype β subunit and the T3 glycoprotein heavy subunit. *Cell* 40, 183-190.
- Breves, G., Hattenhauer, O., Schöneberger, M., Winckler, C., 1997. Untersuchungen zum Einfluß von Probiotika auf die intestinale Glucose-und Alaninaufnahme beim Schwein *Proceedings of the Society of Nutrition Physiology*. p. 45.
- Brooks, P., Tsourgiannis, C., 2003. Factors affecting the voluntary feed intake of the weaned pig. *Weaning the Pig: Concepts and Consequences*. Wageningen, The Netherlands: Wageningen Academic Publishers, 81-115.
- Burkey, T.E., Skjolaas, K.A., Minton, J.E., 2009. Board-invited review: porcine mucosal immunity of the gastrointestinal tract. *J Anim Sci* 87, 1493-1501.
- Cameron, H.L., Perdue, M.H., 2007. Muscarinic acetylcholine receptor activation increases transcellular transport of macromolecules across mouse and human intestinal epithelium in vitro. *Neurogastroenterol Motil* 19, 47-56.
- Castagliuolo, I., LaMont, J.T., Nikulasson, S.T., Pothoulakis, C., 1996. *Saccharomyces boulardii* protease inhibits *Clostridium difficile* toxin A effects in the rat ileum. *Infect Immun* 64, 5225-5232.
- Castagliuolo, I., Riegler, M.F., Valenick, L., LaMont, J.T., Pothoulakis, C., 1999. *Saccharomyces boulardii* protease inhibits the effects of *Clostridium difficile* toxins A and B in human colonic mucosa. *Infect Immun* 67, 302-307.
- Castellazzi, A.M., Valsecchi, C., Caimmi, S., Licari, A., Marseglia, A., Leoni, M.C., Caimmi, D., Miraglia del Giudice, M., Leonardi, S., La Rosa, M., Marseglia, G.L., 2013. Probiotics and food allergy. *Italian Journal of Pediatrics* 39, 47-47.
- Cattoretti, G., Pileri, S., Parravicini, C., Becker, M.H., Poggi, S., Bifulco, C., Key, G., D'Amato, L., Sabattini, E., Feudale, E., 1993. Antigen unmasking on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. *The Journal of pathology* 171, 83-98.
- Cera, K., Mahan, D., Cross, R., Reinhart, G., Whitmoyer, R., 1988. Effect of age, weaning and postweaning diet on small intestinal growth and jejunal morphology in young swine. *J Anim Sci* 66, 574-584.
- Cerwenka, A., Lanier, L.L., 2001. Natural killer cells, viruses and cancer. *Nature Reviews Immunology* 1, 41-49.
- Chan, S., Waltzinger, C., Tarakhovskiy, A., Benoist, C., Mathis, D., 1999. An influence of CD5 on the selection of CD4-lineage T cells. *Eur J Immunol* 29, 2916-2922.
- Chardon, P., Renard, C., Gaillard, C.R., Vaiman, M., 2000. The porcine major histocompatibility complex and related paralogous regions: a review. *Genet Sel Evol* 32, 109-128.
- Chareerntantanakul, W., Roth, J.A., 2006. Biology of porcine T lymphocytes. *Animal Health Research Reviews* 7, 81-96.
- Cheikhoussef, A., Pogori, N., Chen, W., Zhang, H., 2008. Antimicrobial proteinaceous compounds obtained from *bifidobacteria*: from production to their application. *International journal of food microbiology* 125, 215-222.

- Cheroutre, H., Lambolez, F., Mucida, D., 2011. The light and dark sides of intestinal intraepithelial lymphocytes. *Nature Reviews Immunology* 11, 445-456.
- Cho, J.H., 2011. Probiotics as a Dietary Additive for Pigs: A Review. *Journal of animal and veterinary advances* 10, 2127-2134.
- Christensen, H.R., Brix, S., Frokiaer, H., 2004. Immune response in mice to ingested soya protein: antibody production, oral tolerance and maternal transfer. *British Journal of Nutrition* 91, 725-732.
- Clayburgh, D.R., Barrett, T.A., Tang, Y., Meddings, J.B., Van Eldik, L.J., Watterson, D.M., Clarke, L.L., Mrsny, R.J., Turner, J.R., 2005. Epithelial myosin light chain kinase-dependent barrier dysfunction mediates T cell activation-induced diarrhea in vivo. *Journal of Clinical Investigation* 115, 2702.
- Clayburgh, D.R., Musch, M.W., Leitges, M., Fu, Y.-X., Turner, J.R., 2006. Coordinated epithelial NHE3 inhibition and barrier dysfunction are required for TNF-mediated diarrhea in vivo. *Journal of Clinical Investigation* 116, 2682.
- Cleusix, V., Lacroix, C., Vollenweider, S., Le Blay, G., 2008. Glycerol induces reuterin production and decreases *Escherichia coli* population in an in vitro model of colonic fermentation with immobilized human feces. *FEMS microbiology ecology* 63, 56-64.
- Collins, F.M., Carter, P., 1978. Growth of salmonellae in orally infected germfree mice. *Infect Immun* 21, 41-47.
- Collins, M.D., Gibson, G.R., 1999. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. *The American journal of clinical nutrition* 69, 1052s-1057s.
- Coonrod, J., Leadley, P., Eickhoff, T., 1971. *Bacillus cereus* pneumonia and bacteremia. A case report. *The American review of respiratory disease* 103, 711-714.
- Corcionivoschi, N., Drinceanu, D., Pop, I.M., Stack, D., Ștef, L., Julean, C., Bourke, B., 2010. The effect of probiotics on animal health. *Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies* 43, 35-41.
- Corthésy, B., Gaskins, H.R., Mercenier, A., 2007. Cross-talk between probiotic bacteria and the host immune system. *The Journal of nutrition* 137, 781S-790S.
- Cosman, D., Müllberg, J., Sutherland, C.L., Chin, W., Armitage, R., Fanslow, W., Kubin, M., Chalupny, N.J., 2001. ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity* 14, 123-133.
- Czechowski, T., Stitt, M., Altmann, T., Udvardi, M.K., Scheible, W.-R., 2005. Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis*. *Plant physiology* 139, 5-17.
- Dapson, R., 2007. Macromolecular changes caused by formalin fixation and antigen retrieval. *Biotechnic & Histochemistry* 82, 133-140.
- David, J.C., Grongnet, J., Lalles, J., 2002. Weaning affects the expression of heat shock proteins in different regions of the gastrointestinal tract of piglets. *The Journal of nutrition* 132, 2551-2561.
- Davidson, J.N., Hirsh, D.C., 1976. Bacterial competition as a means of preventing neonatal diarrhea in pigs. *Infect Immun* 13, 1773-1774.
- Davis, W.C., Zuckermann, F.A., Hamilton, M.J., Barbosa, J.I.R., Saalmüller, A., Binns, R.M., Licence, S.T., 1998. Analysis of monoclonal antibodies that recognize $\gamma\delta$ T/null cells. *Vet Immunol Immunopathol* 60, 305-316.
- Dawson, D., Morrill, J., Reddy, P., Minocha, H., Ramsey, H., 1988. Soy Protein Concentrate and Heated Soy Flours as Protein Sources in Milk Replacer for Preruminant Calves 1, 2, 3. *Journal of Dairy Science* 71, 1301-1309.
- De Champs, C., Maroncle, N., Balestrino, D., Rich, C., Forestier, C., 2003. Persistence of colonization of intestinal mucosa by a probiotic strain, *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus* Lcr35, after oral consumption. *J Clin Immunol* 41, 1270-1273.

- Del Grosso, M., Camilli, R., Barbabella, G., Northwood, J.B., Farrell, D.J., Pantosti, A., 2011. Genetic resistance elements carrying *mef* subclasses other than *mef* (A) in *Streptococcus pyogenes*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 55, 3226-3230.
- Delcenserie, V., Martel, D., Lamoureux, M., Amiot, J., Boutin, Y., Roy, D., 2008. Immunomodulatory effects of probiotics in the intestinal tract. *Current issues in molecular biology* 10, 37.
- Denyer, M.S., Wileman, T.E., Stirling, C.M., Zuber, B., Takamatsu, H.H., 2006. Perforin expression can define CD8 positive lymphocyte subsets in pigs allowing phenotypic and functional analysis of natural killer, cytotoxic T, natural killer T and MHC unrestricted cytotoxic T-cells. *Vet Immunol Immunopathol* 110, 279-292.
- Diefenbach, A., Jamieson, A.M., Liu, S.D., Shastri, N., Raulet, D.H., 2000. Ligands for the murine NKG2D receptor: expression by tumor cells and activation of NK cells and macrophages. *Nat Immunol* 1, 119-126.
- Diefenbach, A., Tomasello, E., Lucas, M., Jamieson, A.M., Hsia, J.K., Vivier, E., Raulet, D.H., 2002. Selective associations with signaling proteins determine stimulatory versus costimulatory activity of NKG2D. *Nat Immunol* 3, 1142-1149.
- Dinarello, C.A., 2000. Proinflammatory cytokines. *Chest Journal* 118, 503-508.
- Doig, C.J., Sutherland, L.R., Dean Sandham, J., Fick, G.H., Verhoef, M., Meddings, J.B., 1998. Increased intestinal permeability is associated with the development of multiple organ dysfunction syndrome in critically ill ICU patients. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 158, 444-451.
- Doll, V.M., Ehling-Schulz, M., Vogelmann, R., 2013. Concerted action of sphingomyelinase and non-hemolytic enterotoxin in pathogenic *Bacillus cereus*. *PLoS One* 8, e61404.
- Dongarrà, M.L., Rizzello, V., Muccio, L., Fries, W., Cascio, A., Bonaccorsi, I., Ferlazzo, G., 2013. Mucosal immunology and probiotics. *Current allergy and asthma reports* 13, 19-26.
- Eagle, R.A., Trowsdale, J., 2007. Promiscuity and the single receptor: NKG2D. *Nature Reviews Immunology* 7, 737-744.
- EFSA, 2012. Scientific Opinion on Toyocerin® (*Bacillus cereus*) as a feed additive for sows, piglets, pigs for fattening, cattle for fattening, calves for rearing, chickens for fattening and rabbits for fattening. *EFSA Journal* 10(10):2924 [34 pp.]. 10.2903/j.efsa.2012.2924.
- EFSA, 2014. Scientific Opinion on the safety and efficacy of Toyocerin® (*Bacillus toyonensis*) as a feed additive for chickens for fattening, weaned piglets, pigs for fattening, sows for reproduction, cattle for fattening and calves for rearing and for rabbits for fattening. *EFSA Journal* 10.2903/j.efsa.2014.376.
- Ehrlich, L.I.R., Ogasawara, K., Hamerman, J.A., Takaki, R., Zingoni, A., Allison, J.P., Lanier, L.L., 2005. Engagement of NKG2D by cognate ligand or antibody alone is insufficient to mediate costimulation of human and mouse CD8+ T cells. *The Journal of Immunology* 174, 1922-1931.
- Engle, M.J., 1994. The role of soybean meal hypersensitivity in postweaning lag and diarrhea in piglets. *Journal of swine health and production* 2, 7-10.
- European Commission, 2001. Scientific Committee on Animal Nutrition. Report of the Scientific Committee on animal Nutrition on product Toyocerin® for use as feed additive. Einzusehen unter http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scan/out72_en.pdf.
- European Commission, IP/05/1987, Ban on antibiotics as growth promoters in animal feed Press release database, 2006.
- European Commission, Commission implementing regulation (EU) No 288/2013 of 25 March 2013, concerning the suspension of the authorisations of the preparation of *Bacillus cereus* var. *toyoi*, *Official Journal of the European Union*, 2013.
- Ewing, W.N., 2009. *The living gut*. Nottingham University Press.
- Fais, S., CAPOBIANCHI, M.R., SILVESTRI, M., MERCURI, F., PALLONE, F., DIANZANI, F., 1994. Interferon expression in Crohn's disease patients: increased interferon- γ

- and- α mRNA in the intestinal lamina propria mononuclear cells. *Journal of interferon research* 14, 235-238.
- Fan, M., Xu, R., Cranwell, P., 2002. Growth and ontogeny of the gastrointestinal tract. The neonatal pig: *Gastrointestinal physiology. and nutrition.*
- Fanning, A.S., Anderson, J.M., 2009. Zonula occludens-1 and -2 are cytosolic scaffolds that regulate the assembly of cellular junctions. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1165, 113-120.
- Ferlazzo, G., Tsang, M.L., Moretta, L., Melioli, G., Steinman, R.M., Münz, C., 2002. Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via the NKp30 receptor by activated NK cells. *J Exp Med* 195, 343-351.
- Ferraris, R.P., Diamond, J., 1997. Regulation of intestinal sugar transport. *Physiological reviews* 77, 257-302.
- Fooks, L.J., Gibson, G.R., 2002. Probiotics as modulators of the gut flora. *British Journal of Nutrition* 88 Suppl 1, S39-49.
- Franklin, M., Mathew, A., Vickers, J., Clift, R., 2002. Characterization of microbial populations and volatile fatty acid concentrations in the jejunum, ileum, and cecum of pigs weaned at 17 vs 24 days of age. *J Anim Sci* 80, 2904-2910.
- Fraser, I.P., Koziel, H., Ezekowitz, R.A.B., 1998. The serum mannose-binding protein and the macrophage mannose receptor are pattern recognition molecules that link innate and adaptive immunity *Seminars in immunology.* Elsevier, pp. 363-372.
- Fuller, R., 1989. Probiotics in man and animals. *The Journal of applied bacteriology* 66, 365-378.
- Fuller, R., 1991. Probiotics in human medicine. *Gut* 32, 439.
- Fuller, R., 1992. History and development of probiotics *Probiotics.* Springer, pp. 1-8.
- Fuller, R., Barrow, P., Brooker, B., 1978. Bacteria associated with the gastric epithelium of neonatal pigs. *Appl Environ Microbiol* 35, 582-591.
- Galdeano, C.M., Perdigon, G., 2004. Role of viability of probiotic strains in their persistence in the gut and in mucosal immune stimulation. *J Appl Microbiol* 97, 673-681.
- Garcia-Borges, C.N., Phanavanh, B., Saraswati, S., Dennis, R.A., Crew, M.D., 2005. Molecular cloning and characterization of a porcine UL16 binding protein (ULBP)-like cDNA. *Mol Immunol* 42, 665-671.
- Gardiner, G.E., Casey, P.G., Casey, G., Lynch, P.B., Lawlor, P.G., Hill, C., Fitzgerald, G.F., Stanton, C., Ross, R.P., 2004. Relative ability of orally administered *Lactobacillus murinus* to predominate and persist in the porcine gastrointestinal tract. *Appl Environ Microbiol* 70, 1895-1906.
- Gaskins, H., 2001. Intestinal bacteria and their influence on swine growth. *Swine Nutrition* 2, 585-608.
- Gaskins, H., Kelley, K., 1995. Immunology and neonatal mortality. *The Neonatal Pig Development and Survival* CAB International, 39-56.
- Gebert, A., Rothkotter, H.J., Pabst, R., 1996. M cells in Peyer's patches of the intestine. *Int Rev Cytol* 167, 91-159.
- Gedek, B., Kirchgessner, M., Wiehler, S., Bott, A., Eidelsburger, U., Roth, F.X., 1993. [The nutritive effect of *Bacillus cereus* as a probiotic in the raising of piglets. 2. Effect and microbial count, composition and resistance determination of gastrointestinal and fecal microflora]. *Arch Anim Nutr* 44, 215-226.
- Genovese, K.J., Anderson, R.C., Harvey, R.B., Nisbet, D.J., 2000. Competitive exclusion treatment reduces the mortality and fecal shedding associated with enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in nursery-raised neonatal pigs. *Canadian Journal of Veterinary Research* 64, 204.
- Gerosa, F., Baldani-Guerra, B., Nisii, C., Marchesini, V., Carra, G., Trinchieri, G., 2002. Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells. *J Exp Med* 195, 327-333.

