

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Einfluss der intestinalen Mikroflora
auf die Entwicklung des mukosalen Immunsystems
des Hühnerdarms**

von

Sarah Lettmann

aus Berlin

München, 2015

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Institut für Tierphysiologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von
Univ.-Prof. Dr. Bernd Kaspers

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. vet. Dipl. ECAR Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. vet. Bernd Kaspers

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Dr. Dr. habil. Fred Sinowatz

Tag der Promotion: 18. Juli 2015

Für meine Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
2. LITERATURÜBERSICHT	3
2.1 Das mukosale Immunsystem des Hühnerdarms.....	3
2.1.1 Aufbau	3
2.1.2 Entwicklung.....	10
2.1.3 Funktion.....	13
2.2 Einfluss der Mikroflora auf den Wirt.....	18
2.2.1 Mikrobiota	18
2.2.2 Rolle der Darm-Mikrobiota beim Säuger	18
2.2.3 Rolle der Darm-Mikrobiota beim Huhn	26
2.3 Verwendete probiotische Bakterien.....	32
2.3.1 <i>Escherichia coli</i> Nissle 1917	32
2.3.2 <i>Enterococcus faecium</i>	33
2.3.3 <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	34
2.3.4 <i>Clostridium butyricum</i>	34
3. ZIELSETZUNG	36
4. MATERIAL UND METHODEN	37
4.1 Tiere und Tierhaltung.....	37
4.1.1 Hühner	37
4.1.2 Haltung	37
4.1.3 Rekonstitution.....	38
4.2 Gewinnung von Proben.....	41
4.2.1 Gewinnung von Plasma	42
4.2.2 Gewinnung von Organen.....	42
4.3 Immunhistologie	45
4.3.1 Herstellung von Eiweiß-Glycerin	45
4.3.2 Anfertigung von Kryostatschnitten.....	46
4.3.3 Immunhistochemische Färbung.....	46
4.4 RNA Präparation für die Genexpressionsanalysen.....	48
4.4.1 RNA-Isolation.....	48
4.4.2 Reinheitsbestimmung der RNA im NanoDrop	49
4.4.3 Bestimmung der RNA Integrität im Agilent 2100 Bioanalyzer	49
4.5 cDNA Synthese	50
4.5.1 DNase Verdau.....	50
4.5.2 cDNA Synthese.....	51

4.6	Quantitative Real Time Polymerase Kettenreaktion (qRT-PCR)	52
4.7	Microarray	56
4.7.1	Agilent Microarray	56
4.7.2	cDNA Synthese	56
4.7.3	cRNA Synthese	57
4.7.4	Aufreinigung und Bestimmung der spezifischen Cy3 Aktivität	57
4.7.5	Fragmentierung der cRNA	58
4.7.6	Hybridisierung des Microarrays	58
4.7.7	Waschen und Scan des Microarrays	59
4.7.8	Programme zur Auswertung der Microarrays	59
4.8	Immunglobulinquantifizierung mittels ELISA	63
4.8.1	Gesamt Immunglobuline	64
4.8.2	<i>E.coli</i> Nissle (EcN) spezifische Immunglobuline	65
4.8.3	<i>Enterococcus faecium</i> spezifische Immunglobuline	66
4.9	Statistische Auswertung	67
5.	ERGEBNISSE	68
5.1	Immunhistologie	68
5.1.1	Caecum: Vergleich „Keimfrei“-„Konventionell“	68
5.1.2	Vergleich der Tiergruppen an Tag 28 nach dem Schlupf	72
5.1.3	Vergleich der Tiergruppen an Tag 55 nach dem Schlupf	78
5.2	Microarrays	80
5.2.1	Heatmap der im Microarray analysierten Proben	81
5.2.2	Identifizierung signifikant regulierter Gene der vier Gruppen	84
5.2.3	Genüberschneidungen zwischen den vier Gruppen	86
5.2.4	Funktionelle Analysen	96
5.3	Quantitative Real Time Polymerase Ketten-Reaktion (qRT-PCR)	108
5.3.1	Genexpression im Caecum im Vergleich „Keimfrei“ - „Konventionell“	108
5.3.2	Vergleich der Tiergruppen an Tag 28 nach dem Schlupf	112
5.4	Immunglobulinquantifizierung	120
5.4.1	Gesamt-Immunglobulinbestimmung im Plasma	120
5.4.2	Gesamt-Immunglobulin-A-Bestimmung in Galle und Caecuminhalt	123
5.4.3	Bestimmung von <i>E.coli</i> Nissle 1917 spezifischen Immunglobulinen	124
5.4.4	Bestimmung von <i>Enterococcus faecium</i> spezifischen Immunglobulinen	127
6.	DISKUSSION	130
6.1	Morphologische Analyse	131
6.2	Genexpressionsanalysen	134
6.3	Funktionelle Analysen	141

6.4	Ausblick.....	145
7.	ZUSAMMENFASSUNG	147
8.	SUMMARY	149
9.	LITERATURVERZEICHNIS	151
10.	ANHANG	173
11.	DANKSAGUNG.....	207

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Organisierte lymphatische Strukturen des GALT	4
Abbildung 2: Mikroskopische Darstellung der Caecaltonsille	9
Abbildung 3: Schematische Darstellung des GALT im Dünndarm.....	10
Abbildung 4: Einfluss der Mikrobiota auf die Entwicklung des Darmimmunsystems.....	24
Abbildung 5: Präparation der Proben des Dickdarms	44
Abbildung 6: Makrophagen im Caecum	69
Abbildung 7: B-Lymphozyten im Caecum	70
Abbildung 8: IgA im Caecum	71
Abbildung 9: IgA im Jejunum am 28. Lebenstag.....	72
Abbildung 10: B-Lymphozyten in der CT am 28. Lebenstag.....	73
Abbildung 11: IgA in der Caecaltonsille am 28. Lebenstag	74
Abbildung 12: $\alpha\beta$ 1 T-Lymphozyten in der Caecaltonsille am 28. Lebenstag	75
Abbildung 13: IgA im Caecum am 28. Lebenstag.....	76
Abbildung 14: B-Lymphozyten im Caecum am 28. Lebenstag.....	77
Abbildung 15: B-Lymphozyten im Caecum am 55. Lebenstag.....	78
Abbildung 16: IgA in der Caecaltonsille am 55. Lebenstag	79
Abbildung 17: Ablauf der Microarray Experimente	81
Abbildung 18: Heatmap der untersuchten Proben der Caecaltonsille.....	82
Abbildung 19: Heatmap der untersuchten Proben des Caecums	83
Abbildung 20: Genüberschneidungen der signifikant differentiell regulierten Gene in der CT	86
Abbildung 21: Genüberschneidungen der signifikant differentiell regulierten Gene im Caecum.....	93
Abbildung 22: Gene Ontology der CT	100
Abbildung 23: Gene Ontology des Caecums	102
Abbildung 24: Expression von IgA im Caecum	109
Abbildung 25: Expression von IgY im Caecum	110
Abbildung 26: Expression von IgJ im Caecum.....	111
Abbildung 27: Expression von PIGR im Caecum	111
Abbildung 28: Expression von IL21 im Caecum.....	112
Abbildung 29: Expression von IgA in der CT und im Caecum am 28. Lebenstag.....	113
Abbildung 30: Expression von IgY und IgJ in der CT und im Caecum am 28. Lebenstag.	114
Abbildung 31: Expression von CXCR5, BAFF und CD40L in der CT am 28. Lebenstag .	115

Abbildung 32: Expression von PIGR im Caecum am 28. Lebenstag	116
Abbildung 33: Expression von AID in der CT und im Caecum am 28. Lebenstag	117
Abbildung 34: Expression von IL1b und IL6 in der CT am 28. Lebenstag	117
Abbildung 35: Expression von IL21 in der CT und im Caecum am 28. Lebenstag	118
Abbildung 36: Expression von CD4 und CD8 in der CT am 28. Lebenstag	119
Abbildung 37: Immunglobulinbestimmung Tag 7 bis 28 nach dem Schlupf	121
Abbildung 38: Immunglobulinbestimmung an Tag 55 nach dem Schlupf	122
Abbildung 39: Gesamt-Immunglobulin-A-Bestimmung in Galle und Caecuminhalt	123
Abbildung 40: <i>E.coli</i> Nissle 1917 spezifisches Immunglobulin A im Plasma	124
Abbildung 41: <i>E.coli</i> Nissle 1917 spezifische Immunglobuline im Plasma	125
Abbildung 42: <i>E.coli</i> Nissle 1917 spezifische Immunglobuline in Galle und Caecuminhalt	126
Abbildung 43: <i>Enterococcus faecium</i> spezifische Immunglobuline im Plasma	127
Abbildung 44: <i>Enterococcus faecium</i> spezifische Immunglobuline in Galle und Caecuminhalt	129
Abbildung 45: $\gamma\delta$ T-Lymphozyten im Caecum	176
Abbildung 46: $\alpha\beta$ T-Lymphozyten im Caecum	177
Abbildung 47: $CD4^+$ T-Lymphozyten im Caecum	178
Abbildung 48: $CD8^+$ T-Lymphozyten im Caecum	179
Abbildung 49: IgM^+ Zellen im Caecum	180
Abbildung 50: $\gamma\delta$ - und $\alpha\beta$ T-Lymphozyten im Jejunum	181
Abbildung 51: $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Lymphozyten im Jejunum	182
Abbildung 52: B-Lymphozyten und Makrophagen im Jejunum	183
Abbildung 53: IgM und IgY im Jejunum	184
Abbildung 54: IgA im Jejunum	185
Abbildung 55: $\gamma\delta$ - und $CD4^+$ T-Lymphozyten in der Caecaltonsille	186
Abbildung 56: $CD8^+$ T-Lymphozyten und Makrophagen in der Caecaltonsille	187
Abbildung 57: IgY und IgM in der Caecaltonsille	188
Abbildung 58: $\gamma\delta$ - und $\alpha\beta$ T-Lymphozyten im Caecum	189
Abbildung 59: $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Lymphozyten im Caecum	190
Abbildung 60: IgY und IgM im Caecum	191
Abbildung 61: Makrophagen im Caecum	192
Abbildung 62: T-Lymphozyten im Colon	193
Abbildung 63: B-Lymphozyten und IgA im Colon	194
Abbildung 64: $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Lymphozyten im Colon	195

Abbildung 65: IgY und IgM im Colon.....	196
Abbildung 66: Makrophagen im Colon	197
Abbildung 67: $\gamma\delta$ T-Lymphozyten im Caecum am 55. Lebenstag	198
Abbildung 68: $\alpha\beta$ T-Lymphozyten im Caecum am 55. Lebenstag.....	198
Abbildung 69: $CD4^+$ T-Lymphozyten im Caecum am 55. Lebenstag.....	199
Abbildung 70: $CD8^+$ T-Lymphozyten im Caecum am 55. Lebenstag	199
Abbildung 71: IgA im Caecum am 55. Lebenstag.....	200
Abbildung 72: IgM im Caecum am 55. Lebenstag	200
Abbildung 73: IgY im Caecum am 55. Lebenstag.....	201
Abbildung 74: Makrophagen im Caecum am 55. Lebenstag.....	201
Abbildung 75: $\gamma\delta$ T-Lymphozyten in der Caecaltonsille am 55. Lebenstag.....	202
Abbildung 76: $\alpha\beta$ T-Lymphozyten in der Caecaltonsille am 55. Lebenstag	202
Abbildung 77: B-Lymphozyten in der Caecaltonsille am 55. Lebenstag	203
Abbildung 78: IgM in der Caecaltonsille am 55. Lebenstag.....	203
Abbildung 79: $CD8^+$ T-Lymphozyten in der Caecaltonsille am 55. Lebenstag	204
Abbildung 80: $CD4^+$ T-Lymphozyten in der Caecaltonsille am 55. Lebenstag	204
Abbildung 81: IgY in der Caecaltonsille am 55. Lebenstag	205
Abbildung 82: Makrophagen in der Caecaltonsille am 55. Lebenstag	205

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Zusammensetzung des Inokulums der Tetra-Gruppe	39
Tabelle 2: Anzahl der KBE pro Gramm Kot der Bakterienstämme in der Tetra-Gruppe.....	40
Tabelle 3: Zeitpunkte der Probenentnahme und Anzahl der Tiere pro Gruppe in Versuch 1.....	41
Tabelle 4: Zeitpunkte der Probenentnahme und Anzahl der Tiere pro Gruppe in Versuch 2.....	41
Tabelle 5: Zeitpunkte der Probenentnahme und Anzahl der Tiere pro Gruppe in Versuch 3.....	41
Tabelle 6: Übersicht über das gewonnene Probenmaterial	42
Tabelle 7: In der Immunhistologie verwendete primäre monoklonale Antikörper.....	47
Tabelle 8: Verwendete qRT-PCR Primer.....	53
Tabelle 9: Verwendete primäre Antikörper	64
Tabelle 10: Verdünnung der Proben	65
Tabelle 11: Verwendete Detektionsantikörper zum Nachweis von Gesamt-Immunglobulinen.....	65
Tabelle 12: Verwendete Detektionsantikörper zum Nachweis von Stamm spezifischen Immunglobulinen	66
Tabelle 13: Signifikant regulierte Gene in der Caecaltonsille und im Caecum	85
Tabelle 14: Signifikant regulierte Gene der SLC-Transporter Familie.....	89
Tabelle 15: Analyse der signifikant differentiell exprimierten Gene mittels Panther Gene List Analysis.....	97
Tabelle 16: Analyse von Datensätzen hinsichtlich biologisch relevanter Signalkaskaden.....	105
Tabelle 17: Immunologisch relevante Signalwege	105
Tabelle 18: Untersuchung immunrelevanter Gene mittels qRT-PCR.....	206

Tabellenverzeichnis der beiliegenden CD

Mappe 1

Tabelle 19: Annotation

Tabelle 20: Caecaltonsille an Tag 28: signifikante Spots

Tabelle 21: Caecum an Tag 28: signifikante Spots

Tabelle 22: Caecaltonsille an Tag 28: signifikante Gene

Tabelle 23: Caecum an Tag 28: signifikante Gene

Tabelle 24: Venn Diagramm der signifikant regulierten Gene in der Caecaltonsille

Tabelle 25: Venn Diagramm der signifikant regulierten Gene im Caecum

Tabelle 26: Gene Ontology der signifikant regulierten Gene in der Caecaltonsille

Tabelle 27: Gene Ontology der signifikant regulierten Gene im Caecum

Tabelle 28: Pathway Express Caecaltonsille: Übersicht relevanter Signalkaskaden

Tabelle 29: Pathway Express CT: Gene innerhalb der Signalkaskaden im Vergleich KF vs. Konv

Tabelle 30: Pathway Express CT: Gene innerhalb der Signalkaskaden im Vergleich KF vs. Tetra

Tabelle 31: Pathway Express CT: Gene innerhalb der Signalkaskaden im Vergleich KF vs. Mono

Tabelle 32: Pathway Express Caecum: Übersicht relevanter Signalkaskaden

Tabelle 33: Pathway Express Cae: Gene innerhalb der Signalkaskaden im Vergleich KF vs. Konv

Tabelle 34: Pathway Express Cae: Gene innerhalb der Signalkaskaden im Vergleich KF vs. Tetra

Tabelle 35: Pathway Express Cae: Gene innerhalb der Signalkaskaden im Vergleich KF vs. Mono

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AID	<i>activation-induced cytidine deaminase</i>
AMP	Antimikrobielles Peptid
APRIL	<i>a proliferation inducing ligand</i>
Aqua bidest.	bidestilliertes Wasser
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
AvBD	Aviäre β -Defensine
BAFF	<i>B cell activating factor of the tumor necrosis factor family</i>
BCR	B-Zellrezeptor, <i>B-cell receptor</i>
BF	Bursa fabricii
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Cae	Caecum
CCL	CC-Chemokin Ligand
CCR	CC-Chemokin-Rezeptor
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
cDNA	<i>complementary deoxyribonucleic acid</i>
ch	<i>Hühner, chicken</i>
chB6	Hühner B6 Antigen, <i>chicken B6 antigen</i>
CT	Caecaltonsille
CTL	Zytotoxische T-Lymphozyten, <i>Cytotoxic T-lymphocytes</i>
CTP	Cytosintriphosphat
CXCL	CXC-Chemokin Ligand
CXCR	CXC-Chemokin Rezeptor
Cy3	Cyanin3
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DC	Dendritische Zelle
DNA	Desoxyribonukleinsäure, <i>deoxyribonucleic acid</i>
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
EcN	<i>Escherichia coli</i> Nissle 1917
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>E. faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
EHEC	Enterohämorrhagische <i>Escherichia coli</i>
EID	Embryonaltag, <i>embryonic incubation day</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay</i>
<i>et al.</i>	und andere (<i>et alii</i>)
FAE	Follikel Assoziiertes Epithel
FBS	Fetales Bovines Serum
FDC	Follikulär Dendritische Zelle, <i>follicular dendritic cell</i>
FC	<i>Fold change</i>
FDR	<i>False Discovery Rate</i>
GALT	<i>gut associated lymphoid tissue</i>
GC	Germinales Zentrum
IEL	Intra-epitheliale Lymphozyten
IFE	interfollikuläres Epithel
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin

IU	<i>international unit</i> , internationale Einheit
ILF	Isolierter Lymphatischer Follikel
i.m.	intramuskulär
iNKT-Zelle	invariante natürliche Killer-T-Zelle, <i>invariant natural killer T cell</i>
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase, <i>inducible nitric oxid synthase</i>
INRA	<i>Institut national de la recherche agronomique</i>
KBE	Kolonienbildende Einheiten
LP	<i>Lamina propria</i>
LPS	Lipopolysaccharid
LTi-Zellen	<i>lymphoid tissue inducer cells</i>
mAK	monoklonaler Antikörper
MD	Meckel-Divertikel
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex, <i>Major Histocompatibility Complex</i>
Min.	Minuten
mRNA	<i>Messenger Ribonucleic Acid</i>
MW	Mittelwert
NF- κ B	<i>nuclear factor kappa B</i>
NK-Zelle	natürliche Killerzellen, <i>natural killer cell</i>
NLR	NOD ähnlicher Rezeptor, <i>NOD like receptor</i>
OD	Optische Dichte
NO	Stickstoffmonoxid
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung, <i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion, <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PD	<i>programmed cell death</i>
pIgR	polymerer Immunglobulinrezeptor, Poly-Ig-Rezeptor
POD	Peroxidase
PP	Peyer Plaque
PSA	Polysaccharid A
PRR	<i>pattern-recognition-receptor</i>
qRT-PCR	quantitative Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion, <i>quantitative real-time polymerase chain reaction</i>
R	Rezeptor
RNA	Ribonukleinsäure, <i>ribonucleic acid</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
Sek.	Sekunden
SFB	Segmentierte filamentöse Bakterien, <i>segmented filamentous bacteria</i>
SPF	<i>specific pathogen free</i> , spezifisch pathogenfrei
STABW	Standardabweichung
spp.	Subspezies
TACI	<i>transmembrane activator, calcium modulator and CAML interactor</i>
TCR	T-Zellrezeptor, <i>T-cell receptor</i>
TGF	<i>transforming growth factor</i>
Th	T-Helferzelle
TLR	Toll ähnlicher Rezeptor, <i>toll like receptor</i>
TMB	Tetramethylbenzidin
Treg	Regulatorischer T-Lymphozyt
TNF	Tumornekrosefaktor, <i>tumor necrosis factor</i>

TSLP	<i>thymic stromal lymphopoietin</i>
U	<i>unit</i> , Einheit
V	Variable Domäne
vs.	versus
α	Alpha
β	Beta
γ	Gamma
δ	Delta

1. EINLEITUNG

Ein voll entwickeltes und funktionstüchtiges Darmimmunsystem ist für die Gesundheit des Organismus unabdingbar. Die Schleimhaut des Darmes stellt eine riesige Oberfläche mit direktem Kontakt zur Umwelt dar, die nur durch eine dünne Schicht von Zellen, dem Epithel, den Körper von der Umwelt trennt und somit einer großen Menge von Antigenen ausgesetzt ist. Die Nährstoffabsorption als physiologische Funktion der Darmschleimhaut, bedingt die Fragilität und Durchlässigkeit des Gewebes, macht dieses aber gleichzeitig besonders anfällig für das Eindringen von Pathogenen. Bei vielen bedeutenden Infektionskrankheiten wird der Erreger oral aufgenommen und dringt auf diesem Weg in den Körper ein. Entscheidend für den Ausgang der Infektion ist dann eine adäquate Reaktion des darmassoziierten lymphatischen Gewebes. Diesem fällt die Aufgabe zu, die Invasion und Ausbreitung des Pathogens zu verhindern, ohne dass es zu einer überschießenden Immunreaktion kommt. Letztere würde zu umfangreicher Gewebsschädigung und damit zur Erkrankung des Organismus führen.

Die Mehrzahl der Fremdartigene, welche die Barriere der Schleimhaut überwinden, ist allerdings nicht pathogen, wie zum Beispiel eine Vielzahl an Nahrungsbestandteilen. Gleichzeitig leben in einem gesunden Darm mindestens 1000 verschiedene Spezies von Mikroorganismen, welche als Kommensalen bezeichnet werden, da sie mit ihrem Wirt in Symbiose leben [3]. Das Mikrobiom, welches die Gesamtheit aller den Organismus besiedelnden Mikroorganismen bezeichnet, hat ganz entscheidenden Einfluss auf die Entwicklung, die Gesundheit und das Wohlbefinden des Wirts. Dies ist heute nach jahrzehntelanger Forschung mit Mausmodellen bekannt, wobei die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen noch immer zum großen Teil unbekannt sind [4]. Um den Einfluss der Darmflora auf den Organismus zu untersuchen, hat man Mäuse ohne jegliche mikrobielle Besiedlung im Darm verwendet. Die technisch hoch anspruchsvolle Methode der Keimfreihaltung wurde für Mäuse und Ratten inzwischen sehr gut etabliert. Ursprünglich mussten dafür neugeborene Tiere, welche per Kaiserschnitt unter sterilen Bedingungen entwickelt wurden, in Isolatoren überführt und von Hand aufgezogen werden [5]. Inzwischen entstammen diese Tiere aber permanent keimfrei gehaltener Kolonien und sind kommerziell erhältlich. Bei anderen Versuchssäugetieren, wie zum Beispiel dem Schwein [6] oder den Meerschweinchen [7], gibt es wenige erfolgreiche Keimfreihaltungen. Insgesamt gestaltet sich die längerfristige Keimfreihaltung größerer Säugetiere unter Versuchsbedingungen jedoch schwierig.