- GfE, 2006. Empfehlungen zur Energie- und Nährstoffversorgung bei Schweinen, In: Gesellschaft für Ernährungsphysiologie (Ed.) DLG-Verlag, Frankfurt am Main, p. 247.
- Gibson, G., Saavedra, J., MacFarlane, S., MacFarlane, G., 1997. Probiotics and intestinal infections Probiotics 2. Springer, pp. 10-39.
- Gibson, G., Wang, X., 1994. Regulatory effects of *bifidobacteria* on the growth of other colonic bacteria. *Journal of Applied Bacteriology* 77, 412-420.
- Gilfillan, S., Ho, E.L., Cella, M., Yokoyama, W.M., Colonna, M., 2002. NKG2D recruits two distinct adapters to trigger NK cell activation and costimulation. *Nat Immunol* 3, 1150-1155.
- Glas, R., Franksson, L., Une, C., Eloranta, M.-L., Öhlén, C., Örn, A., Kärre, K., 2000. Recruitment and Activation of Natural Killer (Nk) Cells in Vivo Determined by the Target Cell Phenotype An Adaptive Component of Nk Cell-Mediated Responses. *J Exp Med* 191, 129-138.
- Goodacre, R., Shann, B., Gilbert, R.J., Timmins, E.M., McGovern, A.C., Alsberg, B.K., Kell, D.B., Logan, N.A., 2000. Detection of the dipicolinic acid biomarker in *Bacillus* spores using Curie-point pyrolysis mass spectrometry and Fourier transform infrared spectroscopy. *Analytical Chemistry* 72, 119-127.
- Görke, B., 2000. Untersuchung der Schleimhautmorphologie im Dünn- und Dickdarm nach oraler Applikation von *Saccharomyces boulardii* und *Bacillus cereus var. toyoi* beim Schwein. Hannover, Tierärztliche Hochschule.
- Görke, B., Liebler-Tenorio, E., 2001. [Probiotics: Is there a scientific basis for their effects?]. *Deutsche tierärztliche Wochenschrift* 108, 249-251.
- Granot, E., Yakobovich, E., Bardenstein, R., 2006. Tacrolimus immunosuppression—An association with asymptomatic eosinophilia and elevated total and specific IgE levels. *Pediatric transplantation* 10, 690-693.
- Groh, V., Bahram, S., Bauer, S., Herman, A., Beauchamp, M., Spies, T., 1996. Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93, 12445-12450.
- Groh, V., Rhinehart, R., Randolph-Habecker, J., Topp, M.S., Riddell, S.R., Spies, T., 2001. Costimulation of CD8alpha beta T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells. *Nat Immunol* 2, 255-260.
- Groh, V., Rhinehart, R., Secrist, H., Bauer, S., Grabstein, K.H., Spies, T., 1999. Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived $\gamma\delta$ T cells of MICA and MICB. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96, 6879-6884.
- Groh, V., Steinle, A., Bauer, S., Spies, T., 1998. Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial $\gamma\delta$ T cells. *Science* 279, 1737-1740.
- Groschwitz, K.R., Hogan, S.P., 2009. Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis. *J Allergy Clin Immunol* 124, 3-20; quiz 21-22.
- Große, C., Scherer, J., Koch, D., Otto, M., Taudte, N., Grass, G., 2006. A new ferrous iron-uptake transporter, EfeU (YcdN), from *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 62, 120-131.
- Grozdanov, L., Raasch, C., Schulze, J., Sonnenborn, U., Gottschalk, G., Hacker, J., Dobrindt, U., 2004. Analysis of the genome structure of the nonpathogenic probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917. *J Bacteriol* 186, 5432-5441.
- Guarner, F., Malagelada, J.-R., 2003. Gut flora in health and disease. *The Lancet* 361, 512-519.
- Guarner, F., Schaafsma, G., 1998. Probiotics. *International journal of food microbiology* 39, 237-238.
- Guth, J., 2007. Untersuchungen zum Einfluss der probiotischen Futterzusätze *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 und *Bacillus cereus var. toyoi* NCIMB 40112 auf den Immunstatus von Sauen und Ferkeln. Berlin, Freie Universität Berlin, Diss., 2007,

- Haller, D., Bode, C., Hammes, W., Pfeifer, A., Schiffrin, E., Blum, S., 2000. Non-pathogenic bacteria elicit a differential cytokine response by intestinal epithelial cell/leucocyte co-cultures. *Gut* 47, 79-87.
- Hallmann, L., Burkhardt, F., 1974. *Klinische Mikrobiologie*, Vol 4. Thieme.
- Halloran, P.J., Sweeney, S.E., Strohmeier, C.M., Kim, Y.B., 1994. Molecular cloning and identification of the porcine cytolytic trigger molecule G7 as a Fc gamma RIII alpha (CD16) homologue. *The Journal of Immunology* 153, 2631-2641.
- Hampson, D., 1986. Alterations in piglet small intestinal structure at weaning. *Research in veterinary science* 40, 32-40.
- Haverson, K., Bailey, M., Higgins, V., Bland, P., Stokes, C., 1994. Characterization of monoclonal antibodies specific for monocytes, macrophages and granulocytes from porcine peripheral blood and mucosal tissues. *J Immunol Methods* 170, 233-245.
- Hayday, A., Geng, L., 1997. $\gamma\delta$ cells regulate autoimmunity. *Current Opinion in Immunology* 9, 884-889.
- Hayday, A., Theodoridis, E., Ramsburg, E., Shires, J., 2001. Intraepithelial lymphocytes: exploring the Third Way in immunology. *Nat Immunol* 2, 997-1003.
- Hayday, A.C., 2000. $\gamma\delta$ cells: a right time and a right place for a conserved third way of protection. *Annu Rev Immunol* 18, 975-1026.
- Hedemann, M.S., Højsgaard, S., Jensen, B.B., 2003. Small intestinal morphology and activity of intestinal peptidases in piglets around weaning. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 87, 32-41.
- Hentges, D.J., 1992. Gut flora and disease resistance Probiotics. Springer, pp. 87-110.
- Herias, M., Hesse, C., Telemo, E., Midtvedt, T., Hanson, L., Wold, A., 1999. Immunomodulatory effects of *Lactobacillus plantarum* colonizing the intestine of gnotobiotic rats. *Clinical and Experimental Immunology* 116, 283-290.
- Heyman, M., 2005. Gut barrier dysfunction in food allergy. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 17, 1279-1285.
- Hillman, K., Garnsworthy, P., Wiseman, J., 2001. Bacteriological aspects of the use of antibiotics and their alternatives in the feed of non-ruminant animals. *Recent advances in animal nutrition: 2001*, 107-134.
- Holoshitz, J., Romzek, N.C., Jia, Y., Wagner, L., Vila, L.M., Chen, S.-J., Wilson, J.M., Karp, D.R., 1993. MHC-independent presentation of mycobacteria to human $\gamma\delta$ T cells. *International immunology* 5, 1437-1443.
- Holtmeier, W., Kabelitz, D., 2005. $\gamma\delta$ T cells link innate and adaptive immune responses. *Chem Immunol Allergy* 86, 151-183.
- Hopwood, D., Hampson, D., 2003. Interactions between the intestinal microflora, diet and diarrhoea, and their influences on piglet health in the immediate post-weaning period. *Weaning the pig: concepts and consequences*, 199-217.
- Hornickel, I.N., 2009. Investigations on the innate immunity of the esophagus epithelium of domesticated mammals. DVG-Service.
- Houchins, J.P., Yabe, T., McSherry, C., Bach, F.H., 1991. DNA sequence analysis of NKG2, a family of related cDNA clones encoding type II integral membrane proteins on human natural killer cells. *J Exp Med* 173, 1017-1020.
- Huang, S., 1975. Immunohistochemical demonstration of hepatitis B core and surface antigens in paraffin sections. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 33, 88-95.
- Hüe, S., Mention, J.-J., Monteiro, R.C., Zhang, S., Cellier, C., Schmitz, J., Verkarre, V., Fodil, N., Bahram, S., Cerf-Bensussan, N., 2004. A direct role for NKG2D/MICA interaction in villous atrophy during celiac disease. *Immunity* 21, 367-377.
- Ibrahim, S.A., Salameh, M.M., 2001. Simple and rapid method for screening antimicrobial activities of *Bifidobacterium* species of human isolates. *Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology* 9, 53-62.

- Izadnia, F., Wong, C.T., Kocoshis, S.A., 1998. Brewer's yeast and *Saccharomyces boulardii* both attenuate *Clostridium difficile*-induced colonic secretion in the rat. *Digestive diseases and sciences* 43, 2055-2060.
- Jabri, B., Ebert, E., 2007. Human CD8+ intraepithelial lymphocytes: a unique model to study the regulation of effector cytotoxic T lymphocytes in tissue. *Immunological reviews* 215, 202-214.
- Jadamus, A., Vahjen, W., Kühn, I., 1999. Zur Wirkung des Probiotikums ToyoCerin in der Geflügelmast. *Lohmann Information* 2/1999, 1-4.
- Jadamus, A., Vahjen, W., Simon, O., 2001. Growth behaviour of a spore forming probiotic strain in the gastrointestinal tract of broiler chicken and piglets. *Arch Anim Nutr* 54, 1-17.
- Jamieson, A.M., Diefenbach, A., McMahon, C.W., Xiong, N., Carlyle, J.R., Raulet, D.H., 2002. The role of the NKG2D immunoreceptor in immune cell activation and natural killing. *Immunity* 17, 19-29.
- Janeway, C., 2005. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. Garland Science.
- Jasani, B., Rhodes, A., 2001. The role and mechanism of high-temperature antigen retrieval in diagnostic pathology. *Current Diagnostic Pathology* 7, 153-160.
- Jimenez, G., Urdian, M., Cifuentes, A., Lopez-Lopez, A., Blanch, A.R., Tamames, J., Kampfer, P., Kolsto, A.B., Ramon, D., Martinez, J.F., Codoner, F.M., Rossello-Mora, R., 2013. Description of *Bacillus toyonensis* sp. nov., a novel species of the *Bacillus cereus* group, and pairwise genome comparisons of the species of the group by means of ANI calculations. *Syst Appl Microbiol* 36, 383-391.
- Jin, L., Ho, Y., Abdullah, N., Jalaludin, S., 2000a. Digestive and bacterial enzyme activities in broilers fed diets supplemented with *Lactobacillus* cultures. *Poultry science* 79, 886-891.
- Jin, L., Marquardt, R., Zhao, X., 2000b. A strain of *Enterococcus faecium* (18C23) inhibits adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 to porcine small intestine mucus. *Appl Environ Microbiol* 66, 4200-4204.
- Joint FAO, 2002. WHO working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, Ontario, Canada 30.
- Jones, T., Turnbull, P., 1981. Bovine mastitis caused by *Bacillus cereus*. *Veterinary record* 108, 271-274.
- Jonjić, S., Koszinowski, U.H., 1984. Monoclonal antibodies reactive with swine lymphocytes. I. Antibodies to membrane structures that define the cytolytic T lymphocyte subset in the swine. *The Journal of Immunology* 133, 647-652.
- Julliand, V., 2006. Pre-and probiotics: potentials for equine practice EUROPEAN EQUINE NUTRITION AND HEALTH CONGRESS. pp. 17-18.
- Kaila, M., Isolauri, E., Soppi, E., Virtanen, E., Laine, S., Arvilommi, H., 1992. Enhancement of the circulating antibody secreting cell response in human diarrhea by a human *Lactobacillus* strain. *Pediatr Res* 32, 141-144.
- Kantas, D., Papatsiros, V., Tassis, P., Giavasis, I., Bouki, P., Tzika, E., 2015. A feed additive containing *Bacillus toyonensis* (ToyoCerin®) protects against enteric pathogens in postweaning piglets. *J Appl Microbiol* 118, 727-738.
- Kärre, K., 2002. NK cells, MHC class I molecules and the missing self. *Scand J Immunol* 55, 221-228.
- Kärre, K., Ljunggren, H.G., Piontek, G., Kiessling, R., 1986. Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy.
- Kaufmann, S.H., 2014. *Basiswissen Immunologie*. Springer, pp. 1-5.
- Keita, A.V., Soderholm, J.D., Ericson, A.C., 2010. Stress-induced barrier disruption of rat follicle-associated epithelium involves corticotropin-releasing hormone, acetylcholine, substance P, and mast cells. *Neurogastroenterol Motil* 22, 770-778, e221-772.

- Kelly, D., Smyth, J., McCracken, K., 1991. Digestive development of the early-weaned pig. *British Journal of Nutrition* 65, 169-180.
- King, M., Kelly, D., Morel, P., Pluske, J., 2003. 10 Aspects of intestinal immunity in the pig around weaning. *Weaning the pig: concepts and consequences*, 219.
- Kirchgeßner, M., 2004. *Tierernährung* ISBN 3-7690-0594-5.
- Kirchgeßner, M., Roth, F.X., Eidelsburger, U., Gedek, B., 1993. [The nutritive efficiency of *Bacillus cereus* as a probiotic in the raising of piglets. 1. Effect on the growth parameters and gastrointestinal environment]. *Arch Tierernähr* 44, 111-121.
- Klingberg, T.D., Budde, B.B., 2006. The survival and persistence in the human gastrointestinal tract of five potential probiotic *Lactobacilli* consumed as freeze-dried cultures or as probiotic sausage. *International journal of food microbiology* 109, 157-159.
- Klingspor, S., Martens, H., Çaushi, D., Twardziok, S., Aschenbach, J.R., Lodemann, U., 2013. Characterization of the effects of *Enterococcus faecium* on intestinal epithelial transport properties in piglets. *J Anim Sci* 91.
- Klobasa, F., Werhahn, E., Butler, J., 1987. Composition of sow milk during lactation. *J Anim Sci* 64, 1458-1466.
- Kneifel, W., 2005. Entwicklung und Qualitätsmerkmale von Probiotika. *Lohmann Information* 1, 17-20.
- Koenig, J.E., Spor, A., Scalfone, N., Fricker, A.D., Stombaugh, J., Knight, R., Angenent, L.T., Ley, R.E., 2011. Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 4578-4585.
- Kondo, M., Murakawa, Y., Harashima, N., Kobayashi, S., Yamaguchi, S., Harada, M., 2009. Roles of proinflammatory cytokines and the Fas/Fas ligand interaction in the pathogenesis of inflammatory myopathies. *Immunology* 128, e589-e599.
- Konstantinov, S.R., Awati, A.A., Williams, B.A., Miller, B.G., Jones, P., Stokes, C.R., Akkermans, A.D., Smidt, H., De Vos, W.M., 2006. Post-natal development of the porcine microbiota composition and activities. *Environmental Microbiology* 8, 1191-1199.
- Konstantinov, S.R., Favier, C.F., Zhu, W.Y., Williams, B.A., Klüß, J., Souffrant, W.-B., de Vos, W.M., Akkermans, A.D., Smidt, H., 2004. Microbial diversity studies of the porcine gastrointestinal ecosystem during weaning transition. *Animal Research* 53, 317-324.
- Kuether, K., 1987. Beeinflussung der Darmflora durch Toyocerin. *Lohmann Information*.
- Kuhns, M.S., Davis, M.M., Garcia, K.C., 2006. Deconstructing the form and function of the TCR/CD3 complex. *Immunity* 24, 133-139.
- Lacaille, F., Laurent, J., Bousquet, J., 1997. Life-threatening food allergy in a child treated with FK506. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 25, 228,229.
- Lallès, J.-P., Bosi, P., Smidt, H., Stokes, C.R., 2007a. Nutritional management of gut health in pigs around weaning. *Proceedings of the Nutrition Society* 66, 260-268.
- Lallès, J.-P., Bosi, P., Smidt, H., Stokes, C.R., 2007b. Weaning — A challenge to gut physiologists. *Livestock Science* 108, 82-93.
- Lallès, J.-P., Boudry, G., Favier, C., Le Floc'h, N., Luron, I., Montagne, L., Oswald, I.P., Pié, S., Piel, C., Sève, B., 2004. Gut function and dysfunction in young pigs: physiology. *Animal Research* 53, 301-316.
- Lambert, G.P., 2004. Role of gastrointestinal permeability in exertional heatstroke. *Exercise and sport sciences reviews* 32, 185-190.
- Langkamp-Henken, B., Glezer, J.A., Kudsk, K.A., 1992. Invited review: immunologic structure and function of the gastrointestinal tract. *Nutrition in Clinical Practice* 7, 100-108.
- Lauková, A., Stropfová, V., Ouwehand, A., 2004. Adhesion properties of enterococci to intestinal mucus of different hosts. *Veterinary research communications* 28, 647-655.

- Le Dividich, J., Sève, B., 2000. Effects of underfeeding during the weaning period on growth, metabolism, and hormonal adjustments in the piglet. *Domestic animal endocrinology* 19, 63-74.
- Lee, Y., 1999. Handbook of probiotics.
- Lefrançois, L., 1991. Extrathymic differentiation of intraepithelial lymphocytes: generation of a separate and unequal T-cell repertoire? *Immunol Today* 12, 436-438.
- Ley, R.E., Hamady, M., Lozupone, C., Turnbaugh, P.J., Ramey, R.R., Bircher, J.S., Schlegel, M.L., Tucker, T.A., Schrenzel, M.D., Knight, R., 2008. Evolution of mammals and their gut microbes. *Science* 320, 1647-1651.
- Li, D., Nelssen, J., Reddy, P., Blecha, F., Hancock, J., Allee, G., Goodband, R., Klemm, R., 1990a. Transient hypersensitivity to soybean meal in the early-weaned pig. *J Anim Sci* 68, 1790-1799.
- Li, D.F., Nelssen, J.L., Reddy, P.G., Blecha, F., Hancock, J.D., Allee, G.L., Goodband, R.D., Klemm, R.D., 1990b. Transient hypersensitivity to soybean meal in the early-weaned pig. *J Anim Sci* 68, 1790-1799.
- Li, D.F., Nelssen, J.L., Reddy, P.G., Blecha, F., Klemm, R., Goodband, R.D., 1991. Interrelationship between hypersensitivity to soybean proteins and growth performance in early-weaned pigs. *J Anim Sci* 69, 4062-4069.
- Li, P., Morris, D.L., Willcox, B.E., Steinle, A., Spies, T., Strong, R.K., 2001. Complex structure of the activating immunoreceptor NKG2D and its MHC class I-like ligand MICA. *Nat Immunol* 2, 443-451.
- Lilienfeld, B.G., Garcia-Borges, C., Crew, M.D., Seebach, J.D., 2006. Porcine UL16-binding protein 1 expressed on the surface of endothelial cells triggers human NK cytotoxicity through NKG2D. *The Journal of Immunology* 177, 2146-2152.
- Lilly, D.M., Stillwell, R.H., 1965. PROBIOTICS: GROWTH-PROMOTING FACTORS PRODUCED BY MICROORGANISMS. *Science* 147, 747-748.
- Liu, P., Pieper, R., Rieger, J., Vahjen, W., Davin, R., Plendl, J., Meyer, W., Zentek, J., 2014. Effect of Dietary Zinc Oxide on Morphological Characteristics, Mucin Composition and Gene Expression in the Colon of Weaned Piglets. *PLoS One* 9, e91091.
- Liu, Y., Huang, J., Hou, Y., Zhu, H., Zhao, S., Ding, B., Yin, Y., Yi, G., Shi, J., Fan, W., 2008. Dietary arginine supplementation alleviates intestinal mucosal disruption induced by *Escherichia coli* lipopolysaccharide in weaned pigs. *British Journal of Nutrition* 100, 552-560.
- Ljunggren, H.-G., Kärre, K., 1990. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today* 11, 237-244.
- Lodemann, U., Lorenz, B.M., Weyrauch, K.D., Martens, H., 2008. Effects of *Bacillus cereus* var. *toyoi* as probiotic feed supplement on intestinal transport and barrier function in piglets. *Arch Anim Nutr* 62, 87-106.
- López-Larrea, C., Suárez-Alvarez, B., López-Soto, A., López-Vázquez, A., Gonzalez, S., 2008. The NKG2D receptor: sensing stressed cells. *Trends in Molecular Medicine* 14, 179-189.
- Lowin, B., Peitsch, M.C., Tschopp, J., 1995. Perforin and granzymes: crucial effector molecules in cytolytic T lymphocyte and natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Curr Top Microbiol Immunol* 198, 1-24.
- Lu, L., Walker, W.A., 2001. Pathologic and physiologic interactions of bacteria with the gastrointestinal epithelium. *The American journal of clinical nutrition* 73, 1124S-1130S.
- MacDonald, T., Hutchings, P., Choy, M., Murch, S., Cooke, A., 1990. Tumour necrosis factor-alpha and interferon-gamma production measured at the single cell level in normal and inflamed human intestine. *Clinical and Experimental Immunology* 81, 301.
- Mack, D.R., Michail, S., Wei, S., McDougall, L., Hollingsworth, M.A., 1999. Probiotics inhibit enteropathogenic *E. coli* adherence in vitro by inducing intestinal mucin gene

- expression. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 276, G941-G950.
- Mackie, R.I., Sghir, A., Gaskins, H.R., 1999. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *The American journal of clinical nutrition* 69, 1035s-1045s.
- Macpherson, A., McCoy, K., Johansen, F., Brandtzaeg, P., 2008. The immune geography of IgA induction and function. *Mucosal immunology* 1, 11-22.
- Madara, J.L., Nash, S., Moore, R., Atisook, K., 1989. Structure and function of the intestinal epithelial barrier in health and disease. *Monographs in pathology*, 306-324.
- Madec, F., Bridoux, N., Bounaix, S., Jestin, A., 1998. Measurement of digestive disorders in the piglet at weaning and related risk factors. *Preventive veterinary medicine* 35, 53-72.
- Mair, K.H., Essler, S.E., Patzl, M., Storset, A.K., Saalmuller, A., Gerner, W., 2012. NKp46 expression discriminates porcine NK cells with different functional properties. *Eur J Immunol* 42, 1261-1271.
- Makkink, C.A., Negulescu, G.P., Guixin, Q., Verstegen, M.W., 1994. Effect of dietary protein source on feed intake, growth, pancreatic enzyme activities and jejunal morphology in newly-weaned piglets. *British Journal of Nutrition* 72, 353-368.
- Mandal, A., Viswanathan, C., 2015. Natural killer cells: In health and disease. *Hematology/Oncology and Stem Cell Therapy* 8, 47-55.
- Martin, L., Lodemann, U., Bondzio, A., Gefeller, E.M., Vahjen, W., Aschenbach, J.R., Zentek, J., Pieper, R., 2013. A high amount of dietary zinc changes the expression of zinc transporters and metallothionein in jejunal epithelial cells in vitro and in vivo but does not prevent zinc accumulation in jejunal tissue of piglets. *The Journal of nutrition* 143, 1205-1210.
- McCracken, B.A., Gaskins, H.R., Ruwe-Kaiser, P.J., Klasing, K.C., Jewell, D.E., 1995. Diet-dependent and diet-independent metabolic responses underlie growth stasis of pigs at weaning. *The Journal of nutrition* 125, 2838-2845.
- McCracken, B.A., Spurlock, M.E., Roos, M.A., Zuckermann, F.A., Gaskins, H.R., 1999. Weaning anorexia may contribute to local inflammation in the piglet small intestine. *The Journal of nutrition* 129, 613-619.
- McGuckin, M.A., Eri, R., Simms, L.A., Florin, T.H., Radford-Smith, G., 2009. Intestinal barrier dysfunction in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* 15, 100-113.
- McKay, D., Baird, A., 1999. Cytokine regulation of epithelial permeability and ion transport. *Gut* 44, 283-289.
- McKenney, P.T., Driks, A., Eichenberger, P., 2013. The *Bacillus subtilis* endospore: assembly and functions of the multilayered coat. *Nature Reviews Microbiology* 11, 33-44.
- Meddings, J., 2000. Barrier dysfunction and Crohn's disease. *Annals of the New York Academy of Sciences* 915, 333-338.
- Meddings, J., Jarand, J., Urbanski, S., Hardin, J., Gall, D., 1999. Increased gastrointestinal permeability is an early lesion in the spontaneously diabetic BB rat. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 276, G951-G957.
- Melin, L., Katouli, M., Lindberg, Å., Fossum, C., Wallgren, P., 2000. Weaning of piglets. Effects of an exposure to a pathogenic strain of *Escherichia coli*. *Journal of Veterinary Medicine, Series B* 47, 663-675.
- Miller, B., James, P., Smith, M., Bourne, F., 1986. Effect of weaning on the capacity of pig intestinal villi to digest and absorb nutrients. *The Journal of Agricultural Science* 107, 579-590.
- Miller, B., Newby, T., Stokes, C., Bourne, F., 1984a. Influence of diet on postweaning malabsorption and diarrhoea in the pig. *Research in veterinary science* 36, 187-193.
- Miller, B.G., Newby, T.J., Stokes, C.R., Hampson, D.J., Brown, P.J., Bourne, F.J., 1984b. The importance of dietary antigen in the cause of postweaning diarrhea in pigs. *American journal of veterinary research* 45, 1730-1733.

- Miller, H., Slade, R., 2003. Digestive physiology of the weaned pig. Weaning the pig: concepts and consequences, 117.
- Mingoa, M., Vecchi, M., Cochetti, I., Tili, E., Vitali, L.A., Manzin, A., Varaldo, P.E., Montanari, M.P., 2007. Composite structure of *Streptococcus pneumoniae* containing the erythromycin efflux resistance gene *mef* (I) and the chloramphenicol resistance gene *catQ*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 51, 3983-3987.
- Mizoguchi, A., Mizoguchi, E., de Jong, Y.P., Takedatsu, H., Preffer, F.I., Terhorst, C., Bhan, A.K., 2003. Role of the CD5 molecule on TCR gamma delta T cell-mediated immune functions: development of germinal centers and chronic intestinal inflammation. *International immunology* 15, 97-108.
- Mocikat, R., Braumüller, H., Gumy, A., Egeter, O., Ziegler, H., Reusch, U., Bubeck, A., Louis, J., Mailhammer, R., Riethmüller, G., Koszinowski, U., Röcken, M., 2003. Natural Killer Cells Activated by MHC Class II Targets Prime Dendritic Cells to Induce Protective CD8 T Cell Responses. *Immunity* 19, 561-569.
- Moeser, A.J., Vander Klok, C., Ryan, K.A., Wooten, J.G., Little, D., Cook, V.L., Blikslager, A.T., 2007. Stress signaling pathways activated by weaning mediate intestinal dysfunction in the pig. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 292, G173-G181.
- Molinero, L.L., Fuertes, M.B., Rabinovich, G.A., Fainboim, L., Zwirner, N.W., 2002. Activation-induced expression of MICA on T lymphocytes involves engagement of CD3 and CD28. *Journal of leukocyte biology* 71, 791-797.
- Montagne, L., Boudry, G., Favier, C., Huërou-Luron, I.L., Lalles, J.-P., Seve, B., 2007. Main intestinal markers associated with the changes in gut architecture and function in piglets after weaning. *British Journal of Nutrition* 97, 45-57.
- Montero, C., 2003. The antigen-antibody reaction in immunohistochemistry. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 51, 1-4.
- Moretta, A., Marcenaro, E., Parolini, S., Ferlazzo, G., Moretta, L., 2007. NK cells at the interface between innate and adaptive immunity. *Cell Death & Differentiation* 15, 226-233.
- Morita, C.T., Mariuzza, R.A., Brenner, M.B., 2000. Antigen recognition by human gamma delta T cells: pattern recognition by the adaptive immune system. *Springer Semin Immunopathol* 22, 191-217.
- Mowat, A.M., Ferguson, A., 1981. Hypersensitivity in the small intestinal mucosa. V. Induction of cell-mediated immunity to a dietary antigen. *Clinical and Experimental Immunology* 43, 574-582.
- Muralidhara, K., Sandine, W.E., England, D.C., Elliker, P.R., 1973. Colonization of *Escherichia-Coli* and *Lactobacillus* in Intestines of Pigs. *Journal of Dairy Science* 56, 635-635.
- Murguía-Peniche, T., Mihatsch, W.A., Zegarra, J., Supapannachart, S., Ding, Z.-Y., Neu, J., 2013. Intestinal mucosal defense system, Part 2. Probiotics and prebiotics. *The Journal of pediatrics* 162, S64-S71.
- Musch, M.W., Clarke, L.L., Mamah, D., Gawenis, L.R., Zhang, Z., Ellsworth, W., Shalowitz, D., Mittal, N., Efthimiou, P., Alnadjim, Z., 2002. T cell activation causes diarrhea by increasing intestinal permeability and inhibiting epithelial Na⁺/K⁺-ATPase. *Journal of Clinical Investigation* 110, 1739-1748.
- Nabuurs, M., Hoogendoorn, A., Van der Molen, E., Van Osta, A., 1993. Villus height and crypt depth in weaned and unweaned pigs, reared under various circumstances in the Netherlands. *Research in veterinary science* 55, 78-84.
- Neutra, M.R., Kozlowski, P.A., 2006. Mucosal vaccines: the promise and the challenge. *Nature Reviews Immunology* 6, 148-158.
- O'Callaghan, C.A., Cerwenka, A., Willcox, B.E., Lanier, L.L., Bjorkman, P.J., 2001. Molecular competition for NKG2D: H60 and RAE1 compete unequally for NKG2D with dominance of H60. *Immunity* 15, 201-211.

- O'Loughlin, A., McGee, M., Waters, S.M., Doyle, S., Earley, B., 2011. Examination of the bovine leukocyte environment using immunogenetic biomarkers to assess immunocompetence following exposure to weaning stress. *BMC Veterinary Research* 7, 1.
- Odle, J., Zijlstra, R.T., Donovan, S.M., 1996. Intestinal effects of milkborne growth factors in neonates of agricultural importance. *J Anim Sci* 74, 2509-2522.
- Oelschlaeger, T.A., 2010. Mechanisms of probiotic actions - A review. *Int J Med Microbiol* 300, 57-62.
- Ogasawara, K., Lanier, L.L., 2005. NKG2D in NK and T cell-mediated immunity. *J Clin Immunol* 25, 534-540.
- Ogata, M., Itoh, T., 2016. Gamma/delta intraepithelial lymphocytes in the mouse small intestine. *Anatomical Science International*, 1-12.
- Ogata, M., Ota, Y., Nanno, M., Suzuki, R., Itoh, T., 2014. Activation of intra-epithelial lymphocytes; their morphology, marker expression and ultimate fate. *Cell Tissue Res* 356, 217-230.
- Ohashi, Y., Ushida, K., 2009. Health-beneficial effects of probiotics: Its mode of action. *Animal science journal* 80, 361-371.
- Opal, S.M., Depalo, V.A., 2000. Anti-inflammatory cytokines. *Chest Journal* 117, 1162-1172.
- Oppenheim, D.E., Roberts, S.J., Clarke, S.L., Filler, R., Lewis, J.M., Tigelaar, R.E., Girardi, M., Hayday, A.C., 2005. Sustained localized expression of ligand for the activating NKG2D receptor impairs natural cytotoxicity in vivo and reduces tumor immunosurveillance. *Nat Immunol* 6, 928-937.
- Oren, A., 2014. List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published. *Int J Syst Evol Microbiol* 64, 1-5.
- Otte, J.-M., Podolsky, D.K., 2004. Functional modulation of enterocytes by gram-positive and gram-negative microorganisms. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 286, G613-G626.
- Ouwehand, A.C., Salminen, S., Isolauri, E., 2002. Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie Van Leeuwenhoek* 82, 279-289.
- Pabst, R., Rothkötter, H., 1999. Postnatal development of lymphocyte subsets in different compartments of the small intestine of piglets. *Vet Immunol Immunopathol* 72, 167-173.
- Pabst, R., Rothkötter, H.J., 2006. Structure and function of the gut mucosal immune system. *Immune mechanisms in inflammatory bowel disease*. Springer, pp. 1-14.
- Paredes-Sabja, D., Setlow, P., Sarker, M.R., 2011. Germination of spores of *Bacillales* and *Clostridiales* species: mechanisms and proteins involved. *Trends in microbiology* 19, 85-94.
- Park, Y.W., 2009. Bioactive components in milk and dairy products. John Wiley & Sons.
- Parker, B., 1974. Probiotics, the other half of the antibiotics story. *Animal Nutrition and Health* 29, 4-8.
- Pauly, T., Weiland, E., Hirt, W., DREYER-BUX, C., Maurer, S., Summerfield, A., Saalmüller, A., 1996. Differentiation between MHC-restricted and non-MHC-restricted porcine cytolytic T lymphocytes. *Immunology* 88, 238-246.
- Penders, J., Thijs, C., Vink, C., Stelma, F.F., Snijders, B., Kummeling, I., van den Brandt, P.A., Stobberingh, E.E., 2006. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics* 118, 511-521.
- Pescovitz, M.D., Aasted, B., Canals, A., Dominguez, J., Vizcaino, J.S., Pospisil, R., Sinkora, J., Salmon, H., Valpotic, I., Davis, W.C., Arn, S., Sachs, D.H., Lunney, J.K., Zuckerman, F., Weiland, E., Saalmüller, A., 1994a. Analysis of monoclonal antibodies reactive with the porcine CD2 antigen. *Vet Immunol Immunopathol* 43, 229-232.
- Pescovitz, M.D., Aasted, B., Canals, A., Dominguez, J., Vizcaino, J.S., Pospisil, R., Trebichavsky, I., Salmon, H., Valpotic, I., Davis, W.C., Arn, S., Sachs, D.H., Lunney,