Die von Umwelt und Muttertier getrennte Entwicklung des Kükens im sterilen Ei erleichtert das Verfahren der Keimfreihaltung erheblich. Daher gibt es schon seit den fünfziger Jahren keimfreie Hühnermodelle [8, 9]. Umso verwunderlicher ist, dass für das Huhn vergleichsweise wenig systematische Untersuchungen zum Einfluss der Mikrobiota auf die funktionelle und strukturelle Entwicklung des Darmimmunsystems zu finden sind, die vornehmlich vor dem 21. Jahrhundert entstanden sind [8, 10]. In der Geflügelindustrie ist die Darmgesundheit der Tiere hinsichtlich Produktivität, Lebensmittelhygiene und Tierschutz ein wichtiger Aspekt. Der Darm des Huhnes in Intensivhaltung wird aufgrund von Faktoren wie Platzmangel, Stress, genetisch bedingter Infektanfälligkeit und hohem Infektionsdruck oft von Pathogenen besiedelt, die eine Bedrohung für den Endverbraucher und/oder die Herdengesundheit und damit dem wirtschaftlichen Ertrag darstellen. Gleichzeitig wird der hohe Antibiotikaverbrauch in der kommerziellen Tierhaltung von der Gesellschaft und der Politik stark kritisiert. So wird das Augenmerk mehr und mehr auf alternative Wege zur verbesserten Darmgesundheit, zum Beispiel in Form von zum Beispiel Impfungen oder Verabreichung von Probiotika bzw. Präbiotika, gelenkt. Beim Huhn spielt insbesondere letzteres eine wichtige Rolle, da die frühe Kolonisierung des frisch geschlüpften Kükens mit der maternalen Keimflora in der heutigen Geflügelindustrie unterbunden wird. Beim Säugetier nimmt das Neugeborene bereits auf dem Weg durch den Geburtskanal, während der Aufnahme von Muttermilch und durch den engen Kontakt mit dem Muttertier die maternale Keimflora auf und wird so schnell und effektiv mit der kommensalen Flora der Mutter besiedelt. Das Küken allerdings schlüpft aus dem desinfizierten Ei in einen gründlich gereinigten Brüter und wird in ebenfalls sauberen Transportboxen in gereinigte und desinfizierte Stallungen verbracht. Die mikrobielle Besiedlung geschieht also vorwiegend durch das Futter, das Betreuungspersonal und durch Umweltkeime, welche durch die Desinfektionsmaßnahmen nicht beseitigt werden konnten. Inwiefern sich diese „unnatürliche“ Keimbesiedlung der Küken auf deren Entwicklung auswirkt gilt es noch zu erforschen.

In dieser Arbeit soll daher der Einfluss von verschiedenen kommensalen Mikroorganismen auf die Entwicklung des mukosalen Immunsystems des Hühnerdarmes untersucht werden. Sie soll damit eine Grundlage schaffen, um längerfristig die positive Wirkung von natürlichen Darmbakterien als effektive und unbedenkliche Möglichkeit zur Verbesserung der Tiergesundheit nutzen zu können.

2. LITERATURÜBERSICHT

2.1 DAS MUKOSALE IMMUNSYSTEM DES HÜHNERDARMS

Das Immunsystem der Schleimhäute (mukosales Immunsystem) bildet den größten Teil der Immungewebe im Körper. Beim Menschen umfasst es drei Viertel aller Lymphozyten. Es setzt sich zusammen aus den Schleimhäuten des Gastrointestinaltraktes, der Atemwege, sowie des Urogenitaltraktes, und enthält zum einen Kompartimente aus diffus verteiltem Lymphgewebe, zum anderen organisierte lymphatische Strukturen. Spezialisierte Mechanismen zur Antigenaufnahme ermöglichen eine direkte Wechselwirkung zwischen Antigenen, Schleimhautepithelien und lymphatischen Geweben. Die Bezeichnung als darmassoziiertes lymphatisches Gewebe (*gut associated lymphoid tissue*, GALT) wird von einigen Autoren nur für die organisierten lymphatischen Strukturen des Darmes verwendet [11]. Andere Quellen verwenden diesen Ausdruck als Sammelbegriff für organisierte Strukturen inklusive des diffus verteilten Lymphgewebes im Darm. [1, 12]. Im Folgenden wird letztere Nomenklatur verwendet.

2.1.1 Aufbau

Das darmassoziierte lymphatische Gewebe des Huhns beinhaltet organisierte lymphatische Strukturen, wie die Bursa fabricii (BF), die Caecaltonsillen (CT), die Peyer Plaques (PP) und das Meckel-Divertikel (MD) (Abbildung 1).

Ebenfalls zum GALT zählen Zellen, die diffus im Epithel der Schleimhaut und der darunter liegenden Schicht aus Bindegewebe, der Lamina propria (LP), verteilt sind [3]. Hier sind Vertreter aller Zellen des Immunsystems zu finden (Abbildung 3). Man findet B- und T-Lymphozyten, welche zahlenmäßig überwiegen (bis zu 90% der Zellen), Immunglobulin sezernierende Plasmazellen, intra-epitheliale Lymphozyten (IELs), Makrophagen, Dendritische Zellen (DCs), heterophile Granulozyten und Natürliche Killerzellen (NK-Zellen). Die Zusammensetzung der Zellpopulationen kann starke Unterschiede aufweisen, je nach Lokalisation, mikrobieller Besiedlung und Alter. Ebenfalls Einfluss auf das Zellverhältnis haben die Ernährung und Genetik der Tiere und der Kontakt mit pathogenen Mikroorganismen [13]. Lymphknoten, wie sie bei Maus und Mensch zu finden sind, sind beim Huhn nicht entwickelt [1].

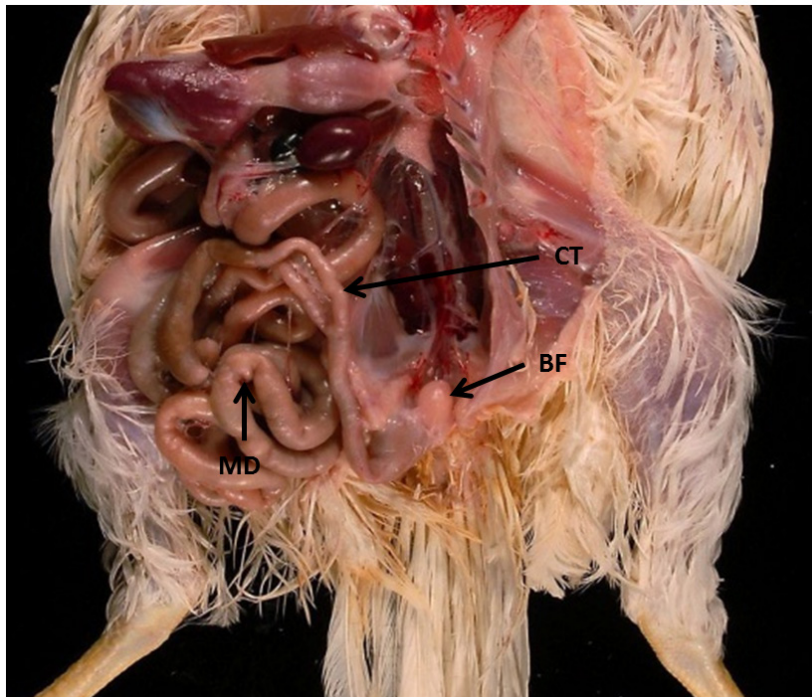


Abbildung 1: Organisierte lymphatische Strukturen des GALT

Lokalisation der organisierten lymphatischen Strukturen des darmassoziierten Gewebes des Huhns. MD = Meckel Divertikel, BF = Bursa fabricii, CT = Caecaltonsillen. Die Peyer Plaques sind nicht dargestellt. (Foto Dr. Sven Reese)

Beim Huhn gibt es drei Immunglobulinklassen: IgM, IgY (das funktionelle Homolog zum Säuger IgG) und IgA. Das aviäre IgM zeigt eine große Ähnlichkeit zum Säuger IgM. Es kommt als Pentamer vor und wird als erster Antikörper nach einer Infektion gebildet. Zudem wird IgM als primärer B-Zell-Rezeptor (*b cell receptor*, BCR) auf den B-Lymphozyten exprimiert. IgY wird hauptsächlich während der sekundären Immunantwort gebildet. Bisher wurden kein IgD oder IgE beim Huhn gefunden, wobei manche Funktionen des Säuger IgEs durch das Hühner IgY übernommen werden [14]. Die sich nach Antigenkontakt ausdifferenzierten Plasmazellen des Darmes befinden sich vor allem im Bereich der Darmkrypten (IgM und IgY). IgA produzierende Plasmazellen, die zahlenmäßig überwiegen, kommen in der gesamten Darmzotte vor.

Die Lymphozyten besiedeln getrennte T- und B-Zell-Areale der Lamina propria. Die T-Zell-Zonen liegen im Allgemeinen im Kern der jeweiligen Darmzotte [15]. Innerhalb dieser T-Zell-Zonen, in den tieferen Schichten der LP, befinden sich B-Zell-Follikel und sogenannte Germinale Zentren (GCs) [16]. Das Germinale Zentrum bezeichnet einen spezialisierten B-Zellfollikel, in dem sich B-Lymphozyten vermehren und auf Antigenbindung selektiert

werden. Histologisch ist das GC definiert als eine Ansammlung von Blastzellen, welche nach Aktivierung durch Antigen in definierten Bereichen von peripheren Geweben auftreten. Beim Huhn konnten zwei Typen an GCs beschrieben werden: GCs, die mit durchgehender Kapsel umschlossen sind, sowie unvollständig bekapselte GCs. Beide Typen weisen die gleichen Zellpopulationen auf, es wird jedoch spekuliert, dass sie sich funktionell unterscheiden [17]. Alternativ handelt es sich um zwei unterschiedliche Entwicklungsstadien [18]. In sich entwickelnden GCs sammeln sich proliferierende B-Lymphozyten um eine Gruppe von Zellen, die mit dem monoklonalen Antikörper 74.3 reagieren. Es handelt sich dabei um sogenannte Follikulär Dendritische Zellen (FDCs, *follicular dendritic cells*). Die sich teilenden B-Lymphozyten wachsen um die FDCs herum, bis sie diese komplett umschließen. Zellen in der Mitte des GC sind nicht mitotisch aktiv. Die Proliferation der B-Zellen erscheint am stärksten in einer B-Lymphozytenschicht direkt unter der Kapsel des GCs.

Ausgereifte GCs sind umgeben von einer Kapsel aus Bindegewebe und weisen keinerlei Blutgefäße auf. Sie enthalten proliferierende B-Lymphozyten, wenige $CD4^+$ T-Lymphozyten und FDCs [1]. Ob B-Lymphozyten in den GCs auch Immunglobuline (Ig) exprimieren wird kontrovers diskutiert. Mast und Godeeris [19] vermuten, dass die Aktivierung von B-Lymphozyten zur Expression von CD57 führt und die Expression von Immunglobulinen herunter reguliert. Jeurissen *et al.* [20] hingegen haben follikuläre B-Lymphozyten beschrieben, die IgM, nicht aber IgY exprimieren. Yasuda *et al.* [21] haben Ig^+ Zellen im zentralen Bereich des GCs, nicht aber im Randbereich nachweisen können. Doppelfärbungen ergaben, dass Igs an die Oberfläche der FDCs binden [22]. Die FDCs können demnach Immunkomplexe einfangen und diese auf ihrer Oberfläche präsentieren [21].

Man unterscheidet zwei Subtypen an T-Lymphozyten im Darm: $\alpha\beta$ -T-Lymphozyten, die einen $\alpha\beta$ -T-Zellrezeptor (*T cell receptor*, TCR), bestehend aus einer alpha und einer beta Kette exprimieren und $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten mit einem $\gamma\delta$ T-Zellrezeptor auf ihrer Oberfläche, der aus einer gamma und einer delta Kette besteht. Bei Hühnern werden die $\alpha\beta$ TCRs unterteilt in $TCR\alpha V\beta 1$, der die variable Domäne (V) $V\beta 1$ exprimiert und $TCR\alpha V\beta 2$, der $V\beta 2$ beinhaltet. Die meisten T-Lymphozyten tragen das Glykoprotein CD4 (*cluster of differentiation 4*) und den $TCR\alpha V\beta 1$ auf ihrer Oberfläche [1]. $CD8^+ TCR\gamma\delta^+$ Zellen und $CD4^+ TCR\alpha V\beta 2^+$ Zellen sind in der gesamten LP verteilt [23], wobei $TCR\alpha V\beta 2^+$ Zellen relativ selten im Dünndarm, jedoch recht zahlreich in der CT vorkommen. Auch $CD8^+$ T-Lymphozyten kommen in der LP vor, allerdings in einer geringeren Anzahl als $CD4^+$ T-Lymphozyten [24].

Makrophagen besiedeln zahlreich die LP und kommen besonders unmittelbar unterhalb des Epithels vor. Sie tragen Haupthistokompatibilitätskomplex (*Major Histocompatibility Complex*, MHC) Klasse-II Moleküle auf ihrer Oberfläche [1].

Auch neutrophile Granulozyten sind Teil des GALT [1]. Im Huhn werden diese als heterophile Granulozyten bezeichnet, übernehmen aber weitestgehend analoge Aufgaben zu den neutrophilen Granulozyten von Maus und Mensch [25]. Beim gesunden Huhn treten allerdings sehr wenige heterophile Granulozyten im Epithel auf. Infektionen können zu einer raschen Translokation dieser Zellen in das Epithel führen [13, 26].

Der Übergang von der LP zum Epithel der Darmschleimhaut wird klar von einer durchgängigen Basalmembran begrenzt. Der Basalmembran sitzt ein einschichtiges Zylinderepithel auf, welches von schleimproduzierenden Becherzellen durchsetzt ist [1].

Zwischen den Epithelzellen des Darmes findet sich eine heterogene Population an intraepithelialen Lymphozyten (IELs). Untersuchungen von Bäck *et al.* zeigten, dass diese aus der LP in das Epithel einwandern [27, 28]. Die CD3⁺ Zellen der IELs exprimieren vornehmlich den $\gamma\delta$ T-Zellrezeptor und sind CD8 α ⁺ [24]. Allerdings sind 30% der CD8 α ⁺ Zellen CD3⁻ und tragen stattdessen das 28-4 Antigen auf ihrer Oberfläche [29]. Einige Zellen der IELs exprimieren das Hühner B6 Antigen (chB6) [30]. Diese Population konnte jedoch bisher nicht klar definiert werden. Da auch bei bursektomierten Tieren diese Zellen auftraten, bleibt ihr Ursprung bisher unbekannt [31]. Auch die Zellzusammensetzung der IELs ist abhängig von Alter, Genetik und Umwelteinflüssen [30].

Die Enterozyten der Darmschleimhaut spielen ebenfalls eine entscheidende Rolle in der Organisation und Funktion des Darmimmunsystems. Sie bilden die physikalische Barriere zwischen der Vielzahl an Antigenen im Darminhalt und dem Körper des Wirts. Der von den Becherzellen produzierte Schleim bildet eine luminal den Epithelzellen aufliegende Schutzschicht. Dieser Schleim besteht zu einem großen Teil aus Glykoproteinen, den sogenannten Mucinen. Mucine werden funktionell in zwei Gruppen unterteilt. Sie können sezerniert werden oder membranständig vorkommen. Neun Mucingene konnten bisher für das Huhn identifiziert werden (Muc1, Muc2, Muc4, Muc5ac, Muc5b, Muc6, Muc13, Muc16 und Ovomucin). Muc2 codiert für das Hauptmucin der gelbildenden Mucine, das im Dickdarm von Mensch und Huhn produziert wird. Beim Säuger bilden Muc2 Mucine zwei voneinander getrennte Schichten auf den Epithelzellen. Die erste Schicht, welche den Epithelzellen direkt aufliegt, enthält im Gegensatz zu der dem Lumen zugewandten Schicht, keine kommensalen Bakterien. Muc2 defiziente Knockout Mäuse, weisen eine erhöhte Anzahl an Darmbakterien

innerhalb der Darmkrypten auf, was darauf hinweist, dass Mucine eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung des Gleichgewichts zwischen kommensalen Bakterien und Wirt spielen [1].

Die in den Lieberkühnkrypten des Säugers vorkommende Paneth-Zelle, welche die antimikrobiell wirksamen Substanzen Lysozym, Phospholipase A₂, sowie α - und β -Defensine sezerniert, konnte beim Huhn bisher nicht nachgewiesen werden [32]. Es konnten jedoch dreizehn β -Defensine bei Hühnern beschrieben werden [33]. Diese aviären β -Defensine (AvBD), werden von heterophilen Granulozyten, Makrophagen und an mukosalen Oberflächen produziert und spielen eine wichtige Rolle in der Abwehr einer Vielzahl an Pathogenen [34]. Defensine sind kationische Proteine, welche Zellmembranen durchlöchern und damit Zelllyse auslösen können [33].

Durch die Expression von Muster-Erkennungs-Rezeptoren (*pattern recognition receptors*, PRRs), wie die Toll-ähnlichen Rezeptoren (*toll like receptors*, TLRs) und die NOD-ähnlichen Rezeptoren (*NOD-like receptors*, NLRs), können die Enterozyten ebenfalls Einfluss auf die Immunreaktion des Darmes nehmen. Im gesamten Intestinaltrakt des Huhns werden TLRs exprimiert, welche das Eindringen von Pathogenen detektieren und eine antimikrobielle Immunantwort initiieren [35]. Aus Mausmodellen ist bekannt, dass anhaltende Stimulation durch kommensale Mikroorganismen, zu einer verringerten Oberflächenexpression von TLRs an Enterozyten führt. Vielmehr werden diese in die intrazellulären Kompartimente und an die Basalmembran verlagert. Dadurch gelingt es, eine Immunreaktion gegen Kommensalen zu verhindern und gleichzeitig die Fähigkeit zu erhalten, eindringende Pathogene detektieren zu können [36]. Des Weiteren tragen alle Enterozyten MHC-Klasse-I Moleküle auf ihrer Oberfläche. Im Zuge von Entzündungsreaktionen kann auch die Expression von MHC-Klasse-II Molekülen induziert werden. Daher sind Enterozyten in der Lage mit T-Lymphozyten zu interagieren [1].

Die Bursa fabricii ist ein haselnussgroßes Divertikel dorsal der Kloake und stellt sich als Gewebefalten dar, die ein zentrales Lumen umschließen (Abbildung 1) [37]. Sie ist ein primäres lymphatisches Organ, welches ausschließlich bei Vögeln zu finden ist und essentiell für die Entwicklung und Reifung der B-Lymphozyten des Huhns ist [12]. Das Lumen der Bursa ist über den schlitzförmigen Bursakanal mit der Lumen des Enddarms verbunden. In den Gewebefalten sind die sogenannten Bursafollikel lokalisiert, welche die eigentlichen funktionellen und strukturellen Einheiten der Bursa darstellen. Jeder Follikel einer immunologisch reifen Bursa besteht aus Rinde (Cortex) und Mark (Medulla), die strukturell

durch eine Basalmembran voneinander getrennt sind und auch funktionell eigenständige Bereiche darstellen. Die gesamte Bursa ist nach außen durch eine Bindegewebskapsel abgegrenzt [38]. Die Follikel sind dicht besiedelt von lymphoiden Zellen, wobei die Zellen im Mark verglichen mit jenen in der Rinde, weniger dicht gepackt liegen. Das Mark steht über das sogenannte follikelassoziierte Epithel (näher beschrieben im folgenden Abschnitt über die Caecaltonsille) mit dem Bursa-Lumen in Verbindung [39]. Dieses macht etwa zehn Prozent der gesamten inneren Auskleidung der Bursa aus, die restlichen 90% werden als interfollikuläres Epithel (IFE) bezeichnet [39]. Am FAE findet in gewissem Umfang eine Antigenaufnahme aus dem Bursalumen ins Follikelmark statt [40], wodurch die Bursa auch als sekundäres lymphatisches Organ fungieren kann [1]. Die Verbindung von Bursalumen zum Darmlumen ist essentiell für eine physiologische Ausprägung von Rinde und Mark der Bursa [41].

Die Caecaltonsille ist wie die Bursa eine umfassend untersuchte Struktur des aviären GALT. Sie ist paarig angelegt und an der Basis der Blinddärme, oberhalb des ileocaecalen Übergangs, lokalisiert (Abbildung 1). Es handelt sich um ein großes Lymphaggregat in der medialen Wand der Blinddärme, welches sich makroskopisch als olivenkerngroße Verdickung darstellt, die sich in das Darmlumen vorwölbt. Die mikroskopische Grundeinheit der CT enthält eine zentrale Krypte mit vielen kleineren Abzweigungen, umgeben von lymphatischem Gewebe, welches GCs enthält und mit follikelassoziiertem Epithel (FAE) überzogen ist (Abbildung 2) [42]. Das follikelassoziierte Epithel besteht aus Enterozyten sowie einer geringen Anzahl von spezialisierten Epithelzellen, den sogenannten Mikrofaltenzellen (M-Zellen) [42-44]. Diese besitzen an der luminalen Seite anstelle von Mikrovilli eine gefaltete Oberfläche. Im Gegensatz zu Enterozyten sezernieren die M-Zellen keine Verdauungsenzyme und keinen Schleim. Ihnen fehlt außerdem an der Oberfläche die dicke Glykokalyx, weshalb sie für Mikroorganismen im Darmlumen leicht zugänglich sind. Sie können Antigene aufnehmen und diese an Antigenpräsentierende Zellen in der LP weitergeben [3]. Die subepitheliale Zone der CT enthält vor allem IgM^+ B-Lymphozyten, einige IgY^+ B-Lymphozyten, hin und wieder IgM^+ und IgA^+ Plasma Zellen, wenige CD4^+ und CD8^+ T-Lymphozyten, welche $\gamma\delta$ - oder $\alpha\text{V}\beta 1$ -TCR exprimieren. Mononukleäre Phagozyten können in der ganzen Tonsille vorkommen, sind aber meistens direkt unter dem Epithel zu finden. Die interfollikulären T-Zell-Zonen enthalten hauptsächlich $\text{CD4}^+\text{TCR}\alpha\text{V}\beta 1^+$ -Zellen [1].