- J.K., Zuckerman, F., Weiland, E., Saalmueller, A., 1994b. Analysis of monoclonal antibodies reactive with the porcine CD4 antigen. *Vet Immunol Immunopathol* 43, 233-236.
- Pescovitz, M.D., Book, B.K., Aasted, B., Dominguez, J., Bullido, R., Trebichavsky, I., Novikov, B., Valpotic, I., Tomaskovic, M., Nielsen, J., Arn, S., Sachs, D.H., Lunney, J.K., Boyd, P.C., Walker, J., Lee, R., Saalmüller, A., 1998a. Analyses of monoclonal antibodies reacting with porcine CD5: results from the Second International Swine CD Workshop. *Vet Immunol Immunopathol* 60, 269-273.
- Pescovitz, M.D., Book, B.K., Aasted, B., Dominguez, J., Ezquerra, A., Trebichavsky, I., Novikov, B., Valpotic, I., Nielsen, J., Arn, S., Sachs, D.H., Lunney, J.K., Boyd, P.C., Walker, J., Lee, R., Lackovic, G., Kirkham, P., Parkhouse, R.M.E., Saalmüller, A., 1998b. Analyses of monoclonal antibodies reacting with porcine CD3: results from the Second International Swine CD Workshop. *Vet Immunol Immunopathol* 60, 261-268.
- Pescovitz, M.D., Book, B.K., Aasted, B., Dominguez, J., Ezquerra, A., Trebichavsky, I., Novikov, B., Valpotic, I., Sver, L., Nielsen, J., Arn, S., Sachs, D.H., Lunney, J.K., Boyd, P.C., Walker, J., Lee, R., Davis, W., Barbosa, I.R., Zuckermann, F., Saalmüller, A., 1998c. Summary of workshop findings for antibodies reacting with porcine T-cells and activation antigens: results from the Second International Swine CD Workshop. *Vet Immunol Immunopathol* 60, 251-260.
- Pescovitz, M.D., Lunney, J.K., Sachs, D.H., 1985. Murine anti-swine T4 and T8 monoclonal antibodies: distribution and effects on proliferative and cytotoxic T cells. *The Journal of Immunology* 134, 37-44.
- Petri, D., Hill, J., Van Kessel, A., 2010. Microbial succession in the gastrointestinal tract (GIT) of the preweaned pig. *Livestock Science* 133, 107-109.
- Pfaffl, M.W., Tichopad, A., Prgomet, C., Neuvians, T.P., 2004. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett* 26, 509-515.
- Piccioli, D., Sbrana, S., Melandri, E., Valiante, N.M., 2002. Contact-dependent stimulation and inhibition of dendritic cells by natural killer cells. *J Exp Med* 195, 335-341.
- Pié, S., Lallès, J., Blazy, F., Laffitte, J., Sève, B., Oswald, I., 2004. Weaning is associated with an upregulation of expression of inflammatory cytokines in the intestine of piglets. *The Journal of nutrition* 134, 641-647.
- Pieper, R., Kroger, S., Richter, J.F., Wang, J., Martin, L., Bindelle, J., Htoo, J.K., von Smolinski, D., Vahjen, W., Zentek, J., Van Kessel, A.G., 2012. Fermentable fiber ameliorates fermentable protein-induced changes in microbial ecology, but not the mucosal response, in the colon of piglets. *The Journal of nutrition* 142, 661-667.
- Piriou-Guzylack, L., Salmon, H., 2008. Membrane markers of the immune cells in swine: an update. *Veterinary research communications* 39, 54.
- Pluske, J., Gaskins, H., Morel, P., Revell, D., King, M., James, E., 1999. The number of villus and crypt CD4+ T cells in the jejunum of piglets increases after weaning. *Manipulating pig production VII* (Ed. PD Cranwell). Australasian Pig Science Association, Werribee, Australia, 244.
- Pluske, J.R., Hampson, D.J., Williams, I.H., 1997. Factors influencing the structure and function of the small intestine in the weaned pig: a review. *Livestock production science* 51, 215-236.
- Podolsky, D.K., 1999. V. Innate mechanisms of mucosal defense and repair: the best offense is a good defense. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 277, G495-G499.
- Porcelli, S., Brenner, M.B., Band, H., 1991. Biology of the Human γ T-Cell Receptor. *Immunological reviews* 120, 137-183.
- Pothoulakis, C., Kelly, C.P., Joshi, M.A., Gao, N., O'Keane, C.J., Castagliuolo, I., Lamont, J.T., 1993. *Saccharomyces boulardii* inhibits *Clostridium difficile* toxin A binding and

- enterotoxicity in rat ileum. GASTROENTEROLOGY-BALTIMORE THEN PHILADELPHIA- 104, 1108-1108.
- Prüss, B.M., Dietrich, R., Nibler, B., Martlbauer, E., Scherer, S., 1999. The hemolytic enterotoxin HBL is broadly distributed among species of the *Bacillus cereus* group. Appl Environ Microbiol 65, 5436-5442.
- Quigley, E.M., 2010. Prebiotics and probiotics; modifying and mining the microbiota. Pharmacological research 61, 213-218.
- Rankin, L., Groom, J., Mielke, L.A., Seillet, C., Belz, G.T., 2013. Diversity, function, and transcriptional regulation of gut innate lymphocytes. Front Immunol 4, 22.
- Roberts, A.I., Lee, L., Schwarz, E., Groh, V., Spies, T., Ebert, E.C., Jabri, B., 2001. Cutting edge: NKG2D receptors induced by IL-15 costimulate CD28-negative effector CTL in the tissue microenvironment. The Journal of Immunology 167, 5527-5530.
- Roberts, M.C., Schwarz, S., 2009. Tetracycline and chloramphenicol resistance mechanisms Antimicrobial drug resistance. Springer, pp. 183-193.
- Rocha, B., Vassalli, P., Guy-Grand, D., 1991. The V beta repertoire of mouse gut homodimeric alpha CD8+ intraepithelial T cell receptor alpha/beta+ lymphocytes reveals a major extrathymic pathway of T cell differentiation. J Exp Med 173, 483-486.
- Rolle, M., Mayr, A., 2007. Medizinische Mikrobiologie, Infektions-und Seuchenlehre, Vol 8. Enke Verlag.
- Romero, A.I., Thoren, F.B., Brune, M., Hellstrand, K., 2006. NKp46 and NKG2D receptor expression in NK cells with CD56dim and CD56bright phenotype: regulation by histamine and reactive oxygen species. Br J Haematol 132, 91-98.
- Rood, J.I., Jefferson, S., Bannam, T., Wilkie, J., Mullany, P., Wren, B., 1989. Hybridization analysis of three chloramphenicol resistance determinants from *Clostridium perfringens* and *Clostridium difficile*. Antimicrobial agents and chemotherapy 33, 1569-1574.
- Rosen, D.B., Araki, M., Hamerman, J.A., Chen, T., Yamamura, T., Lanier, L.L., 2004. A structural basis for the association of DAP12 with mouse, but not human, NKG2D. The Journal of Immunology 173, 2470-2478.
- Rothkötter, Möllhoff, Pabst, 1999a. The Influence of Age and Breeding Conditions on the Number and Proliferation of Intraepithelial Lymphocytes in Pigs. Scand J Immunol 50, 31-38.
- Rothkötter, H., Pabst, R., Bailey, M., 1999b. Lymphocyte migration in the intestinal mucosa: entry, transit and emigration of lymphoid cells and the influence of antigen. Vet Immunol Immunopathol 72, 157-165.
- Rothkötter, H., Ulbrich, H., Pabst, R., 1991. The postnatal development of gut lamina propria lymphocytes: number, proliferation, and T and B cell subsets in conventional and germ-free pigs. Pediatr Res 29, 237-242.
- Saalmüller, A., 1996. Characterization of swine leukocyte differentiation antigens. Immunol Today 17, 352-354.
- Saalmüller, A., 2006. New understanding of immunological mechanisms. Vet Microbiol 117, 32-38.
- Saalmüller, A., Aasted, B., Canals, A., Dominguez, J., Goldman, T., Lunney, J., Maurer, S., Pescovitz, M., Pospisil, R., Salmon, H., 1994a. Analyses of monoclonal antibodies reactive with porcine CD5. Vet Immunol Immunopathol 43, 237-242.
- Saalmüller, A., Aasted, B., Canals, A., Dominguez, J., Goldman, T., Lunney, J.K., Maurer, S., Pescovitz, M.D., Pospisil, R., Salmon, H., Trebichavsky, I., Valpotic, I., Vizcaino, J.S., Zuckermann, F., 1994b. Analyses of mAb reactive with porcine CD8. Vet Immunol Immunopathol 43, 249-254.
- Saalmüller, A., Bryant, J., 1994. Characteristics of porcine T lymphocytes and T-cell lines. Vet Immunol Immunopathol 43, 45-52.
- Salminen, S., Bouley, C., Boutron-Ruault, M.C., Cummings, J.H., Franck, A., Gibson, G.R., Isolauri, E., Moreau, M.C., Roberfroid, M., Rowland, I., 1998. Functional food

- science and gastrointestinal physiology and function. *British Journal of Nutrition* 80, S147-S171.
- Salminen, S., Ouwehand, A., Benno, Y., Lee, Y., 1999. Probiotics: how should they be defined? *Trends in Food Science & Technology* 10, 107-110.
- Sansom, J.N., de Bruin, T.G., Voermans, J.J., Meulenberg, J.J., Pol, J.M., Bianchi, A.T., 2000. Changes of leukocyte phenotype and function in the broncho-alveolar lavage fluid of pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus: a role for CD8+ cells. *Journal of general virology* 81, 497-505.
- Sansom, B., Gleed, P., 1981. The ingestion of sow's faeces by suckling piglets. *British Journal of Nutrition* 46, 451-456.
- Scharek-Tedin, L., Pieper, R., Vahjen, W., Tedin, K., Neumann, K., Zentek, J., 2013. *Bacillus cereus* var. *toyoi* modulates the immune reaction and reduces the occurrence of diarrhea in piglets challenged with *Salmonella* Typhimurium DT104. *J Anim Sci* 91, 5696-5704.
- Scharek, L., Altherr, B.J., Tolke, C., Schmidt, M.F., 2007. Influence of the probiotic *Bacillus cereus* var. *toyoi* on the intestinal immunity of piglets. *Vet Immunol Immunopathol* 120, 136-147.
- Scharek, L., Guth, J., Reiter, K., Weyrauch, K., Taras, D., Schwerk, P., Schierack, P., Schmidt, M., Wieler, L., Tedin, K., 2005. Influence of a probiotic *Enterococcus faecium* strain on development of the immune system of sows and piglets. *Vet Immunol Immunopathol* 105, 151-161.
- Scharek, L.T., K.; Guth, J.; Schmidt, M., 2004. Das Intestinale Immunsystem des Schweines - mögliche Einflussebenen von Probiotika. *Lohmann Information* 1/2004, 1-4.
- Schierack, P., Wieler, L.H., Taras, D., Herwig, V., Tachu, B., Hlinak, A., Schmidt, M.F., Scharek, L., 2007. *Bacillus cereus* var. *toyoi* enhanced systemic immune response in piglets. *Vet Immunol Immunopathol* 118, 1-11.
- Schild, H., Mavaddat, N., Litzenberger, C., Ehrlich, E.W., Davis, M.M., Bluestone, J.A., Matis, L., Draper, R.K., Chien, Y.-h., 1994. The nature of major histocompatibility complex recognition by $\gamma\delta$ T cells. *Cell* 76, 29-37.
- Scott, P., Trinchieri, G., 1995. The role of natural killer cells in host—parasite interactions. *Current Opinion in Immunology* 7, 34-40.
- Shi, S.-R., Key, M.E., Kalra, K.L., 1991. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 39, 741-748.
- Shirkey, T., Siggers, R., Goldade, B., Marshall, J., Drew, M., Laarveld, B., Van Kessel, A., 2006. Effects of commensal bacteria on intestinal morphology and expression of proinflammatory cytokines in the gnotobiotic pig. *Experimental Biology and Medicine* 231, 1333-1345.
- Shortt, C., 1999. The probiotic century: historical and current perspectives. *Trends in Food Science & Technology* 10, 411-417.
- Simon, O., 2005. Mikroorganismen als Futterzusatzstoffe: Probiotika - Wirksamkeit und Wirkungsweise BOKU Symposium Tierernährung. PI Christian Plitzner, Wien, pp. 10-16.
- Simon, O., Vahjen, W., Scharek, L., 2005. Micro-organisms as feed additives-probiotics. *Advances in pork Production* 16, 161-167.
- Šinkora, J., Rehakova, Z., Šinkora, M., Cukrowska, B., Tlaskalova-Hogenova, H., 2002. Early development of immune system in pigs. *Vet Immunol Immunopathol* 87, 301-306.
- Šinkora, M., Šinkora, J., Reháková, Z., Butler, J.E., 2000. Early ontogeny of thymocytes in pigs: sequential colonization of the thymus by T cell progenitors. *The Journal of Immunology* 165, 1832-1839.

- Šinkora, M., Šinkora, J., Rehakova, Z., Splichal, I., Yang, H., Parkhouse, R., Trebichavsk, I., 1998. Prenatal ontogeny of lymphocyte subpopulations in pigs. *Immunology* 95, 595.
- Sirén, J., Sareneva, T., Pirhonen, J., Strengell, M., Veckman, V., Julkunen, I., Matikainen, S., 2004. Cytokine and contact-dependent activation of natural killer cells by influenza A or Sendai virus-infected macrophages. *Journal of general virology* 85, 2357-2364.
- Slavuljica, I., Krmpotić, A., Jonjić, S., 2011. Manipulation of NKG2D ligands by cytomegaloviruses: impact on innate and adaptive immune response. *Front Immunol* 2.
- Sneath, P.H., 1986. Endospore-forming Gram-positive rods and cocci. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 1104-1207.
- Socol, C.R., Vandenberghe, L.P.d.S., Spier, M.R., Medeiros, A.B.P., Yamaguishi, C.T., Lindner, J.D.D., Pandey, A., Thomaz-Socol, V., 2010. The potential of probiotics: a review. *Food Technology and Biotechnology* 48, 413-434.
- Solano-Aguilar, G.I., Vengroski, K.G., Beshah, E., Douglass, L.W., Lunney, J.K., 2001. Characterization of lymphocyte subsets from mucosal tissues in neonatal swine. *Developmental & Comparative Immunology* 25, 245-263.
- Solis Pereyra, B., Lemonnier, D., 1993. Induction of human cytokines by bacteria used in dairy foods. *Nutrition Research* 13, 1127-1140.
- Song, H., Kim, K.-E., Hur, D., Lim, J.-S., Yang, Y., Cho, B.J., Kim, C.-h., Kim, T., Bang, S., Lee, W.J., 2008. IL-18 enhances ULBP2 expression through the MAPK pathway in leukemia cells. *Immunol Lett* 120, 103-107.
- Spits, H., Paliard, X., Vandekerckhove, Y., Van Vlasselaer, P., De Vries, J., 1991. Functional and phenotypic differences between CD4+ and CD4-T cell receptor-gamma delta clones from peripheral blood. *The Journal of Immunology* 147, 1180-1188.
- Spreeuwenberg, M., Verdonk, J., Gaskins, H., Verstegen, M., 2001. Small intestine epithelial barrier function is compromised in pigs with low feed intake at weaning. *The Journal of nutrition* 131, 1520-1527.
- Stewart, C.S., 1997. Microorganisms in hindgut fermentors. *Gastrointestinal microbiology* 2, 142-186.
- Stokes, C., Miller, B., Bailey, M., Wilson, A., Bourne, F., 1987. The immune response to dietary antigens and its influence on disease susceptibility in farm animals. *Vet Immunol Immunopathol* 17, 413-423.
- Stokes, C., Newby, T., Miller, B., Bourne, F., 1984. The immunological significance of transient cell mediated immunity to dietary antigens. *Cell mediated immunity. Commission of the European Communities, Luxembourg* 249.
- Stokes, C.R., Bailey, M., Wilson, A.D., 1994. Immunology of the porcine gastrointestinal tract. *Vet Immunol Immunopathol* 43, 143-150.
- Sutherland, C.L., Chalupny, N.J., Schooley, K., VandenBos, T., Kubin, M., Cosman, D., 2002. UL16-binding proteins, novel MHC class I-related proteins, bind to NKG2D and activate multiple signaling pathways in primary NK cells. *The Journal of Immunology* 168, 671-679.
- Takahashi, T., Nakagawa, E., Nara, T., Yajima, T., Kuwata, T., 1998. Effects of orally ingested *Bifidobacterium longum* on the mucosal IgA response of mice to dietary antigens. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 62, 10-15.
- Tamura, A., Soga, H., Yaguchi, K., Yamagishi, M., Toyota, T., Sato, J., Oka, Y., Itoh, T., 2003. Distribution of two types of lymphocytes (intraepithelial and lamina-propria-associated) in the murine small intestine. *Cell Tissue Res* 313, 47-53.
- Tang, M., Laarveld, B., Van Kessel, A., Hamilton, D., Estrada, A., Patience, J., 1999. Effect of segregated early weaning on postweaning small intestinal development in pigs. *J Anim Sci* 77, 3191-3200.

- Tannock, G., Fuller, R., Pedersen, K., 1990. *Lactobacillus* succession in the piglet digestive tract demonstrated by plasmid profiling. *Appl Environ Microbiol* 56, 1310-1316.
- Tannock, G.W., 1997. Probiotic properties of lactic-acid bacteria: plenty of scope for fundamental R & D. *Trends in biotechnology* 15, 270-274.
- Tannock, G.W., 2002. The *bifidobacterial* and *Lactobacillus* microflora of humans. *Clinical reviews in allergy & immunology* 22, 231-253.
- Taras, D., Vahjen, W., Macha, M., Simon, O., 2005. Response of performance characteristics and fecal consistency to long-lasting dietary supplementation with the probiotic strain *Bacillus cereus* var. *toyoi* to sows and piglets. *Arch Anim Nutr* 59, 405-417.
- Thelen, U., Weiß, R., Baljer, G., Pallauf, J., 2004. Einfluss zweier probiotischer Futterzusatzstoffe von *Bacillus cereus* auf Zusammensetzung der Darmflora und zootecnische Parameter beim früh entwöhnten Ferkel. *Tierärztliche Praxis Großtiere* 32, 212-212.
- Thielke, K.H., Hoffmann-Moujahid, A., Weisser, C., Waldkirch, E., Pabst, R., Holtmeier, W., Rothkötter, H.J., 2003. Proliferating intestinal $\gamma\delta$ T cells recirculate rapidly and are a major source of the $\gamma\delta$ T cell pool in the peripheral blood. *Eur J Immunol* 33, 1649-1656.
- Tierschutz-Nutztierhaltungsverordnung, Verordnung zum Schutz landwirtschaftlicher Nutztiere und anderer zur Erzeugung tierischer Produkte gehaltener Tiere bei ihrer Haltung, Bundesministeriums der Justiz und für Verbraucherschutz, 2006.
- Tuchscherer, M., Kanitz, E., Otten, W., Tuchscherer, A., 2002. Effects of prenatal stress on cellular and humoral immune responses in neonatal pigs. *Vet Immunol Immunopathol* 86, 195-203.
- Upshaw, J.L., Arneson, L.N., Schoon, R.A., Dick, C.J., Billadeau, D.D., Leibson, P.J., 2006. NKG2D-mediated signaling requires a DAP10-bound Grb2-Vav1 intermediate and phosphatidylinositol-3-kinase in human natural killer cells. *Nat Immunol* 7, 524-532.
- Upshaw, J.L., Leibson, P.J., 2006. NKG2D-mediated activation of cytotoxic lymphocytes: unique signaling pathways and distinct functional outcomes *Seminars in immunology*. Elsevier, pp. 167-175.
- Ussing, H.H., Zerahn, K., 1951. Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. *Acta Physiol Scand* 23, 110-127.
- van Beers-Schreurs, H.M., Nabuurs, M.J., Vellenga, L., Kalsbeek-van der Valk, H.J., Wensing, T., Breukink, H.J., 1998. Weaning and the weanling diet influence the villous height and crypt depth in the small intestine of pigs and alter the concentrations of short-chain fatty acids in the large intestine and blood. *The Journal of nutrition* 128, 947-953.
- Van Briel, C., 2002. Veränderungen der Anzahl und Verteilung von Plasmazellen und Lymphozytensubpopulationen in der Darmschleimhaut des Schweines nach Applikation von Probiotika. *Tierärztliche Hochschule Hannover*,
- van der Waaij, D., 1989. The ecology of the human intestine and its consequences for overgrowth by pathogens such as *Clostridium difficile*. *Annual Reviews in Microbiology* 43, 69-87.
- Van Dijk, A.J., Niewold, T.A., Margry, R.J.C.F., Van Den Hoven, S.G.C., Nabuurs, M.J.A., Stockhofe-Zurwieden, N., Beynen, A.C., 2001. Small intestinal morphology in weaned piglets fed a diet containing spray-dried porcine plasma. *Research in veterinary science* 71, 17-22.
- Vanbelle, M., Teller, E., Focant, M., 1990. Probiotics in animal nutrition: a review. *Arch Anim Nutr* 40, 543-567.
- Vega-Lopez, M., Bailey, M., Telemo, E., Stokes, C., 1995. Effect of early weaning on the development of immune cells in the pig small intestine. *Vet Immunol Immunopathol* 44, 319-327.

- Vega-Lopez, M.A., Arenas-Contreras, G., Bailey, M., Gonzalez-Pozos, S., Stokes, C.R., Ortega, M.G., Mondragon-Flores, R., 2001. Development of intraepithelial cells in the porcine small intestine. *Dev Immunol* 8, 147-158.
- Ventura, M., Polimeno, L., Amoruso, A., Gatti, F., Annoscia, E., Marinaro, M., Di Leo, E., Matino, M., Buquicchio, R., Bonini, S., 2006. Intestinal permeability in patients with adverse reactions to food. *Digestive and liver disease* 38, 732-736.
- Verordnung (EG) Nr. 1831/2003, Zusatzstoffe zur Verwendung in der Tierernährung, Europäisches Parlament und Rat der Europäischen Union, Amtsblatt der Europäischen Union, 2003, 29-43.
- Villodre Tudela, C., Boudry, C., Stumpff, F., Aschenbach, J.R., Vahjen, W., Zentek, J., Pieper, R., 2015. Down-regulation of monocarboxylate transporter 1 (MCT1) gene expression in the colon of piglets is linked to bacterial protein fermentation and pro-inflammatory cytokine-mediated signalling. *British Journal of Nutrition* 113, 610-617.
- Vitini, E., Alvarez, S., Medina, M., Medici, M., De Budeguer, M., Perdigon, G., 2000. Gut mucosal immunostimulation by lactic acid bacteria. *Biocell: official journal of the Sociudades Latinoamericanas de Microscopia Electronica... et. al* 24, 223-232.
- Vollmar, A., Zündorf, I., Dingermann, T., 2013. *Immunologie: Grundlagen und Wirkstoffe; mit 216 Tabellen.* Wiss. Verlag-Ges.
- Watson, C., Rowland, M., Warhurst, G., 2001. Functional modeling of tight junctions in intestinal cell monolayers using polyethylene glycol oligomers. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 281, C388-C397.
- Wegener, A.-M.K., Hou, X., Dietrich, J., Geisler, C., 1995. Distinct domains of the CD3- γ chain are involved in surface expression and function of the T cell antigen receptor. *Journal of Biological Chemistry* 270, 4675-4680.
- Weinberg, E.D., 1997. The *Lactobacillus* anomaly: total iron abstinence. *Perspectives in biology and medicine* 40, 578-583.
- Weinreich, M.A., Hogquist, K.A., 2008. Thymic emigration: when and how T cells leave home. *The Journal of Immunology* 181, 2265-2270.
- Weintraub, B.C., Jackson, M.R., Hedrick, S.M., 1994. Gamma delta T cells can recognize nonclassical MHC in the absence of conventional antigenic peptides. *The Journal of Immunology* 153, 3051-3058.
- Wells, J.M., 2011. Immunomodulatory mechanisms of lactobacilli. *Microb Cell Fact* 10 Suppl 1, S17.
- White, F., Wenham, G., Sharman, G.A.M., Jones, A.S., Rattray, E.A.S., McDonald, I., 1969. Stomach Function in Relation to Scour Syndrome in Piglet. *British Journal of Nutrition* 23, 847-&.
- Whittemore, C., Green, D., 2001. Growth of the young weaned pig. *The Weaner Pig—Nutrition and Management.* CAB International, Wallingford, UK, 1-15.
- Wijten, P.J., van der Meulen, J., Verstegen, M.W., 2011. Intestinal barrier function and absorption in pigs after weaning: a review. *British Journal of Nutrition* 105, 967-981.
- Williams, I., 2003. 2 Growth of the weaned pig. *Weaning the pig: concepts and consequences*, 17.
- Williams, L.D., Burdock, G.A., Jimenez, G., Castillo, M., 2009. Literature review on the safety of Toyocerin, a non-toxicogenic and non-pathogenic *Bacillus cereus var. toyoi* preparation. *Regulatory toxicology and pharmacology* 55, 236-246.
- Wilson, A., Stokes, C., Bourne, F., 1986. Responses of intraepithelial lymphocytes to T-cell mitogens: a comparison between murine and porcine responses. *Immunology* 58, 621.
- Wilson, K.H., Perini, F., 1988. Role of Competition for Nutrients in Suppression of *Clostridium difficile* by the Colonic Microflora. *Infect Immun* 56, 2610-2614.
- Wilson, M.J., Lindquist, J.A., Trowsdale, J., 2000. DAP12 and KAP10 (DAP10)-novel transmembrane adapter proteins of the CD3 ζ family. *Immunologic research* 22, 21-42.

- Winckler, C., 1997. In-vitro-Untersuchungen zur Wirkung von *Saccharomyces boulardii*, *Bacillus cereus* var. *caron* und *Bacillus cereus* var. *toyoi* auf die intestinale Barriere beim Schwein. Cuvillier.
- Winckler, C., Schröder, B., Breves, G., 1998. Effects of *Saccharomyces boulardii*, *Bacillus cereus* var. *caron* and *Bacillus cereus* var. *toyoi* on epithelial transport functions in pig jejunum. Zeitschrift für Gastroenterologie 36, 30-37.
- Worobec, E.K., Duncan, I.J.H., Widowski, T.M., 1999. The effects of weaning at 7, 14 and 28 days on piglet behaviour. Applied Animal Behaviour Science 62, 173-182.
- Wu, J., Cherwinski, H., Spies, T., Phillips, J.H., Lanier, L.L., 2000. DAP10 and DAP12 form distinct, but functionally cooperative, receptor complexes in natural killer cells. J Exp Med 192, 1059-1068.
- Wu, J., Song, Y., Bakker, A.B., Bauer, S., Spies, T., Lanier, L.L., Phillips, J.H., 1999. An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10. Science 285, 730-732.
- Yang, H., Parkhouse, R., 1996. Phenotypic classification of porcine lymphocyte subpopulations in blood and lymphoid tissues. Immunology 89, 76-83.
- Yang, H., Parkhouse, R., 1997. Differential expression of CD8 epitopes amongst porcine CD8-positive functional lymphocyte subsets. Immunology 92, 45.
- Ye, D., Ma, I., Ma, T.Y., 2006. Molecular mechanism of tumor necrosis factor- α modulation of intestinal epithelial tight junction barrier. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology 290, G496-G504.
- Yildirim, Z., Johnson, M.G., 1998. Characterization and antimicrobial spectrum of bifidocin B, a bacteriocin produced by *Bifidobacterium bifidum* NCFB 1454. Journal of Food Protection 61, 47-51.
- Yildirim, Z., Winters, D., Johnson, M., 1999. Purification, amino acid sequence and mode of action of bifidocin B produced by *Bifidobacterium bifidum* NCFB 1454. J Appl Microbiol 86, 45-54.
- Yim, D., Jie, H.-B., Sotiriadis, J., Kim, Y.-S., Kim, K.-S., Rothschild, M.F., Lanier, L.L., Kim, Y.B., 2001. Molecular cloning and characterization of pig immunoreceptor DAP10 and NKG2D. Immunogenetics 53, 243-249.
- Zabielski, R., Godlewski, M., Guilloteau, P., 2008. Control of development of gastrointestinal system in neonates. Journal of physiology and pharmacology 59, 35-54.
- Zacharof, M., Lovitt, R., 2012. Bacteriocins produced by lactic acid bacteria a review article. APCBEE Procedia 2, 50-56.
- Zhao, Y., Qin, G., Sun, Z., Zhang, X., Bao, N., Wang, T., Zhang, B., Zhang, B., Zhu, D., Sun, L., 2008. Disappearance of immunoreactive glycinin and β -conglycinin in the digestive tract of piglets. Arch Anim Nutr 62, 322-330.
- Zitvogel, L., 2002. Dendritic and natural killer cells cooperate in the control/switch of innate immunity. J Exp Med 195, F9-F14.
- Zolotarevsky, Y., Hecht, G., Koutsouris, A., Gonzalez, D.E., Quan, C., Tom, J., Mrsny, R.J., Turner, J.R., 2002. A membrane-permeant peptide that inhibits MLC kinase restores barrier function in in vitro models of intestinal disease. Gastroenterology 123, 163-172.
- Zuckermann, F.A., Peavey, C., Schnitzlein, W.M., Schabacker, D., Husmann, R.J., Yang, H., Saalmüller, A., Lunney, J.K., 1998a. Definition of the specificity of monoclonal antibodies against porcine CD45 and CD45R: report from the CD45/CD45R and CD44 subgroup of the Second International Swine CD Workshop. Vet Immunol Immunopathol 60, 367-387.
- Zuckermann, F.A., Pescovitz, M.D., Aasted, B., Dominguez, J., Trebichavsky, I., Novikov, B., Valpotic, I., Nielsen, J., Arn, S., Sachs, D.H., Lunney, J.K., Boyd, P., Walker, J., Lee, R., Davis, W.C., Barbosa, I.R., Saalmüller, A., 1998b. Report on the analyses of mAb reactive with porcine CD8 for the second international swine CD workshop. Vet Immunol Immunopathol 60, 291-303.

- Zuckermann, F.A., Schnitzlein, W.M., Thacker, E., Sinkora, J., Haverson, K., 2001. Characterization of monoclonal antibodies assigned to the CD45 subgroup of the Third International Swine CD Workshop. *Vet Immunol Immunopathol* 80, 165-174.
- Zuercher, A.W., Weiss, M., Holvoet, S., Moser, M., Moussu, H., Van Overtvelt, L., Horiot, S., Moingeon, P., Nutten, S., Prioult, G., 2011. *Lactococcus lactis* NCC 2287 alleviates food allergic manifestations in sensitized mice by reducing IL-13 expression specifically in the ileum. *Clinical and Developmental Immunology* 2012.
- Zufferey, C., Erhart, D., Saurer, L., Mueller, C., 2009. Production of interferon- γ by activated T-cell receptor- $\alpha\beta$ CD8 $\alpha\beta$ intestinal intraepithelial lymphocytes is required and sufficient for disruption of the intestinal barrier integrity. *Immunology* 128, 351-359.
- Zyrek, A.A., Cichon, C., Helms, S., Enders, C., Sonnenborn, U., Schmidt, M.A., 2007. Molecular mechanisms underlying the probiotic effects of *Escherichia coli* Nissle 1917 involve ZO-2 and PKC ζ redistribution resulting in tight junction and epithelial barrier repair. *Cellular microbiology* 9, 804-816.

Publikationsverzeichnis

Altmeyer, S.; Kröger, S.; Vahjen, W.; Zentek, J.; Scharek-Tedin, L. (2014):

Impact of a probiotic *Bacillus cereus* strain on the jejunal epithelial barrier and on the NKG2D expressing immune cells during the weaning phase of piglets.

Veterinary immunology and immunopathology; 161(1/2), S. 57–65

Altmeyer, S.; Zentek, J.; Vahjen, W.; Scharek-Tedin, L. (Manuskript):

The expression of NKG2D on porcine IEL and its possible relation to the adaptive intestinal immune system

Veterinary immunology and immunopathology, eingereicht

Altmeyer, S.; Zentek, J.; Scharek-Tedin, L. (2015):

The impact of *Bacillus cereus* var. *Toyoi* on intraepithelial immune cell populations and NKG2D expression on jejunal epithelium in piglets.

In: Proceedings of the 13th Digestive Physiology in Pigs Symposium

Altmeyer, S.; Zentek, J.; Scharek-Tedin, L. (2015):

Expression of the natural killer cell receptor NKG2D on jejunal epithelium and the impact of *Bacillus cereus* var. *Toyoi* on the absolute cell count of intraepithelial immune cell populations in piglets.

In: Proceedings of the Society of Nutrition Physiology

Altmeyer, S.; Kröger, S.; Zentek, J.; Scharek-Tedin, L. (2014):

Influence of *Bacillus cereus* var. *Toyoi* on the jejunal epithelium during the weaning phase of piglets.

In: Proceedings of the 6th European Spores Conference

Altmeyer, S.; Kröger, S.; Zentek, J.; Scharek-Tedin, L. (2013):

Impact of *Bacillus cereus* var. *Toyoi* on intestinal barrier function and frequencies of intraepithelial immune cell populations in piglets.

In: Proceedings of the Society of Nutrition Physiology

Danksagung

Ich möchte mich hiermit herzlich bei allen Menschen bedanken, die zur erfolgreichen Umsetzung dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. Jürgen Zentek danke ich für die Möglichkeit die vorliegende Arbeit am Institut für Tierernährung anfertigen zu können. Vielen Dank für die vielen Hinweise und Ideen zur Verbesserung dieser Arbeit.

Ich möchte mich bei Dr. Lydia Tedin dafür bedanken, dass sie mir die Möglichkeit geboten hat dieses interessante Thema zu bearbeiten. Weiterhin danke ich ihr für ihre Betreuung und fortwährende Unterstützung während meiner Doktorarbeit.

Für die Bereitstellung der Forschungsmittel möchte ich mich bei der Deutschen Förderungsgemeinschaft (DfG) bedanken.

Bei Dr. Wilfried Vahjen möchte ich mich für seine stetige Hilfsbereitschaft und Beratung bei allen erdenklichen Problemen bedanken.

Prof. Dr. Klaus Männer, Dr. Robert Pieper, Gerd-Rainer Jokiel, sowie allen Tierpflegern danke ich ganz herzlich für die Hilfe bei der Planung und Durchführung meiner Tierversuche.

Vielen Dank an Dr. Susan Kröger für die Hilfe und Geduld bei den Messungen mit der Ussing-Kammer.

Weiterhin möchte ich mich für die hervorragende technische Assistenz und stetige Hilfsbereitschaft von Marita Eitinger, Katharina Topp, Luisa Ebersbach, Anett Kriesten und Kirstie Fiedler bedanken. Vielen Dank insbesondere an Petra Huck für die vielen Stunden in der Immunologie.