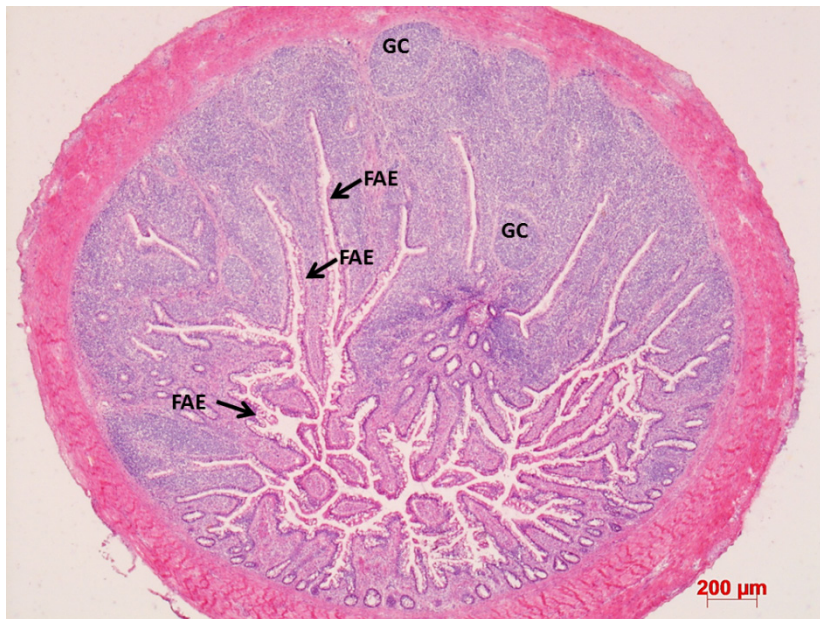


Abbildung 2: Mikroskopische Darstellung der Caecaltonsille

Hämatoxylin-Eosin Färbung der Caecaltonsille eines 28 Tage alten Huhns. GC = Germinales Zentrum, FAE = follikelassoziiertes Epithel

Lymphoide Aggregate wie die Peyer Plaques der Säuger finden sich auch im Darm des Huhns [43]. Bis zu sechs PP treten in unregelmäßigen Abständen entlang des Hühnerdünndarms auf. Eine dieser PP findet sich stets vor dem Übergang des Ileums zum Caecum [45]. Innerhalb der PP sind die Darmzotten verdickt und mit FAE überzogen. Strukturell sind die PP den CT sehr ähnlich. Das lymphatische Gewebe ist in der LP der Zotten lokalisiert, kann jedoch bis in die Tela submucosa reichen. Es enthält B-Zellfollikel, GCs und T-Zell-reiche interfollikuläre Zonen [42].

Als Meckel-Divertikel wird eine makroskopisch sichtbare Ausstülpung an der antimesenterialen Wand des Jejunums bezeichnet (Abbildung 1). Es stellt ein Residuum des embryonalen Dottersacks dar. Nach dessen Rückbildung kommt es zur Ansammlung von lymphatischem Gewebe im Divertikel, welches ebenfalls lymphatische Follikel enthält und wahrscheinlich als myelopoetisches und lymphopoetisches Organ fungiert [42].

Isolierte lymphatische Follikel (ILFs), welche strukturell weniger gut definiert sind als PP und CT, kommen im gesamten Dün- und Dickdarm vor. Sie bestehen hauptsächlich aus B-Lymphozyten, sind mit FAE überzogen und können GCs enthalten. In gehäufte Anzahl findet man ILFs in der apikalen Region des Blinddarms (Caecum) des Huhns [46].

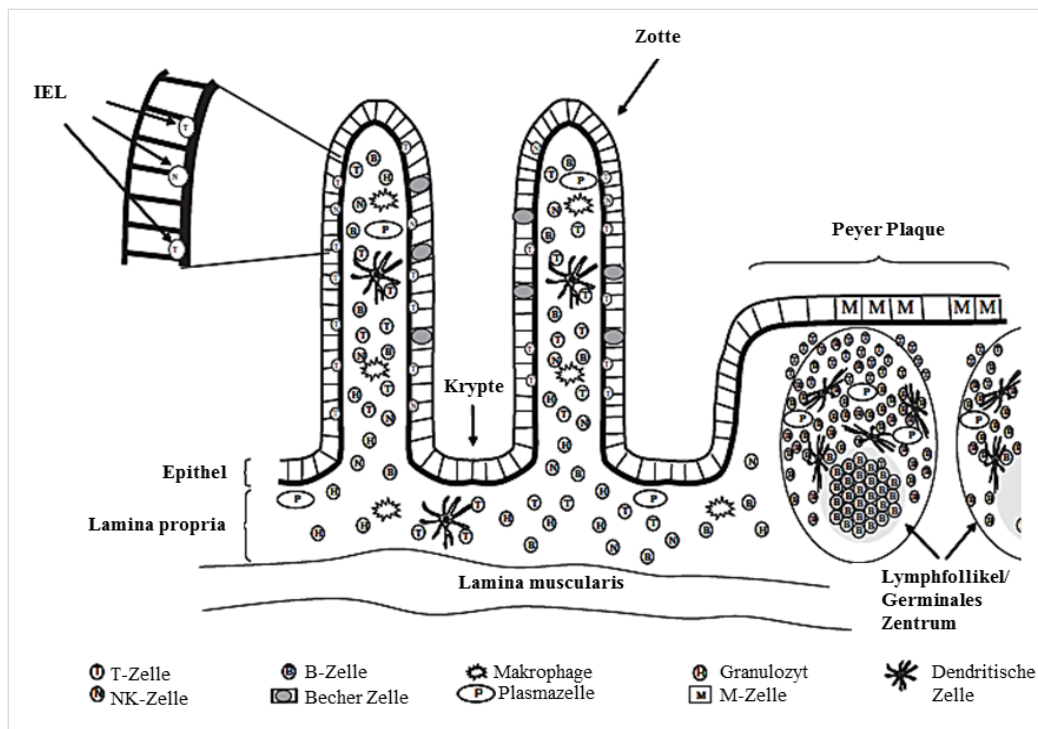


Abbildung 3: Schematische Darstellung des GALT im Dünndarm

Das Immunsystem des Darms unterteilt sich in verschiedene Kompartimente. Es enthält alle Zellen der Immunabwehr. IEL= Intra-epitheliale Lymphozyten, NK= Natürliche Killerzelle (Modifiziert nach Smith, Powers und Beal [1])

2.1.2 Entwicklung

Nach dem Schlupf der Küken muss sich die Grundstruktur des Darmes zunächst voll entwickeln. Die Entwicklung von Zotten und Krypten ist erst nach ca. 5 Tagen abgeschlossen [47]. Während dieser Zeit durchlaufen auch die Enterozyten eine intensive Reifung und verändern ihre Form vom Quadrat ausgehend hin zur Säulenform. Außerdem bilden sich Mikrovilli an ihrer luminalen Oberfläche [48]. Die Differenzierung von Enterozyten zu Becherzellen geschieht bereits in der Embryonalphase, jedoch kommt es nach dem Schlupf zu einem Anstieg in der Anzahl der Becherzellen. Der Stimulus hierfür scheint unter anderem die Besiedlung des Darms mit Mikroorganismen zu sein, da bei keimfrei gehaltenen Hühnern eine reduzierte Anzahl von Becherzellen festgestellt werden konnte [1]. Die strukturelle Entwicklung ist erst nach frühestens 4 Wochen abgeschlossen. In dieser Zeit nimmt die Komplexität der einzelnen Strukturen zu und die Zellzusammensetzung verändert sich [48]. Des Weiteren steigt in dieser Zeit die Anzahl der Immunzellen in der LP und der IELs stetig an [45, 49]. Am Tag des Schlupfes sind nur wenige IELs vorhanden, welche sich im Laufe

der ersten Lebenswochen vermehren. Im Laufe des Lebens sinkt ihre Anzahl jedoch wieder deutlich ab [50]. Die Lymphozyten besiedeln den Darm, nachdem sie aus den primären lymphatischen Organen ausgewandert sind. Dunon *et al* [51] zeigten, dass T-Lymphozyten aus dem Thymus in drei Wellen auswandern. Die erste Welle an $\text{TCR}\gamma\delta^+$ -Zellen wandert an Embryonaltag (EID, *embryonic incubation day*) 17 in die Peripherie aus. An EID 18 bis 20 kommt es zum Export von $\text{TCR}\alpha\beta^+$ -Zellen. Zum Zeitpunkt des Schlupfes wandert eine zweite Welle an $\text{TCR}\gamma\delta^+$ -Zellen aus dem Thymus aus, gefolgt von der Auswanderung der $\text{TCR}\alpha\beta^+$ -Zellen zwei bis vier Tage später. Die dritte Welle an T-Zell-Export findet 6 bis 8 Tage nach dem Schlupf statt. Dabei werden $\text{TCR}\gamma\delta^+$ -Zellen ungefähr 2 Tage früher als $\text{TCR}\alpha\beta^+$ -Zellen exportiert. B-Lymphozyten beginnen um EID 18 herum aus der Bursa in die Peripherie auszuwandern [52].

Die höchste Anzahl an Zellen des Immunsystems sind ungefähr 8 Wochen nach dem Schlupf im Darm zu finden. In Genexpressionsstudien zeigten Bar-Shira *et al.* [53] die altersabhängige Veränderungen der Lymphozytenpopulation in verschiedenen Darmabschnitten. Eine deutlich erhöhte mRNA (*messenger ribonucleic acid*) Abundanz des Pan-T-Zell Markers CD3 konnte in allen Darmabschnitten am vierten Lebenstag gemessen werden. Ein signifikanter Anstieg der Menge an B-Zell-spezifischer mRNA konnte ebenfalls 4 Tage nach dem Schlupf im Dünndarm, sowie zwei Tage später im Dickdarm und der CT detektiert werden. Die Autoren gehen davon aus, dass die Lymphozyten des GALTs zum Zeitpunkt des Schlupfes funktionell unausgereift sind. Diese Annahme ergab sich aus der gemessenen Menge an spezifischer mRNA für die Zytokine Interleukin-2 (IL-2) und Interferon- γ (IFN- γ). Die Lymphozyten des GALTs scheinen in zwei Phasen funktionell zu reifen, wobei die erste Phase in der ersten Lebenswoche stattfindet und der zweite Reifungsprozess in der zweiten Woche nach dem Schlupf auftritt [53]. Das Zahlenverhältnis der verschiedenen Zelltypen zeigt ebenfalls deutliche Veränderungen in den ersten vier Lebenswochen. So erhöht sich zum Beispiel der Anteil an $\text{TCR}\gamma\delta^+$ -Zellen und $\text{CD8}\alpha^+$ -Zellen im IEL Kompartiment. In der LP hingegen steigt die Zahl an $\text{TCR}\alpha\beta^+$ -Zellen proportional an [54]. Die Zellen des angeborenen Immunsystems entwickeln sich früher als die T- und B-Lymphozyten. Zum Zeitpunkt des Schlupfes sind bereits zahlreiche Granulozyten und Monozyten bzw. Makrophagen vorhanden [1].

Ab EID8 bis EID10 beginnen die präbursalen B-Zellen aus dem Knochenmark über das Blut in das Mesenchym der Bursa-Anlage einzuwandern. In der Folge kommt es ab EID12 bis EID14 zur Ausbildung der eigentlichen Bursa-Follikel und die B-Zellvorläufer beginnen stark zu proliferieren und ihr B-Zell-Rezeptor-Repertoire zu diversifizieren. Erst nach dem Schlupf

kommt es zu einer Umstrukturierung der B-Zell-Follikel, die zur Unterteilung des bis dahin homogenen Follikels in Rinde und Mark führt [55]. Bis zum zweiten Lebensmonat nimmt die Anzahl der Bursa-follikel stetig zu. Ab dem fünften Lebensmonat kann eine Atrophie der Bursa beobachtet werden, die letztendlich zur vollständigen Rückbildung des Organs führt. Nach sechs Monaten ist die Involution abgeschlossen, so dass nur ein Residuum ohne lymphatische Strukturen zurück bleibt [42].

Die Organanlage der CT entsteht ebenfalls bereits im Embryonalstadium. Lymphozyten finden sich dort ab EID 18. Das Wachstum der CT erfolgt jedoch erst nach dem Schlupf. In der ersten Lebenswoche entwickelt sich die adulte Grundstruktur, das Wachstum hält jedoch bis mindestens 6 Wochen nach dem Schlupf an. T-Lymphozyten, welche vor allem TCR $\alpha\beta$ und CD4 exprimieren, dominieren in der Zellzusammensetzung der CT bis in die zweite Lebenswoche. Danach finden sich in der CT vor allem IgM⁺ und wenige IgA⁺ B-Lymphozyten. Außerdem überwiegen zu diesem Zeitpunkt CD8⁺ T-Lymphozyten über CD4⁺ T-Lymphozyten. Erste GCs entstehen in der ersten oder spätestens der zweiten Lebenswoche. Ihre Anzahl steigt im Laufe der ersten Lebenswochen weiter an [49]. Ab dem 10. Lebenstag ist die CT makroskopisch sichtbar [45].

Die PP nehmen bis zur 12. Lebenswoche an Größe zu, danach kommt es zur Involution, was in einer verringerten Zellpopulation des subepithelialen Bereichs, einer reduzierten Anzahl an Follikeln und degeneriertem FAE führt. Die Involution verläuft allerdings individuell unterschiedlich. Ab Tag 10 nach dem Schlupf sind in der Regel 1 bis 2 PP identifizierbar. Mit 16 Wochen weisen die Tiere meist 5 PP auf und mit 58 Wochen ist durchschnittlich noch 1 PP vorhanden [45].

Das lymphatische Gewebe des Meckel Divertikels vermehrt sich schrittweise im Zuge der ersten Lebenswochen. Zum Zeitpunkt des Schlupfes bildet das Epithel longitudinale Falten. Unterhalb des Epithels sammeln sich kleine Gruppen an lymphatischen Zellen (CD45⁺, IgM⁺ B-Lymphozyten, Mononukleäre Phagozyten) an, die sich nach und nach vermehren, wodurch die Falten mit lymphatischem Gewebe aufgefüllt werden. Nach zwei bis drei Monaten entwickeln sich GCs, welche sich nahe der Lamina muscularis ansiedeln. Dieses, im Vergleich zu den PPs und den CTs relativ späte Auftreten an GCs, ist vermutlich bedingt durch den geringeren Kontakt zu Antigenen [1].

2.1.3 Funktion

Für eine vollständige Beschreibung der funktionellen Aspekte des Darmimmunsystems des Huhns fehlt es bisher an Untersuchungen. Um einen Überblick über die Funktionen des Hühner GALTs zu gewinnen, kann in vielerlei Hinsicht jedoch auf das Wissen aus jahrzehntelanger Forschung am Säuger zurückgegriffen werden, da vorliegende Daten auf weitgehende Übereinstimmung mit den Vorgängen bei Mensch und Maus hinweisen.

An der Abwehrfunktion des Darmes sind sowohl angeborene, als auch adaptive Mechanismen beteiligt.

Die beste Strategie des Darmimmunsystems besteht darin, zu verhindern, dass Mikroorganismen an die Enterozyten binden, da dies die Voraussetzung für das Eindringen in den Wirt darstellt. Dies kann zum einen unspezifisch, durch die Sekretion von antimikrobiellen Substanzen (Mucine, Defensine) oder durch die Sekretion von spezifischen neutralisierenden Antikörpern in das Darmlumen erreicht werden [48].

Lillehoj *et al.* [12] beschreiben beim Huhn IgM, welches als Pentamer vorliegt und IgA, welches als Monomer oder dimerisiert vorkommt, als vorherrschende in das Darmlumen sezernierte Immunglobuline. Sie gehen davon aus, dass das im Darm vorkommende IgY aus der Zirkulation oder den Lymphgefäßen stammt, was durch die erhöhte Permeabilität im Zuge einer Infektion ermöglicht wird. Friedmann *et al.* [48] hingegen zählen zu den neutralisierenden Antikörpern im Darm zum einen IgY, zum anderen monomeres oder dimeres IgA. IgY und dimeres IgA werden über die Gallenflüssigkeit in den Dünndarm und über den Bursagang in den Dickdarm freigesetzt. IgA und IgY sezernierende Plasmazellen sind laut Friedmann *et al.* in der Darmwand angesiedelt [48, 56].

Die Epithelzellen des Darmes der Maus exprimieren an ihrer basolateralen Oberfläche den polymeren Immunglobulinrezeptor (Poly-Ig-Rezeptor, pIgR), an den dimeres IgA bindet. Der Immunglobulin-Rezeptor-Komplex wird in die Epithelzelle aufgenommen und gelangt durch Transzytose an die Epitheloberfläche des Darmlumens. Dort wird das IgA durch proteolytische Spaltung der extrazellulären Domäne des pIgR freigesetzt. Das sezernierte IgA bleibt mit einem Teil des Rezeptors assoziiert (sekretorische Komponente), deshalb wird es als sekretorisches IgA bezeichnet. Über Kohlenhydratdeterminanten bindet das sezernierte IgA an die Schleimschicht auf den Epithelzellen und wird dort verankert [3]. Ein Hühner pIgR konnte von Wieland *et al.* in der Leber, im Darm und in der Bursa fabricii nachgewiesen werden [57].

Bindet ein Antigen an die PRRs, die von Enterozyten und diversen Zellen des Immunsystems exprimiert werden, so wird in der Folge das Darmimmunsystem aktiviert [1]. Es kommt zur Infiltration des Gewebes mit heterophilen Granulozyten, die eindringende Pathogene bekämpfen und außerdem andere Zellen des Immunsystems anlocken können [25]. Gleichzeitig spielen zu Beginn einer Infektion die angeborenen Immunzellen (Makrophagen, NK-Zellen, $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten) eine wichtige Rolle in der Eindämmung der Infektion und der Beseitigung des Erregers, indem sie zytotoxisch wirken, Zytokine produzieren oder Antigen phagozytieren [1].

In den Wirt eindringende Antigene werden innerhalb des Epithels zunächst mit der Population der IELs konfrontiert. In ihrer Zell-Zusammensetzung unterscheiden sich die IELs des Huhns, von der des Säugers [54], funktionell bestehen jedoch viele Gemeinsamkeiten [48]. IELs, die beim Huhn zum großen Teil aus $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten und NK-Zellen bestehen sind in der Lage, nach Aktivierung sofort zu reagieren und Antigene zu bekämpfen. Viele von ihnen enthalten intrazelluläre Granula mit Perforin und Granzymen, durch die sie zytotoxisch wirken können [3]. Ihre Aktivität wird reguliert durch Zytokine, die unter anderem von $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Lymphozyten sezerniert werden [58, 59]. Intraepitheliale $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten spielen außerdem eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Homöostase des Epithels indem sie beispielsweise Wachstumsfaktoren für die Epithelzellen sezernieren [60].

Antigene aus dem Darmlumen, welche die epitheliale Barriere durchbrechen oder von M-Zellen des FAEs der organisierten Strukturen des GALTs (PP, CT) durch Transzytose in die LP transportiert worden sind, werden dort von Dendritischen Zellen aufgenommen. Diese verarbeiten das antigene Material, um es den T-Lymphozyten zu präsentieren. Die DCs werden durch Chemokine angelockt, welche von den Epithelzellen freigesetzt werden. In Bereichen des Darmes, die nicht mit FAE überzogen sind, können DCs außerdem in das Epithel einwandern oder ihre Fortsätze zwischen die Epithelzellen schieben, ohne diese zu verletzen. Dadurch sind DCs auch ohne die Hilfe von M-Zellen in der Lage Antigene aus dem Darmlumen aufzunehmen. Die antigenbeladenen DCs wandern dann in die T-Zell-Region der PP oder der CT. Dort treffen sie auf naive antigenspezifische T-Lymphozyten und aktivieren diese. Einige der aktivierten T-Lymphozyten entwickeln sich zu $CD4^+$ T-Helfer-Zellen, welche wiederum naive B-Lymphozyten, die für das gleiche Antigen spezifisch sind, aktivieren können [3]. Beim Huhn wurden ebenfalls DCs identifiziert [61], allerdings bis heute nicht funktionell charakterisiert.

Wenn ein naiver Lymphozyt im GALT auf sein spezifisches Antigen trifft, so wird er dazu

stimuliert darmspezifische Homing-Rezeptoren und Integrine zu exprimieren. Dabei handelt es sich beispielsweise um das $\alpha_4\beta_7$ Integrin und die Chemokinrezeptoren CCR9 und CCR10 [3, 62]. Das $\alpha_4\beta_7$ Integrin bindet an das für mukosale Gefäße spezifische Adressin MAdCAM-1. Die Chemokine CCL25 (im Dünndarm) und CCL28 (im Dickdarm) sind die Liganden für CCR9 und CCR10. Dadurch werden die Lymphozyten an ihren Bestimmungsort im Darm gelockt [3]. Die Aktivierung der naiven Lymphozyten führt zur Differenzierung zu Effektorlymphozyten oder zur Bildung von Gedächtniszellen. Die aktivierten Lymphozyten verlassen das GALT und gelangen über den Ductus thoracicus in die Zirkulation. Über kleine Blutgefäße in der LP kehren sie selektiv in die mukosalen Gewebe zurück. Haury *et al.* haben ein Antigen (A19) beim Huhn beschrieben, welches der Integrin Familie zugeordnet werden konnte und vermutlich dazu dient, IELs im Epithel zu verankern [63]. Ein funktionelles Homolog des Säugers bildet hier das $\alpha_E\beta_7$ Integrin, welches E-Cadherin an der Oberfläche der Epithelzellen bindet [3].

Die meisten Lymphozyten des Darmes weisen den Phänotyp eines aktivierten Lymphozyten, also eines Effektorlymphozyten, auf. Dies ist vermutlich das Ergebnis von lokalen Reaktionen, die fortlaufend gegen eine Vielzahl an harmlosen Antigenen aus Futter, Umwelt und kommensalen Mikroorganismen stattfinden. Erkrankungen treten durch sie jedoch selten auf, da es starke regulatorische Mechanismen gibt, die verhindern, dass es zu einer Entzündungsreaktion kommt [3].

Die B-Lymphozyten bilden in den sekundär lymphatischen Organen des GALT nach Antigenkontakt Germinale Zentren. In diesen kommt es unter Einfluss von $CD4^+$ T-Lymphozyten (follikuläre T-Helferzellen, T_{FH} Zellen) zur Proliferation antigenspezifischer B-Lymphozyten. T_{FH} Zellen exprimieren in hohem Maße costimulierende Moleküle, wie beispielsweise CD40 Ligand (CD40L) und *programmed cell death-1* (PD1) und Zytokine (IL-21 und IL-4), welche mit regulatorischen Funktionen und B-Zell-Hilfe assoziiert sind [64]. Im Zuge dessen findet eine Affinitätsreifung des Immunglobulin-Rezeptors durch Genkonversion und somatische Hypermutation sowie der Klassenwechsel von IgM zu IgA und IgG (IgY) statt [21, 65, 66]. Einige der entstehenden Zellen tragen daraufhin einen Rezeptor, der besser an das Antigen bindet und werden vorzugsweise zu reifen, Antikörper produzierenden Plasmazellen und langlebigen Gedächtniszellen selektiert. Bei der somatischen Hypermutation werden in einer hohen Rate Punktmutationen in die bei der primären B-Zell-Entwicklung rearrangierten Genesegmente (V-D-J) der leichten und schweren Kette des BCRs eingeführt [67]. Bei der Genkonversion werden Teile des rearrangierten Immunglobulinmolekül-Gens durch Fragmente aus sogenannten Pseudogenen ersetzt [68].

Diese Vorgänge der Affinitätsreifung und der Klassenwechsel hängen essentiell von dem Enzym aktivierungsinduzierte Cytidin-Desaminase (*activation-induced cytidine deaminase*, AID) ab, welches von den B-Lymphozyten des GC exprimiert wird [64, 69]. Die FDCs haben in den GCs zum einen die Aufgabe, B-Lymphozyten durch Ausschüttung des Chemokins CXCL13 in den Follikel zu locken [3], zum anderen binden sie Antigen, welches durch Antikörper markiert wurde, als Immunkomplex auf ihrer Oberfläche, um diesen den B-Lymphozyten zu präsentieren. Wenn im Zuge der Affinitätsreifung ein BCR für das von den FDCs präsentierte Antigen spezifisch ist, wird dieser B-Lymphozyt dazu angeregt, sich vermehrt zu teilen [70].

Auch beim Huhn bilden B-Zellen GCs aus, in deren Zentrum FDCs und CD4⁺ T-Zellen immunhistologisch nachgewiesen werden konnten [21]. Funktionell ist das GC beim Huhn nur wenig untersucht worden. Es konnte aber gezeigt werden, dass die B-Zellrezeptoren im GC mittels Genkonversion und Somatischer Hypermutation verändert werden [65, 71]. Auch lassen sich immunhistologisch in den GCs IgY⁺ und IgA⁺ B-Zellen anfärben, was stark dafür spricht, dass es auch im Hühner-GC zum Immunglobulin-Klassenwechsel kommt [21]. Folglich entsprechen die GCs beim Huhn in ihrer Funktion sehr wahrscheinlich denen des Säugers.

Die Biologie von Hühner T-Lymphozyten weist viele Gemeinsamkeiten, mit der des Säugers auf [72]. Analog zu Maus und Mensch besitzt das Huhn CD4⁺ T-Lymphozyten und CD8⁺ T-Lymphozyten. CD4⁺ T-Lymphozyten sind T-Helferzellen (Th), auch inflammatorische T-Zellen genannt, die durch MHC-Klasse-II präsentierte Antigen erkennen [73]. Die T-Helferzellen unterteilen sich beim Säuger in weitere Subpopulationen, wie zum Beispiel Th1, Th2, Th17 oder die follikulären Th-Zellen [3]. Bei Mäusen kommt es bei einer Infektion mit intrazellulären Erregern zu einer IFN- γ , IL-12, IL-18 vermittelten Th1-Antwort. Die Th2-Antwort dagegen, durch IL-4, IL-5, IL-6, und IL-13 vermittelt, wird assoziiert mit einer Antikörperproduktion und der Immunantwort gegen Helminthen [3]. Auch beim Huhn gibt es Hinweise, dass eine Th1/Th2 Polarisation bei Immunantworten auftritt [74-77]. CD8⁺ T-Lymphozyten sind zytotoxische T-Zellen, die durch MHC-Klasse-I präsentierte Antigen erkennen [73].

Die T-Lymphozyten in der LP des Säugers proliferieren nur wenig, wenn sie durch ein Antigen stimuliert werden, aber sie sezernieren auch ohne Vorhandensein einer Infektion große Mengen an Zytokinen wie beispielsweise Interferon- γ (IFN- γ), Interleukin-5 (IL-5) und IL-10. CD4⁺ T-Lymphozyten unterstützen möglicherweise die Plasmazellen bei der Bildung

von Immunglobulinen, oder sie fungieren als regulatorische T-Zellen und tragen dazu bei Überempfindlichkeitsreaktionen auf Nahrungsbestandteile und kommensale Mikroorganismen zu verhindern. Aktivierte $CD8^+$ T-Lymphozyten können sowohl Zytokine produzieren, als auch zytotoxisch aktiv sein [3].

Eine sehr wichtige Eigenschaft des mukosalen Immunsystems ist die Fähigkeit zwischen Krankheitserregern und harmlosen Antigenen aus der Nahrung und der kommensalen Bakterienflora zu unterscheiden. Die spezifische, periphere Unempfindlichkeit gegen ein Proteinantigen wird als orale Toleranz bezeichnet [3]. Die Mechanismen der oralen Toleranz sind bisher nur teilweise bekannt. Eine wichtige Rolle bei der Toleranz gegenüber Nahrungsproteinen spielen regulatorische $CD4^+CD25^+$ T-Lymphozyten (Tregs), die den transformierenden Wachstumsfaktor β (TGF- β) und IL-10 produzieren [78]. TGF- β besitzt viele immunsuppressive Eigenschaften und stimuliert außerdem den Isotypwechsel der B-Lymphozyten zu IgA, welches einen nicht entzündungsfördernden Antikörper darstellt [3]. Kommensale Bakterien lösen ebenfalls keine systemische Immunantwort aus. Im Gegensatz zu pathogenen Bakterien, besitzen kommensale Organismen keine Virulenzfaktoren, die für das Durchdringen des Epithels notwendig sind. Daher ignoriert das systemische Immunsystem ihre Anwesenheit, obwohl sie von Lymphozyten im GALT erkannt werden [3]. Beim Säuger kommt dies unter anderem dadurch zustande, dass lokale DCs durch lösliche Faktoren, welche von Enterozyten als Reaktion auf kommensale Mikroorganismen produziert werden (z. B. TGF- β , Prostaglandin E_2), in eine Art Ruhezustand versetzt werden und weniger costimulierende Moleküle exprimieren, welche für die Aktivierung von entzündungsfördernden Effektorzellen essentiell sind. Dadurch differenzieren sich aktivierte T-Lymphozyten primär zu regulatorischen T-Lymphozyten [3, 79]. T-Zell-unabhängig, lokal produziertes IgA, mit breiterer Spezifität und niedriger Affinität, verhindert, dass die kommensalen Bakterien sich an das Epithel anheften und hält das Gleichgewicht zwischen Wirt und Kommensalen aufrecht [80-82].

DCs sind beim Huhn bisher nicht vollständig charakterisiert, es ist aber anzunehmen, dass hier ähnliche Mechanismen vorliegen [33]. Auch wenn das volle Zytokinrepertoire vom Huhn noch nicht identifiziert worden ist, so konnte jedoch nachgewiesen werden, dass Vertreter der kommensalen Mikroflora in der Lage sind, Zytokin und Chemokin Genexpression im Hühnerdarm zu beeinflussen [83, 84].

2.2 EINFLUSS DER MIKROFLORA AUF DEN WIRT

Durch jahrzehntelange und intensive Forschung ist inzwischen bekannt, dass kommensale Mikroorganismen nicht nur harmlos für den Wirt sind, sondern einen wichtigen Faktor für die Gesundheit desselbigen darstellen.

2.2.1 Mikrobiota

Kommensale Mikroorganismen, welche die Haut und Schleimhäute von allen Wirbeltieren besiedeln und mit dem Wirt in Symbiose leben, werden unter dem Begriff Mikrobiota zusammengefasst. Diese Mikrobiota bestehen zum Großteil aus Bakterien, beinhalten aber auch Archäen, Viren, Pilze und Protozoen. Die größte Anzahl an kommensalen Mikroorganismen findet sich im Gastrointestinaltrakt, und vor allem im Darm des Wirts. Dort leben etwa 1000 verschiedene Spezies in einer Dichte von 10^2 Zellen pro Gramm Inhalt im Dünndarm sowie bis zu 10^{12} Zellen pro Gramm Inhalt im Dickdarm [4]. Diese komplexe Gemeinschaft an Mikroorganismen stellt dem Wirt eine Vielzahl an Enzymen für die Nährstoffprozessierung zur Verfügung, wirkt als natürlicher Konkurrent von Krankheitserregern und hat wesentlichen Einfluss auf viele Aspekte der Wirtsphysiologie, insbesondere auf die Induktion, Entwicklung und Funktion des Immunsystems [85].

Im letzten Jahrzehnt ist intensive Forschung im Bereich Mikrobiota betrieben worden, so dass inzwischen eine Vielzahl an Publikationen zu den weitreichenden Einflüssen der Mikrobiota auf den Wirt zu finden sind [2, 4, 85, 86]. Der Großteil dieser Untersuchungen beschränkt sich jedoch auf die Vorgänge bei Mensch und Maus, so dass der Nachweis auf Übereinstimmungen dieser Mechanismen mit denen des Huhns noch aussteht.

2.2.2 Rolle der Darm-Mikrobiota beim Säuger

Der Fetus entwickelt sich in einer sterilen Umgebung und ist damit frei von Mikroorganismen. Bei der Geburt ist er jedoch sehr schnell einer Vielzahl an Mikroorganismen ausgesetzt und wird rasch von einer Keimflora kolonisiert. Die Zusammensetzung dieser Flora ist abhängig von der Art der Entbindung. Bei der Passage durch den natürlichen Geburtskanal wird das Neugeborene vorwiegend mit Mikroorganismen aus dem Vaginal- und Gastrointestinaltrakt der Mutter kolonisiert, bei Kaiserschnitten geschieht dies vor allem durch mikrobielle Organismen, welche die Haut der betreuenden Personen besiedeln [87]. Nach dieser initialen Kolonisierung ist die weitere Entwicklung einer wirtsspezifischen Mikroflora abhängig von Umwelteinflüssen, wie beispielsweise der

Ernährung, Hygiene und dem Kontakt zu Familienmitgliedern. In den ersten Lebensjahren eines Säuglings ist die Zusammensetzung der Mikrobiota weniger komplex und unterliegt starken Fluktuationen. Erst ab einem Alter von 3 Jahren stabilisiert sich die Flora und erreicht die Diversität einer adulten Darmflora [88, 89]. Auch das Immunsystem ist bei Neugeborenen unausgereift. Die postnatale Besiedlung mit apathogenen Mikroorganismen spielt eine entscheidende Rolle beim Aufbau der Immunkompetenz des Wirts und potentiell auch bei der Entwicklung von Dysfunktionen des Immunsystems [90].

Antibiotika zählen zu den am häufigsten verschriebenen Medikamenten und Kinder repräsentieren die überwiegend behandelte Altersgruppe [91, 92]. Genexpressionsanalysen haben gezeigt, dass solche Behandlungen mit deutlichen und tiefgreifenden Veränderungen in der Zusammensetzung der Mikrobiota einhergehen. In vielen Fällen sind diese Veränderungen transient und es kommt zur Wiederherstellung des mikrobiellen Status vor der Behandlung. Es sind jedoch auch endgültige Beeinträchtigung der den Darm besiedelnden Mikroorganismen dokumentiert worden [93, 94]. Die immunologischen Konsequenzen von Antibiotikagaben sind zwar bisher nur wenig untersucht worden, aber es gibt Hinweise, dass Antibiotika-induzierte Veränderungen der Mikrobiota auch das Darmimmunsystem beeinflussen [95].

Antibiotische Behandlungen von Mäusen direkt nach der Geburt, führt zu Veränderungen des Immunsystems, wie sie auch bei keimfrei gehaltenen Mäusen zu finden sind. Dazu zählen beispielsweise erhöhte Freisetzung von IL-4 und Immunglobulin E und einer verringerten Anzahl an regulatorischen T-Zellen, was mit einer erhöhten Empfänglichkeit für Asthma oder Kolitis assoziiert worden ist [87]. Antibiotikainduzierte Veränderungen der Mikrobiota-Zusammensetzung bei Mäusen führten zu einer erhöhten Empfänglichkeit für Infektionen mit *Salmonella Typhimurium* und einer reduzierten Immunantwort gegen *Yersinia pseudotuberculosis*, obwohl die Gesamtzahl der Mikrobiota unverändert blieb [96-98].

Die mikrobielle Besiedlung von keimfrei gehaltenen, neugeborenen Mäusen resultierte in der reduzierten Rekrutierung von sogenannten invarianten natürlichen Killer-T-Zellen (*invariant natural killer T cells*, iNKT-Zellen) in die Mukosa, was die Mäuse vor Darmentzündungen schützte. Dieser Schutzeffekt konnte jedoch nicht bei keimfrei gehaltenen Mäusen beobachtet werden, wenn diese erst im Erwachsenenalter mikrobiell kolonisiert wurden [99, 100]. Solche Ergebnisse vermitteln den Eindruck, dass limitierte Zeitfenster vorliegen, in denen die Möglichkeit einer mikrobiotaabhängigen Regulation des Immunsystems besteht und dass eine verzögerte Besiedlung mit Mikroorganismen, möglicherweise nicht in der Lage ist, die

Benachteiligung durch die verpasste frühe Kolonisierung direkt nach der Geburt zu kompensieren [87].

Aber auch im Erwachsenenalter können häufige antimikrobielle Behandlungen, zusammen mit Umwelteinflüssen, Ernährungsgewohnheiten und auch der Elimination von Darmparasiten zu weitreichenden Veränderung der Mikrobiota führen, was über den Gastrointestinaltrakt und das Immunsystem hinausgehende Konsequenzen für den Wirt haben kann. Es wird davon ausgegangen, dass diese Beeinflussung der Mikrobiota zum Beispiel unter anderem verantwortlich ist für den dramatischen Anstieg an chronisch entzündlichen und Autoimmunerkrankungen, wie zum Beispiel Morbus Crohn, chronisch ulzerierender Kolitis, Asthma, rheumatoider Arthritis oder Typ I Diabetes [85]. Außerdem gibt es zahlreiche Hinweise, dass ein Zusammenhang bestimmter Darmmikrobiota mit metabolischen Vorgängen besteht. So konnte zum Beispiel bei der Mikrobiota von adipösen Menschen eine reduzierte Diversität festgestellt werden und im Mikrobiom von adipösen Mäusen konnte eine erhöhte Anzahl an Genen gefunden werden, die für Enzyme des Kohlenhydratstoffwechsels codieren [4].

Die umfassendsten Erkenntnisse konnten jedoch über den Einfluss der Mikrobiota auf die Entwicklung und Funktion des Darms und des Darmimmunsystems gewonnen werden. Ein Großteil der heutigen Kenntnisse über die Mikrobiota-Immunsystem Interaktionen sind durch Studien mit keimfrei gehaltenen Tieren, vor allem Mäusen, gesammelt worden. Die in sterilen Isolatoren gehaltenen, keimfreien Tiere können morphologisch und biologisch untersucht werden oder als Testsystem für die Etablierung von vereinfachten mikrobiellen Ökosystemen, bestehend aus einzelnen mikrobiellen Spezies oder einer Mischung aus definierten Spezies dienen. Diese rekonstituierten Tiere werden als gnotobiotisch bezeichnet. Keimfreie und gnotobiotische Mäuse sind in den letzten Jahrzehnten zu einem wichtigen experimentellen Werkzeug geworden, um herauszufinden welche Immunfunktionen des Wirts genetisch codiert sind und welche die Interaktionen mit Mikroorganismen erfordern. So konnte gezeigt werden, dass die symbiotische Beziehung zwischen Mikrobiota und Wirt, weit über die metabolische Funktion, dem Aufschluss von unverdaulichen Pflanzenbestandteilen für den Wirt und im Gegenzug die Sicherung der Nährstoffbereitstellung für die Bakterien, hinausgeht [101].

Keimfrei gehaltene Mäuse weisen eine Vielzahl an morphologischen Veränderungen des Darmes und des Darmimmunsystems im Vergleich zu kolonisierten Mäusen auf und sind außerdem empfänglicher für Infektionen als konventionell gehaltenen Mäuse [102]. Bei

keimfreien Mäusen konnten längere und schmalere Darmvilli, ein weniger komplexes Gefäßsystem im Darm und weniger tiefe Krypten, welche eine reduzierte Anzahl an proliferierenden Stammzellen enthielten, nachgewiesen werden. Außerdem war das Caecum von keimfreien Tieren vergrößert. Die Aktivität der Verdauungsenzyme war reduziert und es konnte eine weniger dicke Schleimschicht auf den Epithelzellen nachgewiesen werden. Peyer'sche Plaques und mesenteriale Lymphknoten waren bei keimfrei gehaltenen Mäusen unterentwickelt und es konnten nur sehr wenige isolierte lymphatische Follikel gefunden werden. Außerdem konnten deutlich geringere IgA Titer und Zytokinproduktion festgestellt werden. Auch die Anzahl der intraepithelialen Lymphozyten, CD4⁺ T-Lymphozyten (Th17 und Tregs) und der IgA⁺ Plasmazellen war reduziert. Bei keimfrei gehaltenen Ratten war außerdem die Anzahl der Becherzellen herabgesetzt [2, 4, 85, 103].

Einige diesen Veränderungen zu Grunde liegende Mechanismen konnten zumindest teilweise erklärt werden und wurden allgemein auf die fehlende mikrobielle Stimulation, was in einem unterentwickelten Abwehrsystem resultiert, zurückgeführt [104].

Eine bestimmte Bakterien Spezies, genannt segmentierte filamentöse Bakterien (*segmented filamentous bacteria*, SFB) fördert die Bildung von Th17 Zellen bei Mäusen [105]. Die Adhäsion von SFBs an das Darmepithel führt zu Hochregulation der Serum Amyloid A Protein Produktion, welche wiederum die IL-6 und IL-23 Synthese von DCs der LP fördert. Diese beiden Zytokine induzieren die Th17-Zell-Differenzierung [105] (Abbildung 4). Luminales Adenosintriphosphat (ATP), welches nur von kommensalen Bakterien, nicht aber von Pathogenen gebildet wird und IL-1 β , dessen Bildung spezifisch durch Mikrobiota induziert wird, tragen ebenfalls zur Th17-Zell-Differenzierung bei [106, 107] (Abbildung 4). SFBs konnten bisher allerdings nur bei Mäusen, nicht jedoch beim Menschen nachgewiesen werden [4].

Die Inokulation von keimfreien Mäusen mit Mikrobiota konventioneller Mäuse, führt ebenfalls zur Induktion von Th17-Zellen. Bei der Inokulation von Ratten- oder Menschen-Mikrobiota zeigte sich dieser Effekt jedoch nicht, was dafür spricht, dass Mikrobiota die Th17 Entwicklung in einer wirtsspezifischen Weise regulieren [108]. Mono-Kolonisierung mit SFB verursacht einen deutlichen Anstieg in der Anzahl der IgA⁺ Plasma Zellen der LP des Dünndarms von Mäusen. Dieser Anstieg war außerdem höher als bei Mäusen, welche mit Clostridien monokolonisiert wurden [109]. Interessanterweise war die Menge an IgA im Darminhalt der Mäuse höher bei Monokolonisierung mit Clostridien als bei mit SFB kolonisierten Mäusen. Am niedrigsten waren IgA Messungen in Darminhalt konventioneller

Mäuse [109]. Des Weiteren konnte durch Mono-Kolonisierung mit SFB die Expression von MHC-Klasse-II Molekülen auf Epithelzellen des Dünndarms von Mäusen induziert werden [110].

Das Gram-negative Bakterium *Bacteroides fragilis* kann die Differenzierung von CD4⁺ T-Lymphozyten in regulatorische T-Zellen auslösen. Dieser Vorgang wird vermittelt durch Polysaccharid A (PSA) auf der äußeren Membran des Bakteriums. PSA wird von TLR2 auf CD4⁺ T-Zellen erkannt, wodurch eine Signalkaskade ausgelöst wird, die zur Differenzierung zu regulatorischen T-Zellen führt [111] (Abbildung 4). Einen ähnlichen Effekt hatte eine Mischung aus 46 Clostridien Subspezies, welche aus Mäusefäzes isoliert worden sind sowie ein Cocktail aus acht definierten Bakterien (Schaedler Flora) [112, 113]. Eine weitere Komponente, die an der verstärkten Bildung von Tregs beteiligt zu sein scheint, ist Butyrat. Es zählt zu den kurzkettigen Fettsäuren, welche bei der Fermentation pflanzlicher Kohlenhydrate durch Mikroorganismen im Dickdarm entstehen. Kurzkettige Fettsäuren und insbesondere Butyrat scheinen bei der Induktion von regulatorischen Prozessen im Darm sowohl T-Lymphozyten als auch Dendritische Zellen zu beeinflussen [114, 115].