Darüber hinaus möchte ich mich bei allen Mitarbeitern und Doktoranden des Instituts für Tierernährung bedanken, von denen einige in den letzten Jahren zu guten Freunden geworden sind. Vielen Dank für freundliche Aufnahme, die Hilfsbereitschaft und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Ich danke meiner Familie von ganzen Herzen für ihr großes Vertrauen und die unermüdliche Unterstützung, auf die ich immer zählen kann. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und nur unter der Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Die Arbeit lag bisher in gleicher oder ähnlicher Form keiner anderen Prüfungsbehörde vor.

Berlin, den 29.07.2016

Sara Altmeyer

Publikation



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Veterinary Immunology and Immunopathology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vetimm

Research paper

Impact of a probiotic *Bacillus cereus* strain on the jejunal epithelial barrier and on the NKG2D expressing immune cells during the weaning phase of piglets



Sara Altmeyer*, Susan Kröger, Wilfried Vahjen,
Jürgen Zentek, Lydia Scharek-Tedin

Institute of Animal Nutrition, Department of Veterinary Medicine, Freie Universität Berlin, Königin-Luise-Strasse 49,
D-14195 Berlin, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 December 2013

Received in revised form 19 June 2014

Accepted 1 July 2014

Keywords:

Epithelial cell
Flow cytometry
Mucosal Immunity
Swine
T-cell

ABSTRACT

In a feeding experiment, the probiotic *Bacillus cereus* var. Toyoi was fed to sows and piglets in order to test whether it influences the stress response of enterocytes, thereby causing intestinal immune activation, possibly accompanied by an impairment of the epithelial integrity. The impact of *B. cereus* on the piglets' intestinal enterocytes (EC) and on the communicating intraepithelial lymphocytes (IEL) was investigated during the weaning phase where significant immunological changes might be expected. The expression of the stress-induced MHC class I-related molecule 2 (MIC2) and the UL16 binding protein (ULBP) was measured in jejunal EC and the frequencies of the main present IEL populations in the jejunum were monitored. To find out which of the IEL populations can be activated by the stress-induced molecules the sorted IEL were tested for the expression of the activating natural killer receptor 2D (NKG2D). The piglets fed with *B. cereus* showed an impaired intestinal barrier function shortly after weaning. However, a significant impact on the expression of stress-induced molecules was not observed. The mRNA expression of NKG2D was confirmed in intraepithelial CD5+ $\gamma\delta$ T cells. The ratio of IEL (CD45+) to EC was lower in the *B. cereus* treated group, which could be explained by lower frequencies of CD8 $\alpha\beta$ + T cells in the jejunal epithelium ($p \leq 0.005$ for ages 32 and 34). Although a consistently increased expression of stress-induced MHC class I-related molecules was not found, this study suggests a negative impact of *B. cereus* on the intestinal barrier function and supports immune-modulating properties of the probiotic feed supplement.

© 2014 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

As of January 2006, antibiotics are no longer allowed to be used as growth promoters in animal feed in the European Union (European Commission, IP/05/1687). This has resulted in an increased interest in alternative growth- and health promoting additives for use in livestock. Probiotics

have been reported to show positive effects on the daily weight gain, feed intake and conversion as well as a reduction in rates of diarrhea and mortality in piglet rearing (Gedek et al., 1993; Kirchgessner et al., 1993; Kyriakis et al., 1999; Alexopoulos et al., 2001; Chang et al., 2001; Taras et al., 2005; Scharek et al., 2007; Schierack et al., 2007). There are various bacterial and yeast species that have been used as probiotics in pig nutrition, many of which are members of the indigenous intestinal microbiota of the host (Jin et al., 2000; De Champs et al., 2003; Quigley, 2010). Commensal bacteria colonize the intestinal tract and may

* Corresponding author. Tel.: +49 30 838 51943; fax: +49 30 838 55938.
E-mail address: Sara.Altmeyer@fu-berlin.de (S. Altmeyer).

compete with pathogenic bacteria (Massi et al., 2004; Cho, 2011). One of the products authorized for use as feed supplements for sows and piglets in the EU is *Bacillus cereus* var. Toyoi. It is not a member of the natural porcine gut microbiota, but a common gram-positive endospore-forming soil bacterium (Sneath, 1986). The spores of *B. cereus* var. Toyoi germinate in the stomach and the small intestine of weaned piglets (Jadamus et al., 2001). *B. cereus* var. Toyoi has been allowed for use as a feed additive in pig farming, based on several studies assigning probiotic characteristics to this *Bacillus* strain (NCIMB 40112; ToyoCerin®). Since *Bacillus* species have been shown to be immunogenic in a murine model marked by enhanced expression of the cytokines TNF- α and IFN- γ (Braat et al., 2004), modulation of the pig's immune system was proposed as one of the probiotic working mechanisms. Furthermore, immunogenic properties have been described in trials with pigs. After feed supplementation with *Bacillus cereus* var. Toyoi increased frequencies of CD8+ lymphocytes in the jejunal epithelium have been observed in piglets (Scharek et al., 2007), as well as enhanced systemic immune responses (Schierack et al., 2007). *B. cereus* var. Toyoi, like almost all species of the *Bacillus* group, produces a hemolysin with lytic activity for epithelial cells (Beecher et al., 1995; Prüss et al., 1999; EFSA, 2012), and in reaction to stress signaling by enterocytes, an activation of the intraepithelial immune cells may occur.

Enterocytes are in intimate contact with diverse intraepithelial lymphocytes (IEL), including natural killer (NK) cells and heterogeneous populations of T cells. Activation of intraepithelial T cells may lead to an attenuated barrier function (Zufferey et al., 2009).

During times of cellular stress, e.g. in case of an infection, the EC up-regulate stress-induced MHC class I-related molecules (MICs) which are ligands for the natural killer receptor NKG2D, in humans expressed on the surface of T cells and natural killer (NK) cells (Bauer et al., 1999; Tieng et al., 2002). NKG2D is an activating killer receptor. In humans, engagement of NKG2D activates the cytolytic responses of $\gamma\delta$ T cells and NK cells against cells expressing the stress-induced MICs (Bauer et al., 1999). At the surface of CD8 $\alpha\beta$ + T cells, NKG2D acts as a costimulator of T cell receptor-mediated effector functions and up-regulates antigen-specific T cell-mediated cytotoxicity (Groh et al., 2001). In swine, two MHC class I-related molecules (MICs) have been identified. Both MIC2 and UL16 binding protein (ULBP) are ligands for the NK cell receptor NKG2D (Chardon et al., 2001; Garcia-Borges et al., 2005). Investigations with porcine blood revealed that the mRNA for the activating killer receptor NKG2D is present in circulating NK cells (Denyer et al., 2006). Although frequencies of $\gamma\delta$ T cells are relatively high in porcine blood and even higher in the blood of piglets (Yang and Parkhouse, 1996), the expression of NKG2D has neither been confirmed in $\gamma\delta$ T cells, nor in any other circulating T cell population of the pig.

The feeding experiment described in this study was carried out with *B. cereus* var. Toyoi (in the following referred to as *B. cereus*) to investigate the impact of the probiotic on the jejunal epithelium, with the hypothesis that the probiotic *Bacillus* stresses enterocytes and thereby leads to an intestinal immune activation and attenuation of the intestinal barrier. The impact of *B. cereus* on the jejunal barrier

function and on the communication between enterocytes (EC) and intraepithelial lymphocytes (IEL) was investigated during the weaning period of piglets starting at the age of 28 days. To monitor the impact of *B. cereus* on the piglets' jejunal epithelium, the barrier function of the jejunum was investigated via HRP-flux measurements in Ussing Chambers and the mRNA expression of the stress molecules MIC2 and ULBP in jejunal tissue in response to *B. cereus* was determined. The frequencies of the main lymphocyte populations in the jejunal epithelium were analyzed by FACS analysis, and were further screened for the expression of NKG2D to determine which immune cells might be involved in communication with stressed EC, and whether the frequencies of these cell populations are modulated during the feeding experiment.

2. Materials and methods

2.1. Animal study

All experimental procedures were approved by the state animal welfare committee (LAGeSo, Germany; approval No. 0284/11).

A group of 40 piglets from eight sows was used in this study. The purebred Landrace sows, bred with Landrace boars, were purchased from a commercial breeding company (Bundeshybridzuchtprogramm, BHZP, Dahlenburg-Ellringen, Germany). Sows were immunized against porcine circovirus type 2, Erysipelas, and porcine parvovirus, the piglets stayed unvaccinated. The sows and piglets from the probiotic group were provided with the feed additive *B. cereus* var. Toyoi (ToyoCerin®, Lohmann Animal Health, Cuxhaven, Germany). Sows in the probiotic group ($n=4$) received 3.5×10^8 cfu/g *B. cereus* var. Toyoi beginning from 28 days *ante partum* (a.p.) until weaning of piglets. Piglets in the probiotic group ($n=20$) received *B. cereus* var. Toyoi supplemented creep feed starting at day 14 *post partum* (1.5×10^9 cfu/g). The remaining four sows and 20 piglets served as the control group for the study. The excipient (CaCO₃) was added to the feed of the sows and piglets of the control group without the probiotic additive. To prevent cross contamination, sows and piglets of probiotic group were kept in separate housing facilities of identical construction and environmental conditions throughout the feeding trial. Piglets were weaned on day 28 *post partum* by transfer of the sows to different stalls. The respective litters of weaned piglets remained together in the same stalls for the duration of the study. Five piglets per group, randomly assigned, balancing for gender litter and bodyweight, were euthanized on the days 17, 32, 34, and 39 and intestinal tissue samples were taken. The sampling of piglets from both groups occurred over four weeks, since the eight sows littered within a time period of 4 days, and the piglets were born and weaned at different time points.

2.2. Sampling

Piglets were sedated with 20 mg/kg bodyweight (BW) of ketamine hydrochloride (Ursotamin, Serumwerk Bernburg AG, Germany) and 2 mg/kg BW of azaperone (Stresnil,

Table 1

List of antibodies used in the study for staining of intraepithelial lymphocytes.

Specificity	Clone	Isotype	Cytochrome	Distributor
CD2	MSA4	IgG2a		VMRD, Pullman, WA, USA
CD5	9G12	IgG1		VMRD, Pullman, WA, USA
CD8 α	76-2-11	IgG2a	PE	Southern Biotech, Birmingham, USA
CD8 β	PG164A	IgG2a		VMRD, Pullman, WA, USA
TcR1-N4	PGLBL22A	IgG1		VMRD, Pullman, WA, USA
CD3	PPT3	IgG1	PE	Southern Biotech, Birmingham, USA
CD16	G7	IgG1		Acris, Herford, Germany
CD11R1	MIL-4	IgG1		Biozol, Eching, Germany
CD45	MAC323	IgG2a		Biozol, Eching, Germany
Pooled antisera from goat		IgG2a	PE	Southern Biotech, Birmingham, USA
Pooled antisera from goat		IgG1	FITC	Southern Biotech, Birmingham, USA
Pooled antisera from goat		IgG1	PE	Southern Biotech, Birmingham, USA
Pooled antisera from goat		IgG2b	FITC	Southern Biotech, Birmingham, USA

Notes: CD, cluster of differentiation; IgG, immunoglobulin G; PE, phycoerythrin; FITC, fluorescein isothiocyanate.

Jansen-Cilag, Neuss, Germany). Blood was taken by heart puncture (7.5 mL/animal) and was collected in heparinized tubes (16 I.E. Heparin/mL blood). Subsequently, the piglets were euthanized by injection of Embutramide (T61, Intervet, Unterschleißheim, Germany) and the abdominal cavity was opened. The intestinal tract was removed and the appropriate sections of the intestine were isolated with clamps.

2.3. Tissue samples

Starting from the middle of the jejunum four tissue samples were taken. The first 2 cm were snap-frozen immediately in liquid nitrogen and stored at -80°C in RNAlater-ICE[®] (Ambion Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) for a maximum of six months before expression analysis of stress molecules via reverse transcription RT-qPCR. The subsequent distal 15 cm toward the ileum was used to gain cells for flow cytometry and magnetic cell sorting and was transferred to PBS Buffer (Phosphate buffered saline, Biochrom AG, Berlin, Germany), and the third distal 15 cm section was used for the Ussing Chamber measurements in post-weaning piglets (on days 32, 34 and 39) and were transferred to a modified ice-cooled, oxygenated (95% O₂, 5% CO₂) Krebs-Henseleit Buffer (mmol/L Aqua dest.): CaCl₂·2 H₂O 1.5; MgCl₂·6 H₂O 1.2; Na₂HPO₄·12 H₂O 2.4; NaH₂PO₄·H₂O 0.6; NaHCO₃ 25; KCl 5; NaCl 115; glucose 10; mannitol 10; pH 7.4. The tissue samples did not include Peyer's patches.

2.4. Antibodies

The antibodies used for flow cytometry are given in Table 1.

2.5. Isolation of intraepithelial lymphocytes (IEL) and flow cytometry

The isolation of intraepithelial lymphocytes (IEL) from intestinal tissue samples was based on the method described by Solano-Aguilar et al. (2000) with modifications detailed in Scharek-Tedin et al. (2013). Flow cytometry was performed with a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany). To identify

the intraepithelial lymphocytes (IEL) the fluorescent CD45+ cells were pictured in a morphological dot plot, showing Forward Scatter (FWS) against Sideward Scatter (SSC). A region was created including all fluorescent cells with similar size and granularity. The same region was afterwards used as a lymphocyte gate. The percentages of the various lymphocyte sub-populations were detected within this gate as percentage from all lymphocytes.

To analyze the percentage of immune cells within the whole cell mixture no gate was used. A forward scatter-threshold was set to exclude cell debris from the analysis. The percentage of CD45+ immune cells from all cells was calculated.

2.6. Magnetic cell sorting (MACS)

IEL populations showing different phenotypes were purified using bead-labeled secondary antibodies targeted against the isotypes of the first antibody (Anti-Mouse IgG1 MicroBeads, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). The cells were labeled and purified using MACS Columns (MS) and MACS Separators (MiniMACS) from Miltenyi Biotec following the manufacturer's instructions. For depletion purposes, negative fractions of isolated cells were again labeled with corresponding secondary antibodies and purified in a fresh MACS Column. The purity of the sorted cell population was controlled via flow cytometry.

2.7. Flux rate measurements (HRP-flux)

To analyze the intestinal barrier function on jejunal epithelial tissue a simplified application of the Ussing Chamber method was used (Ussing and Zerahn, 1951). The tissue samples were first stripped of the serosal and muscle layers and mounted between two Chambers. To determine the paracellular flux, a total concentration of 0.4 mg/mL horseradish peroxidase (HRP) was applied to the Chamber on the mucosal site of the tissue. For each animal three Ussing Chambers were used. After 30, 60, 90 and 120 min samples were taken from the Chamber on the former serosal, non-luminal side and frozen at -80°C . The concentration of HRP in the chamber on the non-luminal side represents the permeability of the tissue (Wijten et al., 2011). HRP concentrations were determined with the

Table 2

List of the primers used in this study.

Target	Sequence (5' to 3')	AT [°C]	Reference
Mic2	GCACAGACAACCTCACATGC (20) CATTCCCATCAGGCAGGACA (20)	55	This study
ULBP16	GACACACGAGTGGATCCTGG (20) AGGAAGGTGGTCACAATGGC (20)	60	This study
NKG2D	GCTCCAGAGCCAAGCTTCTT (20) GAACCATCTCCCACTGCCA (20)	60	This study
RPL19	GCTTGCTCCAGTGTCTC (19) GCGTTGGCGATTTCATTAG (19)	60	Pieper et al. (2012)
RPLa13	CCATCTCAAGGTGTTCTGA (18) GGATCTGGCCTTCTCCTTC (20)	60	This study
Bet2g	CCCCGAAGGTTTCAGTTTAC (20) CGGCAGCTATACTGATCCAC (20)	60	Martin et al. (2013)

Notes: AT, annealing temperature; MIC2, MHC class I-related molecule 2; ULBP16, UL16 binding protein; NKG2D, natural killer receptor 2D; RPL19, 60S ribosomal protein L19; RPL13, 60S ribosomal protein L13; Bet2g, beta-2 microglobulin.

QuantaBlu Fluorogenic Peroxidase Substrate Kit (Thermo Scientific, Rockford, USA). After the reaction of the samples with the fluorogenic substrate, the emission was measured with the Tecan infinite 200 plate reader (Tecan, Männedorf, Switzerland).