Die Differenzierung von B-Zellen in IgA produzierende Plasmazellen wird durch DCs vermittelt, welche mittels TLR5 durch Mikrobiota assoziiertes Flagellin aktiviert wurden [116]. Des Weiteren führt die Aktivierung von TLRs auf Darmepithelzellen zur Sekretion von löslichen Faktoren, wie dem B-Zell aktivierenden Faktor (BAFF) und dem Proliferation induzierenden Liganden APRIL, welche die Bildung von IgA⁺ Plasmazellen fördern (Abbildung 4). Gleichzeitig produzieren die Epithelzellen TSLP (*thymic stromal lymphopoietin*), welches wiederum BAFF und APRIL Expression in Dendritischen Zellen unterstützt. Verschiedene Typen an DCs synthetisieren zusätzlich weitere Faktoren, wie induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (*inducible nitric oxid synthase*, iNOS), Retinolsäure und Tumornekrosefaktor (TNF) bei Interaktion mit kommensalen Mikroorganismen. Diese Faktoren fördern die Expression der AID und den Klassenwechsel von B-Lymphozyten zu IgA⁺ Plasmazellen [117-119] (Abbildung 4). Folglich instruiert die Mikrobiota die IgA Produktion, aber gleichzeitig reguliert das IgA die Funktion und die Zusammensetzung der Mikrobiota, indem es an luminale Mikroorganismen bindet und deren Bindung an Epithelzellen verhindert, um den Mutualismus zwischen Wirt und Mikrobiota zu erhalten [120]. IgA defiziente Mäuse produzieren Darmmikrobiota-spezifische Serum IgG Antikörper, was für ein Durchbrechen der Schleimhautbarriere und die Induktion des systemischen Immunsystems spricht [81].

Die Darmmikrobiota reguliert außerdem die Produktion von antimikrobiellen Peptiden (AMP) und von Mukus und fördert damit die mukosale Barrierefunktion. Die Schleimschicht von keimfreien Mäusen ist dünner als bei konventionellen Mäusen [121]. Durch orale Gabe von bakteriellen Lipopolysacchariden (LPS) und Peptidoglycanen kann jedoch bei den keimfreien Mäusen eine Verdickung der Schleimschicht erreicht werden [122]. Jakobbson *et al.* konnten außerdem feststellen, dass bestimmte Vertreter der Mikrobiota (*Desulfovibrio* und TM7 Bakterien) die Schleimschicht im Kolon von Mäusen strukturell dahingehend verändern können, dass diese durchdringbar für Mikroorganismen wird, was in einer erhöhten Infiltration der LP mit Immunzellen resultiert [121].

AMPs werden von intestinalen Epithelzellen als Reaktion auf einen engen Kontakt mit der Mikroflora gebildet. Sie beinhalten Defensine, C-Typ Lektine (wie z.B. RegIII β und RegIII γ) und Ribonukleasen (beispielsweise Angiopoietin 4) und können Mikroorganismen töten oder inaktivieren [123]. α -Defensine und β -Defensin 1 werden konstitutiv exprimiert [124]. Angiopoietin 4 und RegIII γ werden erst durch bakteriellen Einfluss induziert [125, 126]. Dies geschieht entweder über PRRs (TLRs und NLRs) oder beispielsweise durch mikrobiell fermentiertes Butyrat [127, 128].

Die Entstehung von sekundären lymphatischen Organen, wie PP und mesenterialen Lymphknoten, wird bereits vor der Geburt durch die Induktion von sogenannten LT_i-Zellen (*lymphoid tissue inducer*-Zellen) initiiert [129]. Diese induzieren wiederum die Differenzierung von Stromazellen, so dass diese Zytokine und Adhäsionsmoleküle exprimieren, wodurch weitere Immunzellen angelockt werden und damit GALT Formation ausgelöst wird [130]. Die Reifung der Gewebe, inklusive deren Vergrößerung und die Bildung von GCs, hängen von der postnatalen Besiedlung durch Mikroorganismen ab [90]. Ansammlungen von LT_i-Zellen, die als *Cryptopatches* bezeichnet werden, rekrutieren B-Lymphozyten und entwickeln sich zu ILFs [131]. Dieser Vorgang ist ebenfalls abhängig von der mikrobiellen Kolonisierung, da sich bei keimfreien Mäusen keine ILFs entwickeln [132]. Die ILF-Bildung kann jedoch durch die Gabe von gereinigtem Peptidoglycan von Gram-negativen Bakterien induziert werden [133]. Dies vermittelt den Eindruck dass dieser Vorgang ausschließlich durch spezifische mikrobielle Muster angetrieben wird. Stroma- und Epithelzellen erkennen Peptidoglycan via PRRs (NOD1 und TLRs). Aktivierung von NOD1 durch die Mikrobiota verursacht die erhöhte Expression des Chemokins CCL20 (CC-Chemokin Ligand 20) und wahrscheinlich auch von β -Defensin 3, die beide ILF Formation induzieren, indem sie an den CC-Chemokin Rezeptor 6 (CCR6) auf LT_i-Zellen binden [133].

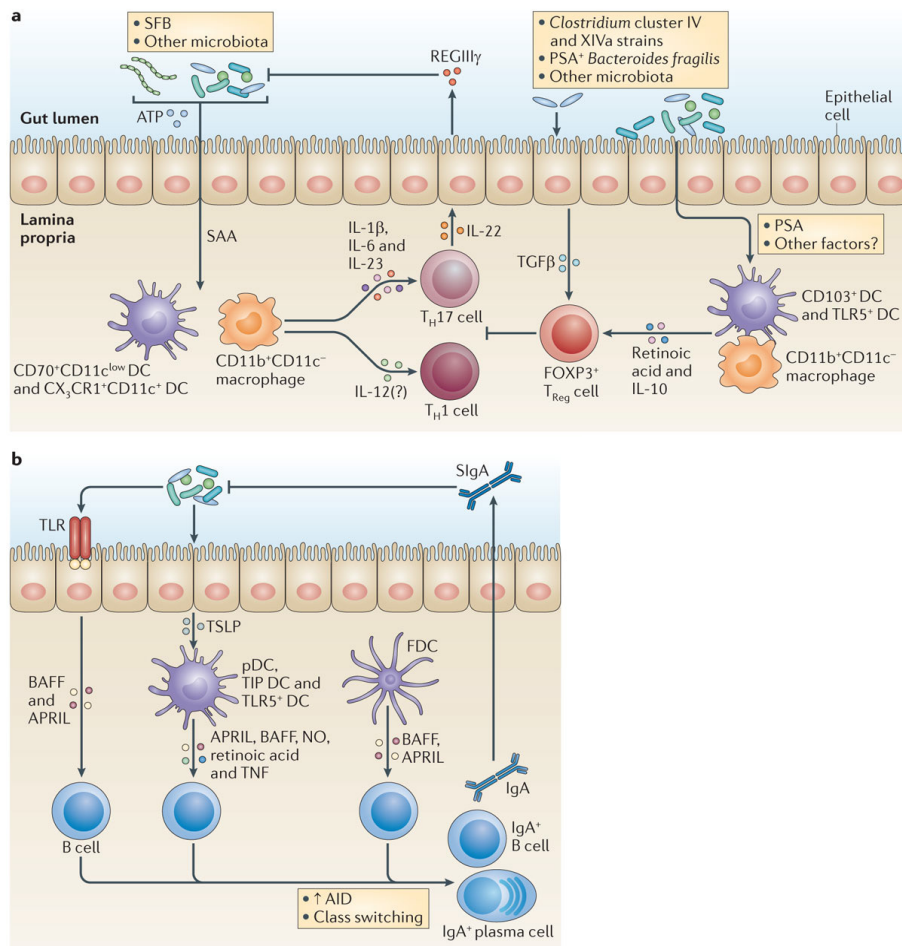


Abbildung 4: Einfluss der Mikrobiota auf die Entwicklung des Darmimmunsystems

a: Segmentierte filamentöse Bakterien (SFB) und andere kommensale Mikroorganismen aktivieren Dendritische Zellen (DCs) und Makrophagen in der Lamina propria durch die Produktion von Interleukinen (IL-1 β , IL-6, IL-23 und möglicherweise IL-12) die Th17- und Th1-Zelldifferenzierung zu induzieren. Th17 Zellen fördern durch IL-22 Sekretion die Bildung von antimikrobiellen Peptiden (REGIII γ) durch Epithelzellen, was wiederum zur Regulation der Mikrobiota führt. *Clostridium* Subspezies, Polysaccharid A⁺ *Bacteroides fragilis* und andere Mikrobiota stimulieren Epithelzellen, T-Lymphozyten und Makrophagen die Entwicklung und/oder die Aktivierung von FOXP3⁺ regulatorischen T-Lymphozyten (Tregs) zu unterstützen.

b: Die Mikrobiota stimulieren intestinale Epithelzellen und DCs IgA-produzierende B-Lymphozyten und Plasma-Zell-Differenzierung in der Lamina propria zu induzieren. Toll-like-Rezeptor (TLR) Aktivierung auf den Epithelzellen induziert die Sekretion von B-Zell-aktivierendem Faktor (BAFF) und dem Proliferations-induzierenden Liganden APRIL, welche die Bildung von IgA⁺ Plasmazellen fördern. Die Epithelzellen produzieren außerdem thymisches stromales Lymphopoietin (TSLP), was die Expression von BAFF und APRIL in DCs begünstigt. Verschiedene Typen an DCs (pDCs, TIP DCs, TLR5⁺ DCs) sezernieren BAFF, APRIL, Stickstoffmonoxid (NO), Retinsäure und Tumornekrosefaktor (TNF), was die Expression der aktivierungsinduzierten Cytidin-Desaminase (AID) und den Klassenwechsel zu IgA ermöglicht. Follikulardendritische Zellen (FDCs) induzieren ebenfalls die Differenzierung von IgA⁺ Plasmazellen in den Peyer Plaques und isolierten lymphatischen Follikeln. Adaptiert mit Erlaubnis von Macmillan Publishers Ltd: [Nature Reviews Immunology] nach Kamada [2], Copyright 2015.

Neue Untersuchungen zeigen, dass die Mikrobiota sowohl die Morphogenese des Gastrointestinaltraktes, als auch die Bildung des Gefäßsystems beeinflusst [134]. Die Kolonisierung des keimfreien Darmes von Mäusen verursacht eine Restrukturierung der intestinalen Zotten, die sich verkürzen und verbreitern, um mikrobielle Infiltration zu verhindern. Dies erhöht wiederum den Bedarf an Sauerstoff im Darmepithel und führt zum Einsprossen von Endothelzellen und schlussendlich zu Angiogenese [134].

Die orale Eingabe des *Escherichia coli* Stamms Nissle 1917 (EcN) über einen Zeitraum von einer Woche, schützte neugeborene gnotobiotische Schweine sowohl vor der Infektion mit einem enteropathogenem O55 *E.coli* Stamm (EHEC), als auch vor dem tödlichen Verlauf nach Infektion mit *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium [135]. Die orale Gabe von Bifidobakterien bei gnotobiotischen Schweinen und anschließender Infektion mit EHEC, führte dagegen zu einer Septikämie und schließlich zum Tod der Schweine. Bei keimfrei gehaltenen Schweinen verlief die Infektion ebenfalls tödlich. EcN exprimiert H1 Flagellin, dieses wird von TLR5 der Enterozyten erkannt, welche daraufhin IL-8 sezernieren, das wiederum Granulozyten anlockt. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass EcN die Struktur der Darmbarriere positiv beeinflusst, indem beispielsweise periphere Proteine der *tight junctions* hochreguliert werden [135].

Bei gnotobiotischen Ratten, welche mit einem *Lactobacillus rhamnosus* Stamm mono-rekonstituiert worden sind, konnte im Vergleich zwischen der keimfreien und der konventionellen Kontrollgruppe eine erhöhte Mitoserate und Zellzahl in den Darmzotten des Dünndarms festgestellt werden, was für einen mitogenen Effekt des Bakteriums spricht [136]. Zahlreiche Studien berichten einen Anstieg an sekretorischem IgA durch Substitution von *Lactobacillus* Subspezies als Probiotikum bei Mensch und Maus [137]. Verschiedene Stämme einer *Lactobacillus* Spezies können eine große Bandbreite an Zytokin-Antworten bei Immunzellen hervorrufen und unterschiedliche immunmodulatorische Effekte haben [138]. So unterscheiden sich beispielsweise verschiedene *Lactobacillus* Stämme in ihrer Fähigkeit TLR-2 vermittelte Signalkaskaden anzustoßen [139].

Die positive Wirkung der kommensalen Mikroorganismen beschränkt sich jedoch nicht nur auf Bakterien. Kürzlich konnte diese auch für ein gewöhnliches RNA Virus, welches im Darmtrakt von Mäusen vorkommt, nachgewiesen werden [140]. Das murine Norovirus führte bei keimfreien Mäusen zu der Verbesserung von Darmmorphologie und Lymphozytenfunktion, ohne dabei eine Entzündungsreaktion hervorzurufen.

Keimfreie und gnotobiotische Mäuse und Ratten wurden in vielen Bereichen intensiv

untersucht, um physiologische und pathologische Zusammenhänge der Mikrobiota mit dem Immunsystem zu untersuchen, und viele Informationen wurden so gesammelt. Im Allgemeinen war die Kolonisierung mit einem einzigen Bakterienstamm oder einer einfachen Mischung mit wenigen Bakterienstämmen weniger effektiv in dem Vorantreiben der immunologischen Entwicklung, als eine Konventionalisierung von keimfreien Tieren, mit einer komplexen, obgleich unvollständig charakterisierten Flora [141]. Es fehlen jedoch noch viele Erkenntnisse zu genauen Mechanismen der Wirt-Mikrobiota Interaktion, welche durch weitere Studien erlangt werden müssen.

2.2.3 Rolle der Darm-Mikrobiota beim Huhn

Die mikrobielle Kolonisierung des Hühnerdarms beginnt direkt nach dem Schlupf, weshalb die Umweltfaktoren, denen das Küken bei und nach dem Schlupf ausgesetzt ist, ganz entscheidenden Einfluss auf das mikrobielle Profil des Huhns haben. Dies ist vermutlich auch der Grund, warum große Unterschiede in der mikrobiellen Zusammensetzung der Darmflora von verschiedenen Tiergruppen innerhalb identischer Studien, sowie zwischen den Einzeltieren innerhalb derselben Tiergruppe festgestellt werden konnten [142]. Das Huhn nimmt im Vergleich mit anderen lebensmittelliefernden Tieren eine Art Sonderposition ein, was die Entwicklung der individuellen Keimflora betrifft, da die Jungtiere bereits vor dem ersten Umweltkontakt vom Muttertier getrennt werden und somit der elterliche Einfluss auf den Kolonisierungsprozess unterbunden wird. Da die Eischale für gewöhnlich gewaschen und desinfiziert wird, beinhaltet die den sterilen Kükendarm nach dem Schlupf kolonisierende Flora vermutlich vor allem Bakterien aus der Umwelt (Transportboxen, Einstreu, Futter) und vom betreuenden Personal stammend.

Viele bisherige Erkenntnisse bezüglich der mikrobiellen Zusammensetzung der Mikrobiota des Huhns entstammen aus Kultivierungs-Studien, in denen die kommensalen Bakterien angezüchtet und anschließend klassifiziert wurden. Allerdings wird angenommen, dass nur 10-60 % der Darmbakterien kultiviert werden können [143], und dass nur etwa 45 % der den Darm des Huhn kolonisierenden Bakterien bereits bekannten bakteriellen Spezies zugeordnet werden können [144]. Gründe für den limitierten Kultivierungserfolg vieler Darmbakterien sind beispielsweise die Notwendigkeit von strikt anaeroben Bebrütungsbedingungen oder der Bedarf an bakterieller Kokultivierung, um kulturelles Wachstum zu gewährleisten. Kultur-unabhängige Methoden (z. B. Sequenzierung) haben jedoch in den letzten Jahren zu einem Überblick der bakteriellen Vertreter der Mikrobiota des Huhnes beigetragen.

Die Bakteriendichte im Hühnerdarm beträgt schon nach den ersten Lebensstunden bis zu 10^{10} Bakterien pro Gramm Fäzes im Dickdarm, enthält aber nur eine geringe Anzahl an Bakteriengattungen, vor allem Laktobazillen, Bifidobakterien, Coliforme Bakterien und Clostridien [145]. Im Laufe der ersten Lebenstage fluktuieren die mikrobielle Zusammensetzung im Darm, bis sich schließlich eine hoch diverse und relativ stabile Flora einstellt. Es gibt unterschiedliche Auffassungen die Zeitspanne betreffend, bis eine adulte Zusammensetzung vorliegt, so variieren Angaben zwischen dem 4., 11. und 25. Lebenstag [144]. Im Dünndarm des adulten Huhns sind *Lactobacillus* Subspezies (spp.) sehr dominant (68 - 99%), gefolgt von *Streptococcus* spp., Coliformen Bakterien, *Clostridium* spp., *Enterobacteriaceae*, *Bacterioides* und *Bifidobacterium* spp. [146, 147]. Die Caeca des Huhns spielen als Hauptfermentationsort eine wichtige Rolle bei Verdauungsvorgängen. Sie enthalten eine weitaus komplexere bakterielle Gemeinschaft als der Dünndarm. Zahlreich im Caecum vorkommende Bakterienspezies sind vor allem *Clostridiaceae*, *Bacteroidaceae*, *Proteobacteria*, *Lactobacillus*, Butyratbildner und unbekannte *Firmicutes* [145-147]. Die bereits erwähnten segmentierten filamentösen Bakterien (SFBs) (siehe 2.2.2), die bei der Interaktion der Mikrobiota und dem Immunsystem der Maus eine wichtige Rolle zu spielen scheinen, konnten auch bei Hühnern gefunden werden [148].

Unter der kommensalen Darmflora von Hühnern befinden sich auch bakterielle Pathogene mit hohem Zoonosepotential, wie *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enterica*, *Helicobacter*, aber auch *E.coli* und *Clostridium perfringens* [144, 149]. Dies war unter anderem Grund für die jahrzehntelange prophylaktische Gabe von Antibiotika als niedrigdosierte Futtermittelzusätze in der Geflügelindustrie, welche außerdem als Wachstumsförderer verwendet wurden. Seit 2006 ist diese Art von Vorsorge allerdings aufgrund von vermehrt auftretenden Antibiotikaresistenzen bei humanpathogenen Erregern europaweit verboten, was dazu führte, dass vermehrt nach alternativen Methoden zur Erhaltung der Darmgesundheit bei Wirtschaftsgeflügel geforscht wurde. Eine ganz wesentliche Rolle dabei spielte der positive Einfluss der Mikrobiota.

Die ersten Untersuchungen bezüglich des Einflusses der intestinalen Gesamtflorea auf das Immunsystems des Huhns wurden jedoch bereits 1955 anhand von Keimfreistudien mit Hühnern von Wagner *et al.* durchgeführt [5]. Keimfrei gehaltene und unter konventionellen Laborbedingungen gehaltene Hühner wurden unter morphologischen und serologischen Gesichtspunkten miteinander verglichen. Es wurde ein signifikant reduziertes Gewicht des Gastrointestinaltraktes, und insbesondere der Caecaltonsille der keimfrei gehaltenen Hühner festgestellt. Organe ohne direkten Kontakt zu Mikroorganismen, wie die Milz, zeigten

hingegen keine Gewichtsunterschiede zwischen den verglichenen Tieren. Des Weiteren beschreiben die Autoren einen drastisch reduzierten Lymphozytenanteil in der CT, nicht aber in der Milz von keimfrei gehaltenen Hühnern [5]. Seren von über 30 Tage alten konventionellen Hühnern agglutinierten bei Inkubation mit Mikroorganismen (*Paracolobactrum Aerogenoides* und ein Hühner *E. coli* Stamm), welche aus dem Kot von Hühnern gewonnen wurden. Seren von keimfrei gehaltenen Hühnern zeigten in diesem Test keine Agglutination. Die Inkubation der Seren mit *Micrococcus epidermidis* welcher im Futter der Hühner nachgewiesen werden konnte, führte bei konventionellen Hühnern ab dem 30. Lebenstag zur Agglutination mit Titern von bis 1:64, wobei bei keimfrei gehaltenen Hühnern erst ab dem 200. Lebenstag ein Titer von bis zu 1:8 nachgewiesen werden konnte. Die Autoren gingen davon aus, dass antigene Strukturen der durch die Autoklavierung des Futters inaktivierten Bakterien nach längerfristiger Applikation auch bei den keimfrei gehaltenen Tieren eine Antikörperproduktion auslösen können [5]. Diese Annahme konnte durch die Zugabe von großen Mengen abgetöteter Bakterien in das Futter von keimfreien Hühnern bestätigt werden. Es konnten bereits ab dem 42. Lebenstag Antikörper mit Titern von bis 1:32 nachgewiesen werden [5]. Nach der parenteralen Gabe von Antigen (*Salmonella Pullorum* und Rinderserum) konnte in dieser Studie kein Unterschied in der Antikörperantwort von konventionell und keimfrei gehaltenen Hühnern nachgewiesen werden [5].

Thorbecke *et al.* hat 1957 zwei bis 17 Wochen alte, keimfrei und konventionell gehaltene Hühner histologisch und serologisch miteinander verglichen [8]. Zum Vergleich hinzu gezogen wurde eine weitere Tiergruppe welche ab der 7. Lebenswoche unbeabsichtigt mit einem *Bacillus subtilis* Stamm kontaminiert wurde und welche zu je zwei Tieren mit drei verschiedenen Antigenlösungen immunisiert wurden: eine Typhus-Paratyphus Vakzine, die innerhalb einer Woche drei Mal in ansteigenden Konzentrationen intramuskulär (i.m.) verabreicht wurde, Rinderserum (4x/1 Woche, i.m.) und eine Staphylococcus Impfung (5x/1 Woche, oral eingegeben). Zwei konventionell gehaltene Tiere wurden als Kontrolltiere ebenfalls mit Rinderserum immunisiert. In der Folge wurde der prozentuale Anteil an γ -Globulinen am Gesamt-Serum-Protein mittels Elektrophorese gemessen und die Zahl der Plasmazellen und sekundären Lymphfollikeln in verschiedenen Organen analysiert. Keimfrei gehaltene Tiere wiesen einen deutlich geringeren Anteil an γ -Globulinen im Serum auf, als konventionell gehaltene Hühner. Des Weiteren war das lymphatische Gewebe des Darms der keimfrei gehaltenen Tiere deutlich unterentwickelt. Erst ab einem Alter von 8 Wochen konnten vereinzelt kleine Lymphfollikel und wenige Plasmazellen bei diesen Tieren gefunden

werden, welche bis zu diesem Alter bei keinem der keimfrei gehaltenen Tiere auffindbar waren. Die mono-kontaminierte Gruppe zeigte vor der Immunisierung keine Unterschiede zu den keimfrei gehaltenen Tieren. Nach der Immunisierung waren die γ -Globulin-Werte und die Anzahl von Lymphfollikeln und Plasmazellen im Darm leicht erhöht, aber im Vergleich mit den konventionell gehaltenen Tieren noch immer reduziert [8].

Vergleichbare Ergebnisse publizierten Hedge *et al.* 1981 [150]. Das Gewicht von Bursa, Thymus und Milz, die Anzahl an Plasmazellen im GALT und die Struktur der Caecaltonsille wurde bei keimfrei und konventionell gehaltenen Hühnern verglichen. Bursa, Thymus und Milz wiesen keine Unterschiede zwischen den Gruppen auf, wobei die CTs bei keimfrei gehaltenen Tieren drastisch unterentwickelt waren und keine GCs beinhalteten. Auch die Anzahl der Plasmazellen war deutlich geringer als bei den konventionell gehaltenen Tieren.

Eine immunhistochemische Untersuchung der Lymphozytenverteilung in lymphatischen Organen von vier Wochen alten keimfrei und konventionell gehaltenen Hühnern wurde 1993 von Honjo *et al.* durchgeführt [10]. Dabei konnten eine reduzierte Menge an T- und B-Lymphozyten und die Abwesenheit von GCs in den CT von keimfrei gehaltenen Hühnern festgestellt werden. Die Lymphozytenverteilung in der Bursa, dem Thymus und der Milz variierten durch den Einfluss von Mikroorganismen kaum bis gar nicht. Lediglich eine geringgradig reduzierte Anzahl an T-Lymphozyten lag in der Milz von keimfrei gehaltenen Tieren vor [10].

Baba *et al.* haben 1991 die Fähigkeit der Darmflora zur Hemmung der *Salmonella* Typhimurium Kolonisierung des Darms von gnotobiotischen Hühnern untersucht [151]. Die orale Eingabe von Caecuminhalt, welcher von adulten konventionell gehaltenen Hühnern gewonnen wurde, verhinderte die *Salmonella* Kolonisierung stärker, als die Gabe von Caecuminhalt, welcher von zwei Tage alten, konventionell gehaltenen Küken stammte. Des Weiteren hemmte die Rekonstitution mit *E. coli* und *Lactobacillus* spp. die *Salmonella* Kolonisierung effektiver, als die Mono-Rekonstitution mit jeweils einem der beiden Bakterienstämmen [151].

T-Lymphozyten-Populationen im Darm von keimfrei gehaltenen, mono-kolonisierten und konventionell gehaltenen Hühnern wurden von Mwangi *et al.* analysiert. Die Untersuchung zeigte, dass regionale und globale Veränderungen des TCR $\alpha\beta$ T-Lymphozyten-Repertoires im Darm von der Komplexität der Darmflora abhängen [152].

Zahlreiche Studien haben sich mit der Verwendung von Probiotika zur Kontrolle von

Zoonose Erregern des Huhns beschäftigt, bei denen konventionell gehaltene Hühner mit probiotischen Bakterien substituiert wurden. Probiotika sind lebende Mikroorganismen, die in adäquater Konzentration verabreicht einen gesundheitsfördernden Effekt auf den Wirt ausüben [153]. Dabei wurde vor allem der probiotische Effekt von *Lactobacillus* spp. auf *Salmonella* Infektionen untersucht. Eine komplexe Mischung aus vielen Bakterienspezies war hierbei meist deutlich effektiver als die Verwendung von einzelnen Bakterienstämmen [154].

Die natürliche mikrobielle Kolonisierung von Küken führt in der ersten Lebenswoche zu einer erhöhten Expression von IL-8 und IL-17 [155]. Crhanova *et al.* fanden außerdem heraus, dass Küken, welche vor oder während dieser Interleukin-Induktion mit *Salmonella* Enteritidis infiziert wurden, vermehrt Th1 Immunantworten entwickelten, wobei die *Salmonella* Infektion am 16. Lebenstag in einer überwiegenden Th17 Antwort resultierte [155].

Bei Hühnern, denen am ersten Lebenstag drei verschiedene probiotische Bakterienstämme (*Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum* und *Streptococcus faecalis*) inokuliert wurden und welche am nächsten Tag mit *Salmonella* Typhimurium infiziert wurden, ist mittels qRT-PCR Genexpression verschiedener proinflammatorischer Zytokine in den Caecaltonsillen gemessen worden [84]. Die probiotische Behandlung resultierte in einer signifikant reduzierten IFN- γ Expression infolge der Infektion. Des Weiteren konnte der nach *Salmonella* Infektion übliche Expressionsanstieg von IL-12 durch die vorherige Gabe der Probiotika verhindert und die Zahl der Salmonellen im Caecum reduziert werden [84].

Auch die humorale Immunantwort kann durch die orale Gabe von Probiotika moduliert werden [156, 157]. Allerdings besitzen nicht alle probiotischen Bakterienstämme diese Fähigkeit und unterscheiden sich diesbezüglich stark, selbst innerhalb der gleichen Gattung. So führte beispielsweise die Gabe von *Lactobacillus salivarius* zu erhöhten Serum-Antikörper-Titern nach der Immunisierung mit verschiedenen Antigenen und zu einer reduzierten Zell-vermittelten Immunantwort, wohingegen *Lactobacillus acidophilus* nur zu einem erhöhten Antikörper-Titer nach Immunisierung mit einem der verwendeten Antigene führte, und *Lactobacillus reuteri* keinen Effekt auf die Immunantwort hatte [156]. Die Behandlung von Hühnern mit den probiotischen Bakterienstämmen *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum* und *Streptococcus faecalis* führten zu einem erhöhten Serum-Immunglobulinspiegel (v.a. IgM) nach der Immunisierung mit Schaferythrozyten, nicht aber nach der Impfung mit bovinem Serumalbumin [157]. Das jeweils verabreichte Antigen, scheint dementsprechend auch bei der modulatorischen Fähigkeit der Probiotika eine Rolle zu spielen. Des Weiteren wird dieser Vorgang auch durch die Genetik des Wirts

beeinflusst, da die gleiche bakterielle Zusammensetzung bei einer Hühnerrasse einen probiotischen Effekt haben kann, bei einer anderen jedoch nicht [158].

Die Substitution von Broilern mit dem probiotischen Bakterium *Enterococcus faecium* führte zu einer verbesserten Entwicklung von lymphatischen Organen und Mikrovilli der Darmzotten. Des Weiteren führten proteomische Analysen des Darms dieser Tiere zu der Annahme, dass die mit *Enterococcus faecium* substituierten Tiere weniger Energie und Nährstoffe für immunologische und antioxidative Prozesse benötigten [159].

Die hohe Variabilität der individuellen mikrobiellen Flora der Tiere und des probiotischen Potentials einzelner Bakterienstämme bedingt jedoch stets die Frage, ob der Einfluss eines untersuchten Keims auch auf andere Bedingungen übertragen werden kann.

2.3 VERWENDETE PROBIOTISCHE BAKTERIEN

Probiotika sind lebende Mikroorganismen, die in adäquater Konzentration verabreicht einen gesundheitsfördernden Effekt auf den Wirt ausüben [153]. Nachfolgend soll eine kurze Übersicht der in der vorliegenden Arbeit verwendeten probiotischen Bakterien gegeben werden.

2.3.1 *Escherichia coli* Nissle 1917

Escherichia coli Nissle 1917 (EcN) ist eines der am besten untersuchten probiotischen Bakterien weltweit. Der Stamm wurde 1917 während des ersten Weltkrieges von dem Militärarzt Prof. Alfred Nissle aus dem Kot eines Soldaten isoliert, welcher im Gegensatz zu seinen Kameraden nicht an Durchfall erkrankte [160]. Das Genom von EcN ist seit 2004 komplett sequenziert [161]. Es codiert für verschiedene Fitnessfaktoren, wie beispielsweise sechs verschiedene Systeme zur Eisenaufnahme [162] oder etliche Adressine die EcN dazu befähigen andere Bakterien zu verdrängen und effektiv zu kolonisieren [163]. *In vitro* Studien haben gezeigt, dass EcN Epithelzellen dahingehend beeinflussen kann, dass das Anheften und die Invasion von zahlreichen pathogenen Bakterien verhindert werden kann [164, 165]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass EcN in der Zellkultur die Expression von humanem β -Defensin induziert [166]. Eine Studie an Knock-out-Mäusen führte zu der Annahme, dass EcN einen anti-inflammatorischen Effekt über TLR-2 und TLR-4 abhängige Signalwege ausübt, welche vermutlich durch den Transkriptionsfaktor NF- κ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells*) vermittelt werden [167].

Die Kolonisierung mit EcN beeinflusst das mukosale Immunsystem des Wirts entscheidend, so dass beispielsweise erhöhte Mengen an IL-8, IL-10 und IL-12 sezerniert werden [168, 169], die IgA Produktion verstärkt wird [170], Lymphozyten und Makrophagen aktiviert werden [168] und die Bildung von antimikrobiellen Peptiden, sowie die Formation von *tight junctions* stimuliert wird [171, 172]. Die verbesserte mukosale Barrierefunktion erklären sich die Autoren unter anderem anhand einer Herunterregulation der PKC ζ Aktivität, eine der Protein Kinase C Isoformen und der Modulation der *tight junction* Protein Expression, wie beispielsweise von *zonula occludin-2* (ZO-2) [172]. Die Kolonisierung von keimfrei gehaltenen Mäusen mit EcN resultierte in einer erhöhten Expression von ZO-1, sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene, was zur Verhinderung von Dysfunktionen der Darmbarriere führte [173]. EcN ist außerdem ein guter Biofilmbildner, was ebenfalls zu den Fitnessfaktoren des Stamms zählt, die zum Konkurrenzausschluss beitragen [174].

Ganz entscheidend für die Qualifizierung von EcN als probiotisches Bakterium ist, dass EcN keine spezifischen Virulenzfaktoren besitzt und somit keine Gefahr für den Wirt darstellt [161]. So kam es beispielsweise bei der Kolonisierung von keimfrei gehaltenen Schweinen mit EcN zu deutlich geringerer Translokalisierung der Bakterien und Durchbrechen der Schleimhautbarriere, als es bei der Applikation eines kommensalen *E. coli* Stamms des Schweins der Fall war [175].

2.3.2 *Enterococcus faecium*

Enterococci gehören zu den Milchsäurebakterien und sind Gram-positive Kokken, welche zum einen eine Rolle bei der Fermentation (Reifung von Käse) und dem Verderb von Lebensmitteln eine Rolle spielen, zum anderen auch als Probiotika zur Verbesserung der Gesundheit von Mensch und Tier zum Einsatz kommen [176]. Manche *Enterococcus* Stämme sind außerdem Erreger von nosokomialen Infektionen, wobei Virulenzfaktoren bei *Enterococcus faecalis* Stämmen häufiger vorkommen als bei *Enterococcus faecium* Isolaten [176].

Der in dieser Arbeit verwendete *Enterococcus faecium* DSM 7134 Stamm ist als Futtermittelzusatzstoff bei Schweinen und Broilern zugelassen [177, 178]. Der Einfluss von verschiedenen *Enterococcus faecium* Stämmen auf das Immunsystem wird kontrovers diskutiert. Scharet *et al.* berichten einen nicht offensichtlichen, immunstimulierenden Effekt durch orale Applikation bei Ferkeln und Sauen und konnten sogar eine verminderte Zahl an CD8⁺ T-Lymphozyten und geringere Gesamt-IgG-Spiegel bei substituierten Tieren feststellen, die von den Autoren jedoch auf eine reduzierte Anzahl an pathogenen Mikroorganismen im Darm der Tiere zurückgeführt wurden [179]. Auch Kreuzer *et al.* haben keinen probiotischen Effekt für einen *Enterococcus faecium* Stamm bei Sauferkeln, welche mit *Salmonella* Typhimurium infiziert wurden, feststellen können [180]. Cao *et al.* konnten jedoch in einem Infektionsmodell mit Broilern ebenfalls eine geringere Dichte an pathogenen *E. coli* im Darm der Tiere feststellen, deren Futter zuvor mit *Enterococcus faecium* substituiert wurde. Diese Tiere zeigten zudem verbesserte Wachstumsraten und nach der Infektion mit *E. coli* eine erhöhte Konzentration an IL-4 im Dünndarm [181]. Zwei weitere Untersuchungen anderer Autoren konnten in einem identischen Modell, darüber hinaus auch erhöhte Immunglobulinspiegel nach der Infektion von substituierten Broilern nachweisen [182, 183]. *Enterococcus faecium* scheint also zumindest bei Huhn einen immunstimulierenden Effekt auszuüben.

2.3.3 *Lactobacillus rhamnosus*

Bakterien der Gattung *Lactobacillus* gehören zu den am häufigsten verwendeten Probiotika bei Mensch und Tier. *Lactobacilli* sind Gram-positive, nicht-sporenbildende, anaerobe und aerotolerante Kokken [184]. Die Fähigkeit der Adhärenz an Darmepithelzellen konnte für viele *Lactobacillus* spp, insbesondere *Lactobacillus rhamnosus* Stämme nachgewiesen werden [185, 186]. Der in dieser Arbeit verwendete *Lactobacillus rhamnosus* DSM Stamm 7133 zählt zu den vier in Europa als Futtermittelzusatzstoff zugelassenen *Lactobacillus* Stämmen [187]. Die Zulassung beschränkt sich jedoch bisher auf Ferkel und Kälber [184]. Die probiotische Wirkung von *Lactobacillus* spp. ist stamm- und dosisabhängig [184], es konnten jedoch in zahlreichen Studien positive Effekte auf das Immunsystem verschiedener Spezies durch unterschiedliche *Lactobacillus rhamnosus* Stämmen nachgewiesen werden, wie beispielsweise verbesserte Immunparameter bei Regenbogenforellen [188], eine verbesserte mukosale Barrierefunktion und epitheliale Homöostase bei Mäusen [189] und die Bindung von Aflatoxin B im Duodenum von Hühnern [190]. In *in vitro* Studien konnte außerdem eine antagonistische Wirkung auf die Assoziation, Invasion und Translokation von *Campylobacter jejuni* mit einer humanen Darmepithelzelllinie und die verminderte Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen in humanen intestinalen Epithelzellen [191] gezeigt werden. Des Weiteren produzieren *Lactobacilli* Proteine oder Peptide, genannt Bacteriocine, die toxisch auf andere Bakterien wirken, für den Menschen jedoch unbedenklich sind [184].

2.3.4 *Clostridium butyricum*

Clostridium butyricum ist ein Gram-positives, Sporen-bildendes und obligat anaerobes Fäulnisbakterium, das in der Fäzes von 10-20 % gesunder Menschen vorkommt [192]. Die Fähigkeit des Bakteriums Endosporen zu bilden, führt dazu, dass es in der Lage ist besser in einer Umgebung mit niedrigen pH-Werten und höheren Gallensäurekonzentrationen zu überleben als beispielsweise Laktobazillen und Bifidobakterien [193]. Ein bestimmter *Clostridium butyricum* Stamm (MIYARI) ist in Japan als offizieller probiotischer Zusatzstoff zugelassen und wird dort erfolgreich beispielsweise bei der Behandlung von Antibiotika-assoziierten Durchfallerkrankungen von Kindern eingesetzt. In der Europäischen Union ist der Stamm als Futtermittelzusatzstoff bei Broilern und Absatzferkeln zugelassen [194, 195]. *Clostridium butyricum* produziert kurzkettige Fettsäuren, welche laut vieler Untersuchungen einen proliferativen und entzündungshemmenden Effekt auf Darmepithelzellen ausüben können [192]. Des Weiteren scheint es einen antagonistischen Effekt auf zahlreiche

darmpathogene Erreger (*Candida albicans*, *Clostridium difficile*, enterotoxische und enterohämorrhagische *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Salmonella* spp., *Vibrio* spp. und *Helicobacter pylori*) auszuüben, welcher nicht nur durch das Absenken des pH-Wertes, sondern vermutlich auch durch eine bakteriostatische und Toxin-neutralisierende Wirkung zustande kommt [196-199]. Einige *Clostridium butyricum* Stämme können allerdings auch Erkrankungen, wie beispielsweise nekrotisierende Enteropathien, auslösen [200].

3. ZIELSETZUNG

Die Entwicklung des Darmimmunsystems von Mäusen wird ganz entscheidend von der kommensalen Darmflora beeinflusst. Zur Beantwortung der Frage ob dies auch für das Huhn gilt, sollte in dieser Arbeit anhand von keimfrei gehaltenen und gnotobiotischen Hühnern zum einen der Einfluss der gesamten Darmflora, zum anderen der Einfluss einzelner ausgewählter Mikroorganismen auf die Entwicklung des darmassoziierten lymphoiden Gewebes des Huhns auf morphologischer, transkriptioneller und funktioneller Ebene untersucht werden.

4. MATERIAL UND METHODEN

Die Hochzahlen beziehen sich auf die im Anhang alphabetisch aufgeführten Bezugsquellen.

4.1 TIERE UND TIERHALTUNG

4.1.1 Hühner

Für alle durchgeführten Versuche wurde von Hühnern der spezifisch pathogenfreien (SPF, *specific pathogen free*) Linie PA-12 *white Leghorn* Blutproben und Organe entnommen. Die Eier stammen aus der Zucht des Projektpartners am INRA (*Institut national de la recherche agronomique*, Tours, Frankreich). Die Tierversuche wurden unter der Aufsicht des *Comité d’Ethique en Expérimentation Animale Val de Loire* (Tierversuchsnummer: 2013-01-06) durchgeführt.

4.1.2 Haltung

Die Keimfreihaltung wurde gemäß der Methode von Le Bars [201] mit folgenden Modifikationen in der Einrichtung des INRA von dem dort beschäftigten Personal wie folgt durchgeführt.

Innerhalb eines Zeitraums von 1,5 Stunden nach Eiablage wurden die befruchteten Eier erstmals desinfiziert. Hierfür wurden sie fünf Minuten in ein Desinfektionsbad (1.5% Divosan Plus VT53¹) getaucht. Danach wurden sie maximal 15 Tage bei einer Temperatur von 13-15°C gelagert. Vor der Überführung in den Inkubator folgte die zweite Desinfektion über 3 Minuten (1.5% Divosan Plus VT53¹). In der Folge wurden die Eier für 19 Tage bei 37,5°C und einer Luftfeuchtigkeit von 45% in einem handelsüblichen, desinfizierten Inkubator vorinkubiert. Vor der Umlagerung in den Schlupfinkubator wurden die Eier erneut für 4 Minuten desinfiziert (1.25% Divosan Plus VT53¹). Über ein mit Desinfektionslösung gefülltes Einschleusbecken wurden die Eier für den Schlupf der Tiere in einen sterilen Isolator verbracht.

Alle Hühner erhielten mit Gammastrahlung sterilisiertes, handelsübliches Alleinfuttermittel für Legehennen (*poultry starter* HPS²) und autoklaviertes Leitungswasser *ad libitum*.

4.1.3 Rekonstitution

Material

LB ((*lysogeny broth*))-Miller Medium

Hefeextrakt 5g/l²⁰

Trypton 10g/l²⁰

Natriumchlorid 10g/l¹⁰

Chromagar Platten²⁰

Hirn-Herz-Bouillon (BHI, *brain-heart-infusion broth*)²⁰

BHI + 0,5g/l Ammonium-Eisen-Citrat und 1g/l Natriummetabisulfit²⁰

Casein-Soja-Pepton-Agar (TSA, tryptic soy agar) + 0,5g/l Ammonium-Eisen-Citrat und 1g/l Natriummetabisulfit²⁰

MRS (*de Man Rogosa Sharpe Broth*) Medium²¹

Difco™ m Enterococcus Agar²⁰

Mannitol Salz Agar (Chapman)²¹

Drigalsky Lactose Agar²¹

DSMZ Medium 110³¹ (*chopped meat medium with carbohydrates*)

Escherichia coli Nissle1917²²

Enterococcus faecium DSM 7134³¹

Lactobacillus rhamnosus DSM 7133³¹

Clostridium butyricum DSM 10702³¹

Durchführung

Nach dem Schlupf wurden die Küken in verschiedene Versuchsgruppen aufgeteilt. Eine Keimfrei-Gruppe verblieb bis zum Zeitpunkt der Tötung und der Organentnahme in sterilen Isolatoren. Eine Kontroll-Gruppe (konventionelle Gruppe) wurde in einem separaten Gebäude unter SPF (spezifisch pathogenfrei)-Bedingungen gehalten. Zwei weiteren Gruppen wurden am Tag des Schlupfes einmalig definierte Bakteriensuspensionen oral eingegeben. Diese rekonstituierten Tiergruppen wurden wie die Keimfrei-Gruppe bis zur Tötung in sterilen Isolatoren gehalten.