2.8. Gene expression

Total RNA was extracted from 30 mg of jejunal tissue using the NucleoSpinTM RNA II kit (Marchery-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Germany) and were treated with the provided rDNase for 15 min on room temperature to remove genomic DNA. The mRNA quality and quantity were determined in a Bioanalyzer (Agilent 2100, Agilent, Waldbronn, Germany) and a minimum RIN of 6.5 was premised for further analysis. The samples were diluted to 100 ng/ μ l in nuclease-free water for gene expression analysis. The expression of the following genes was analyzed: MHC class I-related proteins MIC2 and UL16 binding protein (ULBP) and natural killer receptor G2D (NKG2D). The expression of the reference genes 60S ribosomal protein L19 (RPL19), 60S ribosomal protein L13 (RPLa13) and beta-2 microglobulin (bet2g) was used for data normalization. The Primers were designed using the NCBI online primer design tool (Primer-BLAST: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) and based on published sequences of the target genes (Table 2).

RT-qPCR was performed using the one-step QRT-PCR master mix kit (Brilliant[®]II SYBR[®]Green, Agilent Technologies, USA). Each reaction was composed of 2 μ l of the diluted template RNA (100 ng/ μ l) and 23 μ l master mix (10.5 μ l nuclease free water, 12.5 μ l Brilliant[®]II SYBR[®]Green master mix/Low ROX SYBR[®]II RT-qPCR reaction buffer, 0.5 μ l of each gene-specific forward and reverse primer (10 μ mol/L, Table 2) and 1.0 μ l Reverse Transcriptase/RNase block enzyme mixture). The RT-qPCRs were performed on Stratagene MX3000p and MX3005p cyclers in clear optical tube strips (CAT 401428; Stratagene, Agilent Technologies, Amsterdam, The Netherlands). The following settings were used as general cycling conditions: one cycle of reverse transcription for cDNA synthesis at 50 °C for 30 min, one cycle of denaturation at 95 °C for 15 min, followed by 40 cycles with an annealing time of 30 s at the specific annealing temperature for each primer (Table 2)

and a 30 s extension at 72 °C. After each run the PCR efficiency and melting curves were analyzed to ensure the consistent amplification of single PCR products. For the generation of standard curves, 12 RNA samples were pooled and diluted into 5 standards within a range of 1.25–200 ng/ μ l. For the statistical comparisons the quantification cycle (Cq) values were normalized against those of the reference genes and reported as arbitrary values (Pieper et al., 2012; Martin et al., 2013). Evaluation of the RT-qPCR data was performed with the MxPro QPCR Software (MX3000p v4.10, Stratagene, Agilent Technologies, Amsterdam, The Netherlands).

To describe the expression of NKG2D by the different IEL populations the total sum of NKG2D-RNA expression detected in each rT-PCR run was set equal to 100%. The amount of NKG2D-RNA detected in the different sorted cell populations was then taken as a portion of the total amount of NKG2D-RNA in the particular run. Mean values given in Fig. 2 were calculated from the four rT-PCR attempts and the several isolations of different cell populations.

2.9. Statistical analysis

Statistical evaluation was performed by explorative data analysis and Student's *t*-test for normally distributed data and for the expression of stress factors the non-parametric Mann–Whitney test using the software SPSS (Version 21.0, Chicago, IL, USA). *p*-values below an α -level of 0.05 were considered as significant.

3. Results

3.1. Intestinal barrier function and performance of the piglets

To examine a possible effect of *B. cereus* var. Toyoi supplementation on the jejunal barrier function the HRP flux rates of control and test animals were analyzed at different ages. In Fig. 1 the mean values of piglets ($n=5$) at three different ages are shown. Samples were taken at four different time points from each Ussing Chamber. The permeability of the small intestinal tract for HRP was significantly higher in the piglets fed with *B. cereus* var. Toyoi than in the control piglets at the age of 32 ($p < 0.01$) and

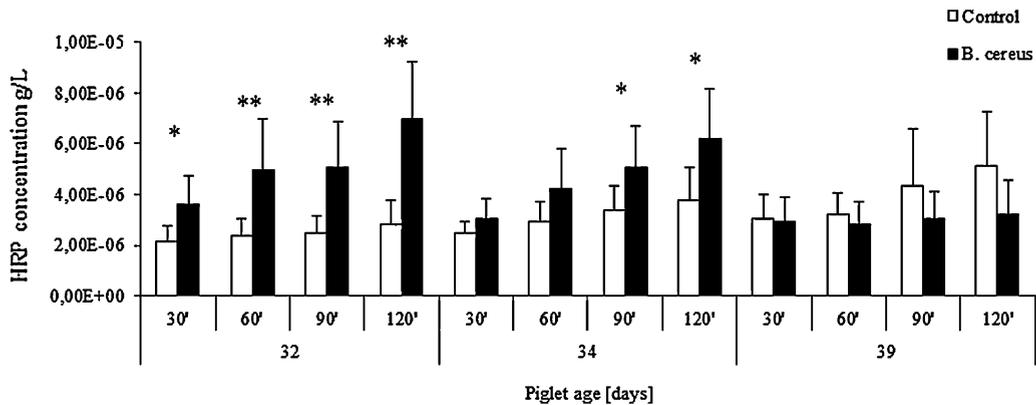


Fig. 1. HRP permeability [$\mu\text{g/L}$] in jejunal tissue samples. *Significant differences between control and test group are indicated by one ($p < 0.05$) or two ($p \leq 0.01$) asterisks. Values are means \pm SEs; $n = 5/\text{group}$.

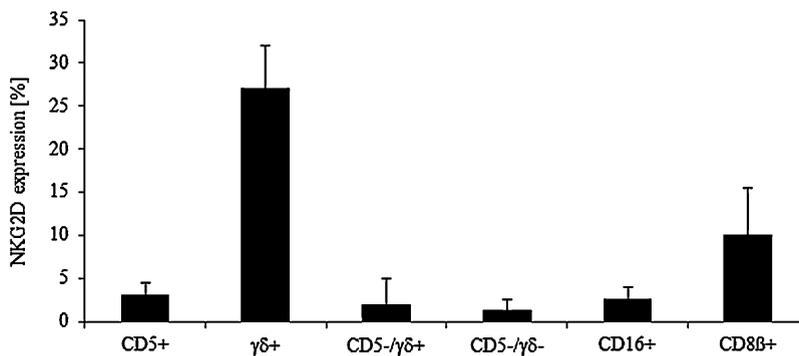


Fig. 2. Expression of NKG2D on different immune cell populations [ng RNA equivalent].

34 ($p < 0.05$) days. In addition, an age-dependent effect in the intestinal barrier function was found in the *B. cereus* var. Toyoi treated piglets beginning on day 39, where the HRP flux was significantly lower compared to the younger animals of the control group ($p < 0.05$; Fig. 1). Significant group differences concerning the piglets' growth rate or accumulation of diarrhea were not found.

3.2. Expression of stress factors

To determine the expression levels of the stress factors ULBP, MIC2 and the NK receptor NKG2D the total RNA was extracted from jejunal tissue samples and Real-time RT-PCRs were performed. In Table 3 the mean values of piglets ($n = 5$) at four different ages are shown. There were no significant differences in RNA expression detectable between

the control and the test group for all analyzed targets. ULBP showed a strongly reduced expression on day 39 in the test group compared to the younger piglets ($p < 0.05$) and the control group (not significant). NKG2D showed the lowest RNA expression on day 17 for both groups.

3.3. Expression of NKG2D on isolated IEL populations

To determine which epithelial lymphocyte populations can express the NK receptor G2D different IEL populations were isolated via magnetic cell sorting (MACS) and screened for mRNA expression of the receptor by RT-qPCR.

As shown in Fig. 2, $\gamma\delta$ T cells showed high expression levels of NKG2D, with a total of 27.08% of this population responsible for the detected NKG2D expression. Representative of cytotoxic T cells in the intestinal epithelium,

Table 3

Expression of the stress factors ULBP, MIC2 and the NK receptor NKG2D ($n = 5$) in jejunal tissue [ng RNA equivalent].

	Control ¹				<i>B. cereus</i> var. Toyoi ¹			
	17 d	32 d	34 d	39 d	17 d	32 d	34 d	39 d
ULBP	134.3 \pm 27.6	204.1 \pm 206.7	96.6 \pm 32.1	142.7 \pm 130.2	380.6 ^B \pm 229.7	152.9 ^B \pm 51.0	293.2 ^B \pm 209.4	15.9 ^A \pm 16.2
MIC2	81.8 ^a \pm 36.3	159.4 ^b \pm 78.3	103.4 ^{ab} \pm 39.6	73.6 ^a \pm 24.5	107.4 \pm 26.5	94.2 \pm 26.6	111.8 \pm 31.6	86.2 \pm 37.2
NKG2D	45.7 ^a \pm 9.4	212.9 ^b \pm 160.2	135.6 ^{ab} \pm 110.2	124.4 ^{ab} \pm 84.1	60.5 ^A \pm 28.6	83.6 ^{A,B} \pm 40.2	79.4 ^{A,B} \pm 20.5	133.4 ^B \pm 63.6

¹ No significant differences between control and test group (Mann-Whitney-U-Test).

a,b,A,B Means with different superscripts differ in the RNA expression rate ($p < 0.05$; Mann-Whitney-U-Test). Values are means \pm SEs; $n = 5/\text{group}$. CD, cluster of differentiation; d, age of piglets [days]; ULBP16, UL16 binding protein; MIC2, MHC class I-related molecule 2; NKG2D, natural killer receptor 2D.

Table 4
Frequency of intraepithelial lymphocytes in jejunal tissue samples [%].

	Control			<i>B. cereus</i> Toyoi		
	32 d	34 d	39 d	32 d	34 d	39 d
CD45+	29.5 ^{B,a,b} ± 17.8	22.5 ^{B,b} ± 6.6	13.6 ^{A,a} ± 2.0	5.3 ^{A,a} ± 3.1	8.8 ^{A,a} ± 4.8	32.1 ^{B,b} ± 4.1
CD3+	49.2 ^{B,a} ± 8.3	68.2 ^b ± 12.4	64.2 ^{a,b} ± 29.7	34.2 ^A ± 7.3	44.3 ± 20.3	51.3 ± 20.9
CD8β+/CD16–	19.6 ^B ± 8.4	27.8 ^B ± 9.2	32.7 ± 10.8	5.5 ^A ± 0.7	9.6 ^A ± 3.6	18.9 ± 9.3
CD8β+/CD16+	4.4 ± 0.8	6.4 ^B ± 1.9	5.6 ± 2.8	3.2 ± 2.1	2.6 ^A ± 1.3	5.6 ± 2.2
CD16+/CD8β–	46.3 ^b ± 8.2	34.6 ^b ± 8.9	21.2 ^a ± 2.0	50.0 ± 9.4	40.8 ± 7.4	43.3 ± 18.3
CD2+/CD5–	54.7 ^{a,b} ± 7.0	46.3 ^b ± 9.1	29.9 ^a ± 9.9	58.1 ± 14.9	50.6 ± 8.6	52.3 ± 20.9
CD2+/CD5+	38.0 ^B ± 7.7	46.4 ± 9.4	51.5 ± 21.3	25.2 ^A ± 9.4	31.2 ± 12.1	41.8 ± 18.5
CD5+/CD2–	1.9 ± 1.3	1.3 ± 1.8	2.6 ± 4.4	4.7 ^b ± 3.2	0.7 ^b ± 0.3	0.3 ^a ± 0.1
CD8α+/γδ–	62.5 ^B ± 7.4	56.2 ^B ± 6.5	45.2 ± 13.7	43.4 ^{A,b} ± 8.1	23.8 ^{A,a} ± 5.9	44.7 ^b ± 5.6
CD8+/γδ+	15.7 ^a ± 4.5	19.1 ^{a,b} ± 4.4	23.0 ^b ± 4.5	11.7 ± 3.6	17.9 ± 13.1	18.8 ± 14.9
CD8–/γδ+	2.3 ± 1.9	2.6 ± 1.1	6.1 ± 5.7	3.4 ^b ± 1.3	4.6 ^b ± 2.3	0.9 ^a ± 0.5
CD11R1+	15.7 ± 14.0	9.5 ± 11.7	2.9 ± 2.1	15.1 ± 9.3	5.5 ± 2.4	2.7 ± 1.7
CD5+/γδ–	27.9 ± 9.8	35.6 ^B ± 9.6	38.9 ± 12.1	15.1 ± 5.9	18.9 ^A ± 4.8	28.1 ± 15.6
CD5+/γδ+	14.8 ± 4.0	14.8 ± 4.6	18.8 ± 5.3	9.7 ± 4.6	13.9 ± 9.4	15.5 ± 12.6
CD5–/γδ+	4.6 ± 1.6	8.6 ± 4.2	11.5 ± 8.1	4.6 ± 5.6	9.0 ± 5.3	3.8 ± 2.8

^{A,B,C} Capital letters compare both groups at the three analyzed ages separately; ^{a,b,c} Small letters compare all ages within both groups separately. Different superscripts indicate significant differences in the frequency of the different IEL phenotypes ($p < 0.05$; Student's *t*-test). Values are means ± SEs; $n = 5$ /group. CD, cluster of differentiation; d, age of piglets [days].

CD8β-positive cells also showed moderately high levels of expression of the activating NK receptor (10.05%).

3.4. Frequency of intraepithelial lymphocytes

In comparison to the control group, piglets fed with *B. cereus* var. Toyoi showed a lower frequency of leukocytes in general at the ages of 32 and 34 days, shown in the quantity of CD45+ cells (Table 4). This effect is reversed when the piglets reach an age of 39 days ($p < 0.001$). Within the lymphocytes the T cell frequency is particularly lower than in the control group, noticeable in the values of CD3+, CD8β+/CD16– and CD2+/CD5+ especially at an age of 32 days. IEL preparations from samples taken on day 17 were not analyzed due to excessive cell death during the preparations.

4. Discussion

The beneficial effects of feed supplementation with probiotic *B. cereus* strains on the health of piglets and other farm animals are generally acknowledged. *Bacillus cereus* var. Toyoi has been reported to contribute to higher weight gain and improved feed conversion ratios (Kirchgessner et al., 1993; Kyriakis et al., 1999; Alexopoulos et al., 2001). Reduction of post-weaning diarrhea (Taras et al., 2005) and lower incidence of diarrhea during a challenge experiment with *Salmonella* Typhimurium have also been observed (Scharek-Tedin et al., 2013). Immunomodulation was proposed as an underlying mechanism for these reported beneficial effects (Scharek et al., 2007; Schierack et al., 2007; Scharek-Tedin et al., 2013). However, while some strains of *B. cereus* are used as probiotics for animals, others cause foodborne illness. *B. cereus* has been reported to produce toxins with lytic activity for epithelial cells, including the hemolysin BL (HBL) (Beecher et al., 1995; Prüss et al., 1999). Analysis of the complete genome sequence of *Bacillus cereus* var. Toyoi showed that this strain harbors the genes coding for both non-haemolytic and haemolytic enterotoxins (EFSA, 2012). The European

Food Safety Authority (EFSA) Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed has suggested that the strain may have the capacity to elaborate functional toxins and, therefore may pose a hazard for those exposed to the organism. In view of this, an effect on the piglets' intestinal epithelium and the associated immune cells appears possible. A moderate production of such toxins could explain the observed immunomodulation during some feeding experiments and may even have positive effects due to immune stimulation. On the other hand, an eventual activation of intraepithelial lymphocytes may also lead to a malfunction of the intestinal barrier, as has been shown in vitro with human intestinal epithelial cells (Zufferey et al., 2009). An impairment of the jejunal barrier function can cause malnutrition (Wada et al., 2013) allows the uptake of noxious substances and impairs oral tolerance (Jacobi and Odle, 2012; Wada et al., 2013).

As expected, during the animal feeding study we detected a significantly higher permeability of the small intestinal tract for HRP in the piglets fed with *B. cereus* than in the control piglets at the age of 32 ($p < 0.01$) and 34 ($p < 0.05$) days post partum (Fig. 1), which appears to support a negative impact of the probiotic bacterium on the epithelial cells of the piglets. During the first week of the weaning process, a compromised intestinal barrier function could be anticipated in both groups of animals. Cell cycle arrest, enhanced apoptosis, and inhibited cell proliferation have been detected via gene expression profiling analysis (Zhu et al., 2014). However, as we did not observe a significantly increased expression of the stress molecules MIC2 and ULBP in piglets fed with *B. cereus*, an immune signaling based on these stress molecules could not be proven to be responsible for the disturbed barrier function (Table 3). Moreover, similar expression levels were detected for NKG2D in both groups and no increase in reaction to *B. cereus* was observed. Furthermore, shortly after weaning, the group fed with *B. cereus* showed a higher epithelial permeability and a lower frequency of CD45+ cells within the intestinal epithelia relative to enterocytes (EC). Therefore, it appeared that the higher permeability of

the intestinal epithelium was neither caused, nor accompanied, nor directly answered by increased numbers of IEL. Within the lymphocyte gate the T cell frequency was reduced in samples from *Bacillus* treated piglets in comparison to the control group, most noticeable in the CD3+ (49.22 vs. 34.15; $p=0.041$), CD8 β + / CD16– (19.56 vs. 5.48; $p=0.02$) and CD2+ / CD5+ (38.02 vs. 25.19; $p=0.045$) populations, particularly at an age of 32 days. Possibly, the immune reaction to antigens crossing the epithelial barrier was influenced by factors in milk. A stronger induction of tolerance-related gene expression has been found in mesenteric lymph nodes of suckling piglets in comparison to weaned piglets (Levast et al., 2010; Smith et al., 2010). Moreover, the percentage of CD8 β + / CD16– cells in *B. cereus* fed piglets on day 39 is comparable to that of the control piglets on day 32 suggesting that the development of the cytotoxic T cells (Denyer et al., 2006) as part of the adaptive immune system might be delayed in the *Bacillus* group. This is also supported by the low value of total immune cells in the jejunal epithelium of the *B. cereus* treated group. Values under 5% are described for conventional pigs at the age of 5 days and younger (Rothkötter et al., 1999). As we did not evaluate the sow milk it cannot be excluded that *Bacillus* affected the piglets' early gut development indirectly via a changed composition of the milk.