Eine dieser rekonstituierten Gruppen wurde mit dem probiotischen Bakterium *Escherichia coli* Stamm Nissle 1917 (EcN) mono-rekonstituiert (Mono-Gruppe). Dafür wurde den Küken 0,2 ml der Bakteriensuspension (Inokulum) oral eingegeben, welche 1.00×10^7 Kolonien bildende Einheiten (KBE) des EcN in sterilem Wasser enthielt. Dieses Inokulum wurde durch Bebrütung einer Übernacht-Kultur in 12 ml LB (*lysogeny broth*)-Miller Medium bei 37°C gewonnen. Die fortwährende Kolonisierung wurde durch wöchentliches Ausplattieren von

Verdünnungsreihen von Kotsuspensionen in BHI auf Chromagar Platten nachgewiesen. Während des gesamten Versuchszeitraums konnte eine Bakterienkonzentration von $> 2.00 \times 10^8$ KBE pro Gramm Kot nachgewiesen werden. Um Kontaminationen der Isolatoren und der Tiere auszuschließen, wurde ebenfalls wöchentlich bakterielles Wachstum in Kotsuspensionen in MRS Medium, Difco™ m Enterococcus Agar und Chapman Medium überprüft. Dabei konnten zu keinem Zeitpunkt bakterielle Kontaminationen nachgewiesen werden.

Die zweite Gruppe wurde mit einer Suspension aus vier Bakterien tetra-rekonstituiert (Tetra-Gruppe). Dafür wurde den Kühen 0,2 ml der Bakteriensuspension (Inokulum) oral eingegeben. Die genaue Zusammensetzung sowie die Anzahl der kolonienbildenden Einheiten der jeweiligen Bakterienstämme ist Tabelle 1 zu entnehmen. Das Inokulum wurde gewonnen, indem zunächst je 2,5 ml einer Übernachtskultur (bei 37°C) der DMS Stämme 7134, 7133 und des EcN in je 10 ml BHI Medium in ein Anaerobiergefäß überführt wurden, dem 2,5 ml einer Zweitageskultur (bei 37°C) des DSM Stammes 10702 in 100 ml DSMZ Medium 110 unter Stickstoff-Atmosphäre bebrütet, hinzugefügt wurde. Vor der Inokulation wurde eine Probe zur Bestimmung der Keimzahlen entnommen.

Tabelle 1: Zusammensetzung des Inokulums der Tetra-Gruppe

	<i>Escherichia coli</i> Nissle 1917	<i>Enterococcus</i> <i>faecium</i> DSM 7134	<i>Clostridium</i> <i>butyricum</i> DSM 10702	<i>Lactobacillus</i> <i>rhamnosus</i> DSM 7133
Inokulum in KBE pro Tier	6.59×10^7	4.32×10^7	8.90×10^3	1.24×10^7

Aus allen Isolatoren wurden in regelmäßigen Abständen Kotproben gewonnen und bakteriologisch untersucht, um eine Kontamination auszuschließen und die Kolonisierung mit den jeweiligen Bakterien zu überprüfen. Dies geschah durch Ausplattieren von Verdünnungsreihen von Kotsuspensionen in Natriumchlorid Lösungen (0,9g/l) auf den Bakterienstämmen entsprechenden Agarplatten (MRS, Difco™ m Enterococcus, Drigalsky; BHI und TSA je mit 0,5g/l Ammonium-Eisen-Citrat und 1g/l Natriummetabisulfit supplementiert und unter anaerobischen Bedingungen bebrütet) und anschließender Auszählung der kolonienbildenden Einheiten. Die Messergebnisse der bakteriologischen Untersuchung sind in Tabelle 2 zusammengefasst

Tabelle 2: Anzahl der KBE pro Gramm Kot der Bakterienstämme in der Tetra-Gruppe

Tag nach Inokulation	<i>Escherichia coli</i> Nissle 1917	<i>Enterococcus faecium</i> DSM 7134	<i>Clostridium butyricum</i> DSM 10702	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> DSM 7133
5	7.27×10^6	9.36×10^7	5.18×10^5	9.00×10^7
8	2.06×10^7	1.52×10^8	2.79×10^6	2.01×10^8
15	2.09×10^8	3.15×10^9	2.95×10^7	3.06×10^9
28	1.53×10^7	1.91×10^8	5.55×10^5	1.35×10^8
44	5.73×10^6	1.39×10^8	1.00×10^2	1.20×10^8
55	9.09×10^6	1.60×10^8	6.10×10^3	9.63×10^7

Eine Kontamination mit Fremd-Bakterien konnte über den gesamten Versuchszeitraum ausgeschlossen werden. Da aus Platzgründen nur eine geringe Anzahl an Hühnern in einem Isolator gehalten werden konnten und die Anzahl an verfügbaren Isolatoren limitiert war, wurden die Untersuchungen in insgesamt drei Versuchen durchgeführt. Im ersten Versuch wurden dabei die Keimfrei-Gruppe, die Mono-Gruppe und die konventionelle Gruppe jeweils bis zu einem Zeitpunkt von 28 Tagen nach dem Schlupf untersucht (Tabelle 3). In einem zweiten Versuch wurden die Tetra-Gruppe an Tag 14, 28 und 55 nach dem Schlupf und die konventionelle Gruppe an Tag 55 nach dem Schlupf beprobt (Tabelle 4). Im dritten Versuch wurde die Keimfrei-Gruppe an Tag 28 und 55 nach dem Schlupf analysiert (Tabelle 5).

4.2 GEWINNUNG VON PROBEN

Alle Probenentnahmen wurden in den Räumlichkeiten des INRA in Zusammenarbeit mit dem dort angestellten Personal durchgeführt. In der Folge wurde das gesamte Probenmaterial nach München in das Institut für Tierphysiologie überführt. In Tabelle 3, 4 und 5 sind die Anzahl der beprobten Tiere pro Gruppe und die jeweiligen Zeitpunkte angegeben.

Tabelle 3: Zeitpunkte der Probenentnahme und Anzahl der Tiere pro Gruppe in Versuch 1

Tag nach Schlupf	Keimfrei-Gruppe	Mono-Gruppe	konventionelle Gruppe
3	10	10	10
7	5	5	5
14	5	5	5
21	5	5	5
28	5	5	5
Gesamtzahl der Tiere	30 in 2 Isolatoren	30 in 2 Isolatoren	30 in 2 Käfigen

Tabelle 4: Zeitpunkte der Probenentnahme und Anzahl der Tiere pro Gruppe in Versuch 2

Tag nach Schlupf	Tetra-Gruppe	konventionelle Gruppe
14	5	-
28	5	-
55	5	5
Gesamtzahl der Tiere	15 in 1 Isolator	5 in 1 Käfig

Tabelle 5: Zeitpunkte der Probenentnahme und Anzahl der Tiere pro Gruppe in Versuch 3

Tag nach Schlupf	Keimfrei-Gruppe
28	5
55	5
Gesamtzahl der Tiere	15 in 1 Isolator

In Tabelle 6 ist das in den Versuchen entnommene Probenmaterial aufgeführt.

Tabelle 6: Übersicht über das gewonnene Probenmaterial

Tag nach Schlupf	Versuch	Proben		
		fixiert in RNAlater	schockgefroren in flüssigem Stickstoff	eingefroren
3	1	Caecum	Caecum	-
7	1	Caecum	Caecum	Plasma
14	1	Caecum	Caecum	Plasma
21	1	Caecum	Caecum	Plasma
28	1, 2 und 3	Jejunum, Caecum, Caecaltonsille, Colon	Jejunum, Caecum, Caecaltonsille, Colon	Plasma, Gallenflüssigkeit, Caecuminhalt
55	2 und 3	Caecum, Caecaltonsille	Caecum, Caecaltonsille	Plasma, Gallenflüssigkeit, Caecuminhalt

4.2.1 Gewinnung von Plasma

Material

Heparin Lösung (500 U/ml)

5 ml Heparin-Natrium (25.000IU/5ml) ³

Spritzen

Kanülen der Größe 0,7x40mm

Durchführung

Zu unterschiedlichen Zeitpunkten (Tabelle 6) wurden für die Blutentnahme an der Vena jugularis dextra mit Heparin Lösung beschichtete Spritzen und Kanülen der Größe 0,7 x 40mm verwendet. Das heparinisierte Vollblut wurde anschließend in einem 1,5 ml Eppendorf-Cup für 10 Minuten bei 4°C und 300xg zentrifugiert. Danach wurde das Plasma abpipettiert, in ein neues Probenröhrchen überführt und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert.

4.2.2 Gewinnung von Organen

Material

Flüssiger Stickstoff⁶

Trockeneis

RNAlater⁷

Alufolie

Gefrieröhrchen⁸

Lange Pinzette

Feines Präparierbesteck

Durchführung

Die Hühner wurden nach den am INRA gültigen Vorschriften in einer Kohlenstoffdioxidatmosphäre getötet und umgehend sezirt. Die Organe wurden entnommen und entsprechend der weiteren Analyse in geeignete Medien überführt. Dabei wurde darauf geachtet dass stets die gleichen Abschnitte der Organe entnommen wurden. Vom Jejunum wurde ein ca. 1 cm langer Abschnitt kaudal des Meckel'schen Divertikels für die Genexpressionsanalysen entnommen. Dafür wurde der Darm längs eröffnet und grobe Kotpartikel wurden vor der Überführung in RNAlater entfernt. Der kaudal folgende Abschnitt des Jejunums wurde für die Immunhistologie entnommen. Hierbei wurde ebenfalls ein ca. 1 cm langes Darmstück gewonnen. Dabei wurde darauf geachtet, dass das Gewebe nicht mit Instrumenten gequetscht wurde, um die anatomische Struktur des Darmes und die Zottenmorphologie zu erhalten. Die beiden Caeca wurden inklusive Ileum und nachfolgendem Colon aus der Bauchhöhle entnommen und in eine sterile Petrischale überführt (Abbildung 5). Dann wurden die Caeca vorsichtig vom Ileum gelöst und an ihrer Basis inklusive der Caecaltonsillen vom Colon abgetrennt. Eine CT wurde jeweils für die Immunhistologie verwendet, die andere für die Genexpressionsanalysen. Von der jeweils gleichen Seite wurde der oberhalb der CT liegende Abschnitt des Caecums mit einer Länge von ca. 1,5 cm für die entsprechende Verwendung weiter verarbeitet (Abbildung 5). Der Inhalt der übrig gebliebenen Blindsäcke der Caeca wurde zur Immunglobulinquantifizierung gewonnen und eingefroren. Ebenfalls für die Immunglobulinquantifizierung wurde Gallenflüssigkeit gewonnen, indem diese mittels einer 2 ml Spritze und einer Kanüle der Größe 0,7x40mm aus der Gallenblase aspiriert und ebenfalls eingefroren wurde. Der kaudale Bereich des Colons wurde für die Immunhistologie, der kraniale für die Genexpressionsanalysen entnommen (Abbildung 5).

Für die Genexpressionsanalysen wurden die Organe in eisgekühltem RNAlater aufgenommen, für 12 Stunden bei 4°C gekühlt und anschließend bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C gelagert.

Für die Immunhistologie wurden die jeweiligen Darmabschnitte gerade und nicht verdreht auf ein ca. 8 x 8 cm großes Stück Alufolie gelegt, welches anschließend in flüssigen Stickstoff getaucht wurde, bis das Gewebe vollständig durchgefroren war. Nun wurden die schockgefrorenen Darmstücke schnellstmöglich in ein mit Trockeneis vorgekühltes Gefrierrohrchen überführt, ohne dass das Gewebe antaute. Die Probe wurde daraufhin zurück in den flüssigen Stickstoff gegeben und dort bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

Gallenflüssigkeit und Caecuminhalt wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert.

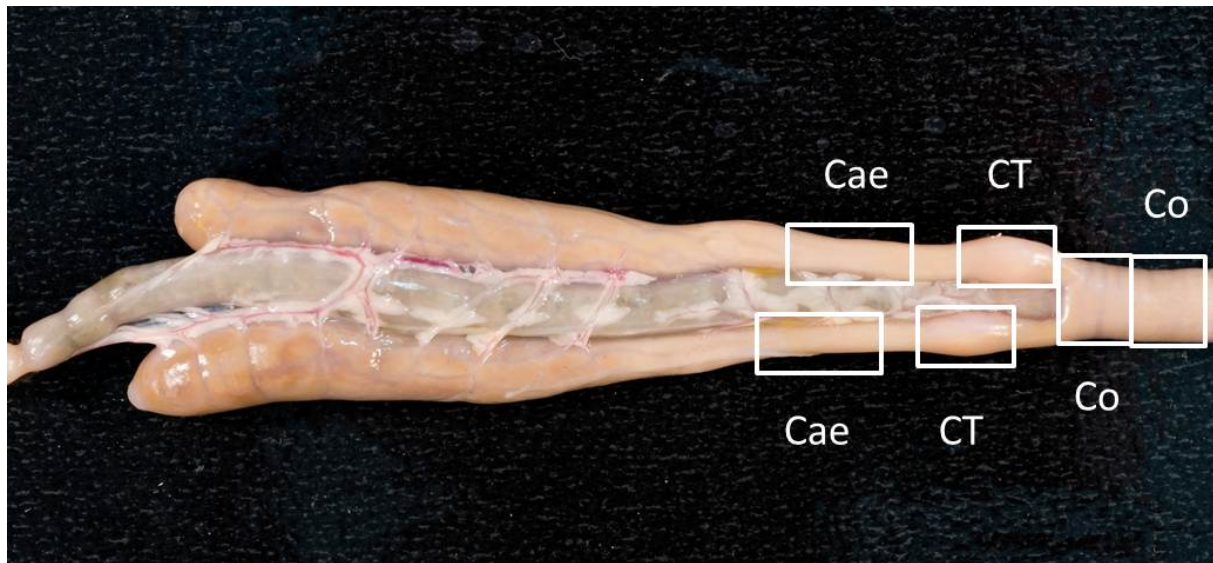


Abbildung 5: Präparation der Proben des Dickdarms

Die paarig angelegten Blinddärme (Caeca) sind über das Mesenterium mit dem Ileum verbunden. Die Caecaltonsillen sind jeweils an der Basis der Caeca lokalisiert. An der Basis der Blinddärme geht das Ileum in das beim Huhn vergleichsweise kurze Colon über. Die weißen Kästen markieren die jeweils entnommenen Abschnitte. Cae = Caecum, CT = Caecaltonsille, Co = Colon (Foto: Dr. Sven Reese)

4.3 IMMUNHISTOLOGIE

4.3.1 Herstellung von Eiweiß-Glycerin

Material

Glycerin, wasserfrei¹⁰

Thymol¹¹

Ethanol 70%

70 ml Ethanol vergällt 99%¹²

30 ml Aqua dest.

Hühner-Ei

Becherglas

Handrührgerät

Trichter

Filterpapier

Glasflasche

Durchführung

Zur Beschichtung von Objektträgern wurde Eiweiß-Glycerin hergestellt. Dazu wurden zwei Hühner-Eier gewaschen und anschließend mit Ethanol 70% abgerieben. Zwei 500 ml Bechergläser und die Aufsätze eines Handrührgerätes wurden ebenfalls mit Ethanol 70% gespült. In der Folge wurde das Eiweiß vom Eigelb getrennt und in einem Becherglas mit dem Handrührgerät steif geschlagen. Der Eischnee wurde daraufhin in einen mit Filterpapier ausgekleideten Trichter gegeben, welcher in das zweite Becherglas mündete. Zur Haltbarmachung wurde in den Eischnee eine haselnussgroße Menge Thymol gegeben. Ein weiteres Filterpapier wurde zum Abdecken des Eischnees verwendet. Über 24 bis 48 Stunden wurde der Eischnee bei 4°C filtriert. Die dabei gewonnene Flüssigkeit wurde in einer sterilen Glasflasche 1:1 mit Glycerin gemischt und bis zur weiteren Verarbeitung bei 4°C gelagert. Unmittelbar vor dem Aufzug der Kryostatschnitte, wurde auf die Objektträger eine sehr dünne Schicht des Eiweiß-Glycerins aufgetragen, um ein Ablösen des Gewebes zu verhindern.

4.3.2 Anfertigung von Kryostatschnitten

Die Anfertigung der Gewebeschnitte erfolgte mit einem CryoStar NX70⁴ Kryostat unter Verwendung von C35 Mikrotomklingen (Feather^{®9}). Vor dem Schneiden wurden die Darmproben aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und für 30 Minuten zum Temperaturangleich im Kryostat belassen. Anschließend wurde das Gewebe mit einem Tropfen Kryomatrix (Tissue Tek^{®5}) auf den Objektisch aufgefroren. Die Kryostatschnitte wurden in einer Schichtdicke von 7µm angefertigt, auf mit Eiweiß-Glycerin beschichtete Superfrost[®] Plus⁵ Objektträger aufgezogen und bei Raumtemperatur 24 Stunden luftgetrocknet.

4.3.3 Immunhistochemische Färbung

Material

Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS), pH 7,2

8,00g Natriumchlorid¹⁰

1,45g Di-Natriumhydrogenphosphat-dihydrat¹⁰

0,2g Kaliumchlorid¹⁰

0,2g Kaliumhydrogenphosphat¹⁰

ad 1000 ml Aqua dest.

Einstellen des pH mit HCl und NaOH auf 7,2

Aceton 100%¹⁰

Primäre monoklonale Antikörper (siehe Tabelle 7)

Sekundärer Peroxidase-konjugierter Antikörper (goat-anti-mouse HRP¹⁴)

Hühnerserum

Feuchte Kammer

Glasküvetten

Vector[®] DAB-Kit¹³

Aqua dest.

Mayer's Hämatoxylin-Lösung⁹

Aufsteigende Alkoholreihe (70% Ethanol, 99% Ethanol, Isopropanol 1, Isopropanol 2, Xylol 1, Xylol 2)

Eukitt[®] Eindeckelmedium⁹

Deckgläser⁹

Tabelle 7: In der Immunhistologie verwendete primäre monoklonale Antikörper

Antigen	Klon	Isotyp	Konzentration	Hersteller	Referenz
chB6	AV20	IgG1	5 µg/ml	15	[202, 203]
chCD4	CT4	IgG1	5 µg/ml	15	[204]
chCD8a	CT8	IgG1	2 µg/ml	15	[205]
chTCR $\gamma\delta$	TCR1	IgG1	2,5 µg/ml	16	[206]
chTCR α V β 1	TCR2	IgG1	2 µg/ml	15	[207]
chMQ	Kul01	IgG1	5 µg/ml	16	[208]
chIgM	M1	IgG1	0,5 µg/ml	15	[209]
chIgA	A1	IgG1	0,5 µg/ml	15	[209]
chIgY	G1	IgG1	3,5 µg/ml	15	[209]

Durchführung

Die Gewebeschnitte wurden in 100% Aceton für 10 Minuten fixiert und danach 15 Minuten luftgetrocknet. 200 µl des verdünnten primären, monoklonalen Antikörpers wurden auf jeden Objektträger aufgetragen und in der feuchten Kammer bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert. Die verwendeten Primärantikörper (Tabelle 7) wurden zuvor mit PBS auf die gewünschte Konzentration eingestellt. Als Negativkontrolle wurde auf einen Objektträger nur PBS aufgetragen. Anschließend wurden die Präparate 3x in PBS gewaschen. Es folgte die Inkubation der Gewebeschnitte für 30 Minuten mit einem *goat-anti-mouse* Peroxidase-konjugierten Antikörper (Verdünnung 1:100 in PBS pH 7,2, 25% Hühnerserum). Nach einem dreimaligen Waschschrift mit PBS wurden 100µl der frisch angesetzten Entwicklungslösung (3,3'-Diaminobenzidin, DAB) auf die Schnitte aufgetragen, 5 Minuten inkubiert und wiederum mit PBS gespült. Die Reaktion wurde mit Aqua dest. abgestoppt. Anschließend wurden die Präparate für 1 Minute mit Hämatoxylin gegengefärbt und 5 Minuten in fließendem Leitungswasser gebläut. In der aufsteigenden Alkoholreihe wurden die Schnitte entwässert, mit Eukitt Eindeckelmedium und einem Deckglas eingedeckelt und über Nacht getrocknet. Unter dem Hellfeldmikroskop (Zeiss Axioskop) wurden die fertigen Färbungen der Schnitte begutachtet und mithilfe einer Zeiss AxioCam MRc5 fotografisch dokumentiert. Positiv markierte Strukturen erscheinen im Hellfeldmikroskop braun, die Zellkerne sind immer blass blau angefärbt. In den Kontrollpräparaten erscheinen die Zellkerne ebenfalls blau, jedoch sind hier keine braun angefärbten Strukturen sichtbar. Diese Kontrollpräparate dienen der Bestimmung unspezifischer Bindung des sekundären Antikörpers im Gewebe.

4.4 RNA PRÄPARATION FÜR DIE GENEXPRESSIONSANALYSEN

4.4.1 RNA-Isolation

Zur Isolierung der RNA wurde eine Guanidinisothiocyanat-Phenol-Chloroform Extraktion durchgeführt.

Material

PeqGold Trifast Reagenz (Trizol)¹⁷

Lagerung bei 4°C

Chloroform ad analysis¹⁰

Aqua bidest, nukleasefrei

Isopropanol¹⁰

DNA PrecipitAid¹⁰ (lineares Polyacrylamid)

70% Ethanol

70 ml Ethanol absolut¹⁰

30 ml Aqua bidest, nukleasefrei

10% SDS-Lösung

10g SDS¹⁰

ad 100 ml Aqua dest.

Durchführung

Alle Arbeiten wurden mit RNAase freiem Einwegmaterial und Handschuhen durchgeführt. Jegliches Arbeitsmaterial sowie die Arbeitsflächen wurden mit einer 10%igen SDS-Lösung behandelt.