Eleven days after weaning the CD45+ / EC ratio became significantly higher in the *Bacillus* group than in the control group ($p<0.001$). These findings may indicate that the frequency of CD8 $\alpha\beta$ + intraepithelial T cells is strongly influenced by external conditions particularly in the absence of milk factors. From studies with mice it is known that murine CD8 $\alpha\beta$ IEL are derived from conventional CD8T cells that have entered the intestinal epithelium upon antigen-induced activation (Arstila et al., 2000).

There appears to be no clear influence of *B. cereus* on the natural IEL as there was no difference in the frequency of CD16+ / CD8 β –, CD2+ / CD5– and CD11R1 and $\gamma\delta$ T cells at any time point. However, the shifted ratio of cytotoxic CD8 β + T cells to relatively more frequent non-specific natural immune cells, mainly NK cells, could be involved in the impaired barrier function.

This would be consistent with the observed age-dependent improvement in the intestinal barrier function seen in the *Bacillus* group at an age of 39 days. At this time the frequency of the cytotoxic CD8 $\alpha\beta$ + cells is significantly higher than in the younger piglets fed with *Bacillus* ($p<0.05$), possibly compensating for the changes in ratios of other immune cells. Similar age effects in the intestinal barrier function have been described previously in feeding experiments with *B. cereus* showing a decreased permeability for mannitol at an age of 35 days, 6 days after weaning (Lodemann et al., 2008). Thus, in older animals the barrier function appears to be strengthened by *B. cereus*. It appears that the impact of the probiotic is changing from before to after weaning.

An in vitro-study with human IEL showed that the intestinal barrier integrity is negatively affected by activated CD8 $\alpha\beta$ T cells but not by $\gamma\delta$ T cells or resting CD8 $\alpha\beta$ T cells (Zufferey et al., 2009). Whether this finding can be transferred to swine is unclear. Our results appear to contradict this. Higher numbers of CD8 $\alpha\beta$ + have been

observed in the group with improved intestinal barrier function. Since there was no significant difference in the NKG2D expression between the two groups it is not clear whether those cells are active or resting. In this context it would be interesting to measure the level of interferon gamma (IFN γ) to clear the state of these cells.

The composition of the IEL populations in swine and humans differ in that the number of $\gamma\delta$ T cells is much lower in the human intestinal epithelium (Faure et al., 1988). In our animal study, the observed differences in the barrier integrity appeared directly after weaning, and the composition of IEL and their state of activation that preceded this situation would be of great interest. Unfortunately, most of the IEL were lost due to excessive cell death during the preparation of the tissue from the very young (17 d) suckling animals and the remaining cells were most likely not representative of the in vivo situation (data not shown).

In this study we isolated different lymphocyte populations from the jejunal epithelium and determined the mRNA expression of the NK receptor NKG2D to investigate which immune cells might be capable of communication with stressed enterocytes. To our knowledge, this is the first report in pigs showing a high expression of NKG2D on $\gamma\delta$ T cells. Porcine $\gamma\delta$ T cells were separated into CD5-positive and CD5-negative fractions, and only the CD5+ / $\gamma\delta$ T cells showed NKG2D expression. In previous mRNA based studies on porcine blood, an expression of the receptor has not been detected on $\gamma\delta$ T cells or any other circulating T-cell population (Denyer et al., 2006), suggesting a different behavior of the immune cells in blood and epithelial tissues. Furthermore, the NK cells (CD2+ / CD5– / CD16+) of the intestinal epithelium showed no NKG2D expression in contrast to NK cells in blood (Denyer et al., 2006). These findings are consistent with studies on human intestinal NK cells which also showed no NKG2D expression (Rankin et al., 2013). Interestingly, we also found expression of NKG2D in the fraction of CD8 $\alpha\beta$ IELs (Fig. 2), although the expression was lower compared to the $\gamma\delta$ T cells. This may indicate that a part of the CD8 $\alpha\beta$ T cells also react with the expression of NKG2D.

In summary, we have shown for the first time in pigs an expression of the NK receptor NKG2D on $\gamma\delta$ T cells, revealing their potential to communicate with stressed enterocytes and initiate an intestinal immune response. Although we were unable to provide evidence supporting an increased expression of the stress-induced MHC class I-related molecules in reaction to *B. cereus* feed supplementation or an increase in cell populations expressing NKG2D, our study suggests a negative impact of *B. cereus* on the intestinal barrier function early after weaning and supports immune modulating properties of the probiotic *B. cereus*.

Conflict of interest

None of the authors have any potential conflict of interest regarding or related to this work.

Acknowledgements

We thank R. Pieper and the personnel of the Institute of Animal Nutrition, Freie Universität Berlin for their

assistance in carrying out the animal studies. For assistance in measurement of the HRP permeability we thank Silke Zakrzewski from the Institute of Clinical Physiology, Charité Berlin. This study was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG), Grant TE 837/2-1.

References

- Alexopoulos, C., Karagiannidis, A., Kritas, S.K., Boscós, C., Georgoulakis, I.E., Kyriakis, S.C., 2001. Field evaluation of a bio regulator containing live *Bacillus cereus* spores on health status and performance of sows and their litters. *J. Vet. Med. A: Physiol. Pathol. Clin. Med.* 48, 137–145.
- Arstila, T., Arstila, T.P., Calbo, S., Selz, F., Malassis-Seris, M., Vassalli, P., Kourilsky, P., Guy-Grand, D., 2000. Identical T cell clones are located within the mouse gut epithelium and lamina propria and circulate in the thoracic duct lymph. *J. Exp. Med.* 191, 823–834.
- Bauer, S., Groh, V., Wu, J., Steinle, A., Phillips, J.H., Lanier, L.L., Spies, T., 1999. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* 285, 727–729.
- Beecher, D.J., Schoeni, J.L., Wong, A.C., 1995. Enterotoxic activity of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *Infect. Immun.* 63, 4423–4428.
- Braat, H., van den Brande, J., van Tol, E., Hommes, D., Peppelenbosch, M., van Deventer, S., 2004. *Lactobacillus rhamnosus* induces peripheral hypo-responsiveness in stimulated CD4+ T cells via modulation of dendritic cell function. *Am. J. Clin. Nutr.* 80, 1618–1625.
- Chang, Y.H., Kim, J.K., Kim, H.J., Kim, W.Y., Kim, Y.B., Park, Y.H., 2001. Selection of a potential probiotic *Lactobacillus* strain and subsequent in vivo studies. *Antonie Van Leeuwenhoek* 80, 193–199.
- Chardon, P., Rogel-Gaillard, C., Cattolico, L., Duprat, S., Vaiman, M., Renard, C., 2001. Sequence of the swine major histocompatibility complex region containing all non-classical class I genes. *Tissue Antigens* 57, 55–65.
- Cho, J.H., 2011. Probiotics as a dietary additive for pigs: a review. *J. Anim. Vet. Adv.* 10, 2127–2134.
- De Champs, C., Maroncle, N., Balestrino, D., Rich, C., Forestier, C., 2003. Persistence of colonization of intestinal mucosa by a probiotic strain, *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* Lcr35, after oral consumption. *J. Clin. Microbiol.* 41, 1270–1273.
- Denyer, M.S., Wileman, T.E., Stirling, C.M., Zuber, B., Takamatsu, H.H., 2006. Perforin expression can define CD8 positive lymphocyte subsets in pigs allowing phenotypic and functional analysis of natural killer, cytotoxic T, natural killer T and MHC un-restricted cytotoxic T-cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 110, 279–292.
- EFSA, 2012. Scientific Opinion on Toyocerin® (*Bacillus cereus*) as a feed additive for sows, piglets, pigs for fattening, cattle for fattening, calves for rearing, chickens for fattening and rabbits for fattening. *EFSA J.* 10 (10), 2924, <http://dx.doi.org/10.2903/j.efsa.2012.2924> (34 pp.).
- Faure, F., Jitsukawa, S., Triebel, F., Hercend, T., 1988. Characterization of human peripheral lymphocytes expressing the CD3-gamma/delta complex with anti-receptor monoclonal antibodies. *J. Immunol.* 141, 3357–3360.
- Garcia-Borges, C.N., Phanavanh, B., Saraswati, S., Dennis, R.A., Crew, M.D., 2005. Molecular cloning and characterization of a porcine UL16 binding protein (ULBP)-like cDNA. *Mol. Immunol.* 42, 665–671.
- Gedek, B., Kirchgessner, M., Wiehler, S., Bott, A., Eidelsburger, U., Roth, F.X., 1993. The nutritive effect of *Bacillus cereus* as a probiotic in the raising of piglets. 2. Effect and microbial count, composition and resistance determination of gastrointestinal and fecal microflora. *Arch. Anim. Nutr.* 44, 215–226.
- Groh, V., Rhinehart, R., Randolph-Habecker, J., Topp, M.S., Riddell, S.R., Spies, T., 2001. Costimulation of CD8alpha T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells. *Nat. Immunol.* 2, 255–260.
- Jacobi, S.K., Odle, J., 2012. Nutritional factors influencing intestinal health of the neonate. *Adv. Nutr.* 3, 687–696.
- Jadamus, A., Vahjen, W., Simon, O., 2001. Growth behaviour of a spore forming probiotic strain in the gastrointestinal tract of broiler chicken and piglets. *Arch. Anim. Nutr.* 54, 1–17.
- Jin, L., Ho, Y., Abdullah, N., Jalaludin, S., 2000. Digestive and bacterial enzyme activities in broilers fed diets supplemented with *Lactobacillus* cultures. *Poult. Sci.* 79, 886–891.
- Kirchgessner, M., Roth, F.X., Eidelsburger, U., Gedek, B., 1993. The nutritive efficiency of *Bacillus cereus* as a probiotic in the raising of piglets. 1. Effect on the growth parameters and gastrointestinal environment. *Arch. Anim. Nutr.* 44, 111–121.
- Kyriakis, S.C., Tsioloyiannis, V.K., Vlemmas, J., Sarris, K., Tsinas, A.C., Alexopoulos, C., Jansegers, L., 1999. The effect of probiotic LSP 122 on the control of post-weaning diarrhoea syndrome of piglets. *Res. Vet. Sci.* 67, 223–228.
- Levast, B., de Monte, M., Chevaleyre, C., Melo, S., Berri, M., Mangin, F., Zanello, G., Lantier, I., Salmon, H., Meurens, F., 2010. Ultra-early weaning in piglets results in low serum IgA concentration and IL17 mRNA expression. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 137, 261–268.
- Lodemann, U., Lorenz, B.M., Weyrauch, K.D., Martens, H., 2008. Effects of *Bacillus cereus* var. *toyoi* as probiotic feed supplement on intestinal transport and barrier function in piglets. *Arch. Anim. Nutr.* 62, 87–106.
- Martin, L., Lodemann, U., Bondzio, A., Gefeller, E.M., Vahjen, W., Aschenbach, J.R., Zentek, J., Pieper, R., 2013. A high amount of dietary zinc changes the expression of zinc transporters and metallothionein in jejunal epithelial cells in vitro and in vivo but does not prevent zinc accumulation in jejunal tissue of piglets. *J. Nutr.* 143, 1205–1210.
- Massi, M., Vitali, B., Federici, F., Matteuzzi, D., Brigidi, P., 2004. Identification method based on PCR combined with automated ribotyping for tracking probiotic *Lactobacillus* strains colonizing the human gut and vagina. *J. Appl. Microbiol.* 96, 777–786.
- Pieper, R., Kroger, S., Richter, J.F., Wang, J., Martin, L., Bindelle, J., Htoo, J.K., von Smolinski, D., Vahjen, W., Zentek, J., Van Kessel, A.G., 2012. Fermentable fiber ameliorates fermentable protein-induced changes in microbial ecology, but not the mucosal response, in the colon of piglets. *J. Nutr.* 142, 661–667.
- Prüss, B.M., Dietrich, R., Nibler, B., Martlbauer, E., Scherer, S., 1999. The hemolytic enterotoxin HBL is broadly distributed among species of the *Bacillus cereus* group. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 5436–5442.
- Quigley, E.M., 2010. Prebiotics and probiotics; modifying and mining the microbiota. *Pharmacol. Res.* 61, 213–218.
- Rankin, L., Groom, J., Mielke, L.A., Seillet, C., Belz, G.T., 2013. Diversity, function, and transcriptional regulation of gut innate lymphocytes. *Front. Immunol.* 4, 22.
- Rothkötter, H., Möllhoff, S., Pabst, R., 1999. The influence of age and breeding conditions on the number and proliferation of intraepithelial lymphocytes in pigs. *Scand. J. Immunol.* 50, 31–38.
- Scharek-Tedin, L., Pieper, R., Vahjen, W., Tedin, K., Neumann, K., Zentek, J., 2013. *Bacillus cereus* var. *toyoi* modulates the immune reaction and reduces the occurrence of diarrhea in piglets challenged with *Salmonella* Typhimurium DT104. *J. Anim. Sci.* 91, 5696–5704.
- Scharek, L., Altherr, B.J., Tolke, C., Schmidt, M.F., 2007. Influence of the probiotic *Bacillus cereus* var. *toyoi* on the intestinal immunity of piglets. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 120, 136–147.
- Schierack, P., Wieler, L.H., Taras, D., Herwig, V., Tachu, B., Hlinak, A., Schmidt, M.F., Scharek, L., 2007. *Bacillus cereus* var. *toyoi* enhanced systemic immune response in piglets. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 118, 1–11.
- Smith, F., Clark, J.E., Overman, B.L., Tozel, C.C., Huang, J.H., Rivier, J.E., Blikslager, A.T., Moeser, A.J., 2010. Early weaning stress impairs development of mucosal barrier function in the porcine intestine. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 298, G352–G363.
- Sneath, P.H., 1986. Endospore-forming Gram-positive rods and cocci. *Bergey's Man. Syst. Bacteriol.*, 1104–1207.
- Solano-Aguilar, G.I., Vengroski, K.G., Beshah, E., Lunney, J.K., 2000. Isolation and purification of lymphocyte subsets from gut-associated lymphoid tissue in neonatal swine. *J. Immunol. Methods* 241, 185–199.
- Taras, D., Vahjen, W., Macha, M., Simon, O., 2005. Response of performance characteristics and fecal consistency to long-lasting dietary supplementation with the probiotic strain *Bacillus cereus* var. *toyoi* to sows and piglets. *Arch. Anim. Nutr.* 59, 405–417.
- Tieng, V., Le Bouguenec, C., du Merle, L., Bertheau, P., Desreumaux, P., Janin, A., Charron, D., Toubert, A., 2002. Binding of *Escherichia coli* adhesin AfaE to CD55 triggers cell-surface expression of the MHC class I-related molecule MICA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 2977–2982.
- Ussing, H.H., Zerahn, K., 1951. Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. *Acta Physiol. Scand.* 23, 110–127.
- Wada, M., Tamura, A., Takahashi, N., Tsukita, S., 2013. Loss of claudins 2 and 15 from mice causes defects in paracellular Na+ flow and nutrient transport in gut and leads to death from malnutrition. *Gastroenterology* 144, 369–380.
- Wijten, P.J., van der Meulen, J., Verstegen, M.W., 2011. Intestinal barrier function and absorption in pigs after weaning: a review. *Br. J. Nutr.* 105, 967–981.

- Yang, H., Parkhouse, R., 1996. Phenotypic classification of porcine lymphocyte subpopulations in blood and lymphoid tissues. *Immunology* 89, 76–83.
- Zhu, L.H., Xu, J.X., Zhu, S.W., Cai, X., Yang, S.F., Chen, X.L., Guo, Q., 2014. Gene expression profiling analysis reveals weaning-induced cell cycle arrest and apoptosis in the small intestine of pigs. *J. Anim. Sci.* 92, 996–1006.
- Zufferey, C., Erhart, D., Saurer, L., Mueller, C., 2009. Production of interferon- γ by activated T-cell receptor- $\alpha\beta$ CD8 $\alpha\beta$ intestinal intraepithelial lymphocytes is required and sufficient for disruption of the intestinal barrier integrity. *Immunology* 128, 351–359.