Bis zu 100 mg Organgewebe wurde in 1 ml gekühltem Trizol aufgenommen. Das Gewebe wurde mit einem PreCellys Homogenisator¹⁷ aufgeschlossen. Dafür wurden die Proben 10 Sekunden bei 5.000rpm homogenisiert. Sofern das Gewebe durch einmalige Homogenisierung nicht ausreichend aufgeschlossen werden konnte, wurde nach einer zweiminütigen Pause, in der die Probe gekühlt wurde, ein weiteres Homogenisierungsintervall durchgeführt. Anschließend wurden jeder Probe 200µl Chloroform zugegeben und die Mischung 30 Sekunden stark geschüttelt. Anschließend wurde die Probe fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im folgenden Zentrifugationsschritt (12.000xg bei 6°C für 15 Minuten) trennte sich die Suspension in drei Phasen: eine milchig-rosa Phase mit organischem Material, eine weiße Interphase mit DNA und eine wässrige Phase mit RNA. Die wässrige Phase wurde vorsichtig abgenommen und in ein 500 µl

Isopropanol enthaltendes Eppendorf-Cup überführt und durch Schwenken gemischt. Die Probe wurde 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Zeit kam es zur Ausfällung der RNA. Anschließend wurde die Probe 10 Minuten bei 6°C mit 12000xg zentrifugiert. Es bildete sich ein RNA-Pellet am Boden. Von diesem RNA-Pellet wurde der Überstand vorsichtig abgenommen. Nun wurde das Pellet in 70%igem Ethanol gewaschen und erneut fünf Minuten bei 6°C mit 7.600xg zentrifugiert. Erneut wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und das RNA-Pellet maximal 30 Minuten bei Raumtemperatur unter der PCR-Arbeitsstation¹⁷ getrocknet und in 100µl nukleasefreiem Aqua bidest. aufgenommen. Damit sich das Pellet löste, wurden die Proben für 10 Minuten bei Raumtemperatur und für 10 Minuten bei 58°C und 300rpm geschüttelt. Anschließend wurde die RNA-Konzentration und Reinheit im NanoDrop-Fotometer¹⁷ bestimmt und die Konzentration der RNA auf 500-1000ng/ml mit nukleasefreiem Aqua bidest. eingestellt. Die RNA wurde kurzfristig auf -20°C und langfristig auf -80°C gelagert.

4.4.2 Reinheitsbestimmung der RNA im NanoDrop

Die Konzentration und Reinheit der RNA wurde im NanoDrop-Fotometer¹⁷ bestimmt. Kontaminationen können durch Phenol oder durch im Trizol enthaltene chaotrope Salze verursacht werden, was zu einer Hemmung der cDNA Synthese oder der Bindungskapazität eines Fluoreszenzfarbstoffes führen kann. Im NanoDrop wurde die Absorption der RNA bei 230 nm bis 280 nm gemessen. Reine RNA absorbiert maximal bei 260 nm, während mit Guanidinisothiocyanat verunreinigte RNA bei 230 nm und mit Phenol verunreinigte RNA bei 270 nm absorbiert. Mit Hilfe des NanoDrops werden die Absorptionsverhältnisse von 260 nm zu 230 nm (260/230) und von 260 nm zu 280 nm (260/280) bestimmt. Für die weiter verarbeitete RNA wurden Grenzwerte von mindestens 1,9 im 260/280 Verhältnis und von mindestens 2,0 im 260/230 Verhältnis vorausgesetzt.

4.4.3 Bestimmung der RNA Integrität im Agilent 2100 Bioanalyzer

Material

RNA 6000 Nano-Kit¹⁸

Durchführung

Die Proben der isolierten RNA wurden nach Herstellerangaben aufgetragen und analysiert. Für die weitere Analyse der RNA wurde eine RIN von mindestens 7,8 vorausgesetzt.

4.5 CDNA SYNTHESE

Die isolierte RNA wurde in eine komplementäre 'copy'DNA (cDNA) umgeschrieben. Dafür wurden Reverse Transkriptase und Random Hexamer Primer verwendet. Random Hexamer Primer bestehen aus einer Mischung aus allen möglichen Kombinationen von Adenin, Thymin, Guanin und Cytosin.

Vor der cDNA Synthese wurde ein DNase Verdau durchgeführt, der Verunreinigungen mit genomischer DNA entfernte. Alle Arbeitsflächen und Arbeitsgeräte wurden vor Beginn der Arbeit mit 10%iger SDS Lösung gereinigt. Die Arbeit wurde unter einer PCR Arbeitsstation¹⁷ durchgeführt, die zuvor durch Bestrahlung mit ultraviolettem Licht dekontaminiert wurde. Je Probe wurde 400 ng Gesamt-RNA streng nach Herstellerangaben in cDNA umgeschrieben. Die umgeschriebene cDNA konnte als Matrize in der qRT-PCR eingesetzt werden. Nach dem Verdau der genomischen DNA wurde die verbleibende RNA dazu genutzt von einer einzelsträngigen RNA einen RNA-DNA-Hybridstrang mittels einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase zu synthetisieren.

4.5.1 DNase Verdau

Material

RNA Proben

Lagerung bei -80°C

DNase I, RNase free²³ (1U/μl)

Lagerung bei -20°C

10x Reaktionspuffer mit MgCl²³

Lagerung bei -20°C

Aqua bidest. (nukleasefrei)

Lagerung bei -20°C

25mM EDTA Lösung²³

Lagerung bei -20°C

Durchführung

Ansatz für einen DNase Verdau

RNA	1 μg
10x Reaktionspuffer mit MgCl	1 μl
DNase	1 μl (1U/μl)

Aqua bidest. (nukleasefrei)	ad 10 µl
30 Minuten Inkubation bei 37°C	
25mM EDTA	1 µl
10 Minuten Inkubation bei 65°C	

4.5.2 cDNA Synthese

Material

DNase verdaute RNA

GoScript™ Reverse Transcription System³

Lagerung bei -20°C

Aqua bidest. (nukleasefrei)

Lagerung bei -20°C

Durchführung

DNase verdaute RNA	4,4 µl
Random Hexamer Primer (100pmol)	1 µl
Aqua bidest. (nukleasefrei)	4,6 µl
5 Minuten Inkubation bei 70°C	
5 Minuten Inkubation auf Eis	
Aqua bidest. (nukleasefrei)	1,5 µl
GoScript 5x Reaktionspuffer	4 µl
MgCl (25mM)	2 µl
PCR Nukleotid Mix (0,5mM)	1 µl
RNasin Ribonuklease Hemmer	0,5 µl
GoScript Reverse Transkriptase	1 µl
5 Minuten Inkubation bei 25°C	
60 Minuten Inkubation bei 42°C	
15 Minuten Inkubation bei 70°C	

Im Anschluss wurden die Proben bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

4.6 QUANTITATIVE REAL TIME POLYMERASE KETTENREAKTION (QRT-PCR)

Die qRT-PCR dient dazu, die Menge an cDNA eines bestimmten Gens in einer Ausgangsprobe quantitativ zu bestimmen. Sie beruht auf dem Prinzip der konventionellen Polymerase Kettenreaktion. Dabei wird ein fluoreszierender Farbstoff (*SYBR Green*) in die DNA-Stränge eingebaut. Die Fluoreszenz Intensität wird nach jedem PCR-Zyklus ermittelt und nimmt proportional mit der Menge an PCR-Produkt zu, so dass anhand der Stärke der Fluoreszenz die relative Menge an cDNA eines bestimmten Gens in der Probe ermittelt werden kann.

Material

GoTaq q-PCR Mater Mix³

Lagerung bei -20°C

Aqua bidest. (nukleasefrei)

Lagerung bei -20°C

qPCR Primer (5pmol/µl)²⁴

Lagerung bei -20°C

QuantiTect Primer Assays²⁵

Lagerung bei -20°C

Verwendete Primer

In der qRT-PCR wurden sowohl eigens genierte, als auch kommerziell erhältliche Primer von Qiagen verwendet. Die selbst zusammengestellten Primer wurden nach einer einheitlichen Annealing-Temperatur von 59°C und einer Amplikongröße von 80 bis 150 Nukleotiden gewählt. Sie weisen eine Länge von etwa 20 Nukleotiden auf und bilden weder Selbst- noch Kreuz-Dimere und keine Sekundärstrukturen. Für jedes Primerpaar wurde die Bindungseffizienz in einer Standardkurve bestimmt. Die Synthese der Primer erfolgte durch die Firma MWG, Ebersberg. Die Spezifität der Primerpaare wurde durch Sequenzierung des Amplifikats überprüft (Firma GATC, Konstanz). Die von der Firma Qiagen GmbH, Hilden hergestellten QuantiTect Primer Assays wurden gemäß den Herstellerangaben mit nukleasefreiem Aqua bidest. auf eine Konzentration von 10x eingestellt.

Tabelle 8: Verwendete qRT-PCR Primer

Primer	Primersequenz sense	Primersequenz antisense	Herkunft
GAPDH	AGTCATCCCTGAGCTGAATG	AGGATCAAGTCCACAACACG	MWG
18S rRNA	CATGTCTAAGTACACACGGGCGGTA	GGCGCTCGTCGGCATGTATTA	MWG
chB6	GATCGCCTGCCCTCCAAT	TGGCTTTCCACGTCAGCTATC	MWG
IgY	TGGAGGGAAGGGAAGAGTTACAG	TCCGGGCATCCCTTGAC	MWG
IgA	CGCCCCCTCCGTCTACGT	CGAAATCGGTTGGTTTTGTTG	MWG
AID	CGTCTGAAACCCAGCAAGAGT	TGTCCATGTCAGCTGGGTCT	MWG
TGFb	ACCTCGACACCGACTACTGCTT	AGAAGTTGGCCATATAACCTTTGG	MWG
Il1b	CTGAGTCATGCATCGTTTATGTTTC	AAATACCTCCACCCCGACAAG	MWG
Il6	GCTTCGACGAGGAGAAATGC	GCCAGGTGCTTTGTGCTGTA	MWG
CD40L	AACAGTGAGAGTGCTGAAGTGGAT	GCAGAAGCTGACTTGTGAGTAGATG	MWG
CXCR5	CGCTCGCCTATCTGCTTATGT	AAGTTTTCGGTGGTTGTTCTGA	MWG
TNFSF13B (BAFF)	Sequenz unbekannt		Qiagen
TNFRSF13C (BAFF-Rez)	Sequenz unbekannt		Qiagen
TNFRSF13B (TACI)	Sequenz unbekannt		Qiagen
PIGR	Sequenz unbekannt		Qiagen
IL21	Sequenz unbekannt		Qiagen
IgJ	Sequenz unbekannt		Qiagen
CD4	Sequenz unbekannt		Qiagen
CD8a	Sequenz unbekannt		Qiagen

Durchführung qRT-PCR

Alle Arbeitsflächen und Arbeitsgeräte wurden vor Beginn der Arbeit mit 10%iger SDS Lösung gereinigt. Die Arbeit wurde unter einer PCR Arbeitsstation¹⁷ durchgeführt, die zuvor durch Bestrahlung mit ultravioletttem Licht dekontaminiert wurde. Jeder Ansatz wurde als echtes Duplikat pipettiert. Für die Primer der Firma MWG wurde aus den folgenden Reagenzien ein Mastermix pipettiert:

Primer sense	1,5 µl
Primer antisense	1,5 µl
Aqua bidest. (nukleasefrei)	4,25 µl
GoTaq Mastermix	12,5 µl
100xCXR Reference Dye	0,25 µl

Für die QuantiTect Primer Assays wurde aus den folgenden Reagenzien ein Mastermix pipettiert:

Primer	2,5 µl
Aqua bidest. (nukleasefrei)	4,75 µl
GoTaq Mastermix	12,5 µl
100xCXR Reference Dye	0,25 µl

Von diesem Mastermixen wurden 24 µl in eine 96-Loch-PCR-Platte²⁶ pipettiert und jeweils 5 µl cDNA zugegeben. Die PCR-Ansätze wurden vorsichtig gemischt und mit einer durchsichtigen, selbstklebenden Folie abgedichtet. Die Platte wurde kurz zentrifugiert um Luftblasen zu entfernen. Die qRT-PCR mit Primern der Firma MWG wurde nach folgendem Temperaturprotokoll durchgeführt:

Phase	Funktion	Temperatur	Wiederholungen	Zeit
Initiale Aktivierungsphase		95°C	1 mal	2 Min.
Amplifikationsphase	Denaturierung	95°C	40 mal	15 Sek.
	Annealing	59°C		30 Sek.
	Extension	72°C		30 Sek.
Schmelzkurve		95°C	1 mal	15 Sek.
		57°C		30 Sek.
		95°C		15 Sek.

Die qRT-PCR mit Primern der Firma Qiagen wurde nach folgendem Temperaturprotokoll durchgeführt:

Phase	Funktion	Temperatur	Wiederholungen	Zeit
Initiale Aktivierungsphase		95°C	1 mal	2 Min.
Amplifikationsphase	Denaturierung	95°C	40 mal	15 Sek.
	Annealing	56°C		30 Sek.
	Extension	72°C		30 Sek.
Schmelzkurve		95°C	1 mal	15 Sek.
		57°C		30 Sek.
		95°C		15 Sek.

Auswertung

Um das Ergebnis einer qRT-PCR vergleichbar zu machen, wurde der CT-Wert (*threshold cycle*) in der exponentiellen Phase ermittelt. Da die Proben in Duplikaten aufgetragen wurden, wurde ein Mittelwert der CT-Werte errechnet und auf den Mittelwert des CT-Wertes des *Housekeeping*-Gens (GAPDH bzw. 18S rRNA) normalisiert. Durch Subtraktion des CT-Wertes der GAPDH von dem CT-Wert der Probe ergab sich der Δ CT-Wert. Nun wurde der Δ CT von der maximalen Anzahl der Amplifikationszyklen abgezogen, $40 - \Delta$ CT, um einen zur Expression direkt proportionalen Wert zu erhalten. Da bei einigen Proben weniger mRNA von GAPDH als des Gens PIGR vorhanden war, wurde hier als *Housekeeping*-Gen die 18S rRNA verwendet, um keine negativen Δ CT-Werte zu erhalten. Um mehrere Gruppen, beispielsweise die Gruppen „Keimfrei“ und „Kolonisiert“ miteinander zu vergleichen, wurde der Δ CT-Wert einer Gruppe vom Δ CT-Wert einer anderen Gruppe abgezogen. Dies ergab den $\Delta\Delta$ CT-Wert. Dadurch erhielt man die relative Expressionsänderung zwischen „Keimfrei“ und „Kolonisiert“. Um die n-fache Expression E eines Gens der Gruppe „Kolonisiert“ im Vergleich zu der Gruppe „Keimfrei“ zu ermitteln, wurde die Formel $E = 2^{-\Delta\Delta CT}$ verwendet.

4.7 MICROARRAY

4.7.1 Agilent Microarray

Für die Analyse der Proben wurde der Agilent Oligonukleotid Microarray „Agilent 8x60k chicken-Genom“ Katalog-Array verwendet. Dieser ermöglicht die gleichzeitige Analyse von acht Proben auf einem Glaträger mit jeweils 60.000 Spots. Jeder Spot repräsentiert eine aus 60 Nukleotiden bestehende Sequenz, die mit einem speziellen Druckverfahren auf einen Glaträger synthetisiert wurde. Auf dem „Agilent 8x60k chicken-Genom“ Katalog-Microarray ist ein Querschnitt aller bekannten Hühnergene zu finden. Zusätzlich bietet Agilent die Möglichkeit, weitere Gene auf dem Microarray analysieren zu lassen. Die GenIDs oder Nukleotidsequenzen der Gene wurden in das online verfügbare Programm „eArray“ geladen und durch spezielle Algorithmen wurden für das Gen spezifische Oligonukleotide berechnet. Dadurch konnten zu den bereits von Agilent gespotteten Genen weitere 4.650 Gene analysiert werden. Dazu zählten 1.637 Hühnergene, die spezielle Funktionen im Bereich des Immunsystems erfüllen. Mängel in der Annotation wurden im Rahmen von früheren Dissertationen [210] über eine eigens für das Projekt AvImmun entwickelte Software „AvI-Blast“ und im Internet verfügbare ID-Converter wie DAVID, Babelomics und g:Profiler stark verbessert. Durch diese Arbeiten konnten den 60.000 Spots auf dem Microarray 47.142 Proben zugeordnet werden. Da einige Gene wiederholt als Spots auf den Microarray geladen wurden, entspricht dies 13.160 Genen, die mit Hilfe des Microarrays detektiert werden können.

4.7.2 cDNA Synthese

Material

Low-Input Quick Amp Labeling Kit¹⁸

RNA Spike-In-Kit, one Color¹⁸

RNeasy Mini Kit¹⁸

RNA-Proben

Durchführung

Den RNA-Proben wurden als Positivkontrolle sogenannte *Spike-In-RNAs* zugesetzt. Diese bestehen aus zehn definierten Transkripten, die nur minimal selbst- und kreuzhybridisieren. Bei der Hybridisierung binden die *Spike-In-RNAs* an *Spike-In*-Proben. Diese *Spike-In*-Proben weisen keine komplementäre Sequenz zu biologischen Replikaten auf.

Bei der cDNA Synthese wurden 50 ng RNA nach Herstellerangaben mit einer rekombinanten reversen Transkriptase 1:1 in cDNA umgeschrieben. Als Primer für die reverse Transkriptase wurden T7-Promotor-Primer eingesetzt. Diese Primer binden an poly-Adenosin-RNA Abschnitte (poly-A-Schwanz der mRNA), wodurch nur der mRNA-Anteil in cDNA umgeschrieben wird. Gleichzeitig enthalten diese Primer auch eine Promotorsequenz für die in der cRNA-Synthese verwendete T7-RNA Polymerase.

4.7.3 cRNA Synthese

Material

Low-Input Quick Amp Labeling Kit¹⁸

Cyanine 3 CTP Dye Pack¹⁸

Durchführung

Während der cRNA Synthese kam es neben der Umschreibung von cDNA in cRNA auch zu einer Amplifikation durch die T7-RNA Polymerase. Dabei wurden in die neu synthetisierte cRNA spezielle Nukleotide eingebaut, die zuvor mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert wurden. In unserem Versuch wurden Cytosintriphosphate (CTP) verwendet, die mit einem Polymethin-Farbstoff, dem Cyanine3 (Cy3), gekoppelt waren. Die Durchführung erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers.

4.7.4 Aufreinigung und Bestimmung der spezifischen Cy3 Aktivität

Material

RNeasy Mini Kit¹⁹

Durchführung

Die Silikatmembran-basierte Aufreinigung der cRNA wurde gemäß Herstellerangaben durchgeführt, um Rückstände aus den bisher durchgeführten Reaktionen aus den Proben zu entfernen. Die Proben wurden im NanoDrop gemessen, um die Gesamt-cRNA Ausbeute und die spezifische Cy3-Aktivität zu bestimmen. Dafür wurde das Verhältnis der Cy3 Konzentration (pmol/μl) zur Menge der Gesamt cRNA (μg) berechnet. Für die weitere Verwendung musste eine cRNA Gesamtmenge von mindestens 0,825 μg und eine spezifische Cy3 Aktivität von mehr als 6,0 pmol Cy3 pro μg RNA vorliegen.

4.7.5 Fragmentierung der cRNA

Material

Gene Expression Hybridisation Kit¹⁸

Durchführung

Zur Optimierung der Hybridisierungskinetik mussten die cRNA Stränge fragmentiert werden. Dafür wurde zu 600 ng cRNA 1 µl 25x Fragmentarisierungspuffer zugegeben. Diese Mischung wurde exakt 30 Minuten bei 60°C inkubiert. Durch die anschließende Zugabe des Hybridisierungspuffers wurde die Fragmentation gestoppt und die Probe in ein geeignetes Medium für die Hybridisierung überführt.

4.7.6 Hybridisierung des Microarrays

Material

8x60k Microarray Slides¹⁸

Gasketslides¹⁸

Durchführung

Zur Hybridisierung wurden 40 µl der Hybridisierungsflüssigkeit mit dem Microarray inkubiert. Für alle Arbeitsschritte mit Microarray- oder Gasketslides galten hohe Ansprüche an Sauberkeit und Präzision. Alle Arbeitsschritte wurden mit puderfreien Handschuhen durchgeführt, die Slides durften nur seitlich berührt werden und die Luftexposition der Arrays wurde durch rasches Arbeiten minimiert.

Zunächst wurde in eine Hybridisierungskammer ein Gasketslide eingelegt. Dabei handelt es sich um einen Glasträger, auf dem ringförmige Gummidichtungen aufgebracht sind und entsprechend des Microarrayformats acht Microarrays pro Slide möglich sind. Die Hybridisierungsflüssigkeit wurde mittig in diesen Gummiring pipettiert. Nachdem dies für alle acht Microarrays auf dem Gasketslide durchgeführt wurde, entstand durch das Auflegen eines Arrayslides zwischen den beiden Glasträgern ein durch den Gummiring abgedichteter Raum (Gasket-Array-Sandwich). Nach dem Schließen der Hybridisierungskammer wurde kontrolliert, ob die gesamte Arrayfläche vollständig benetzt war und keine Luftblasen die gleichmäßige Hybridisierung behinderten. Die Arrays wurden für 17 Stunden in einem Hybridisierungssofen bei 65°C und 10rpm inkubiert. Dabei wurde die kontinuierliche Durchmischung der Hybridisierungsflüssigkeit durch eine einzelne mobile Luftblase und die

gleichmäßige Drehung der Arrays während der Hybridisierung gewährleistet.

4.7.7 Waschen und Scan des Microarrays

Material

Gene Expression Wash Buffer 1¹⁸

Gene Expression Wash Buffer 2¹⁸

Triton X-102¹⁸

Durchführung

Nach der Hybridisierung wurden die Microarray-Gasketslide-Sandwiches in einem Bad mit 500 ml Waschpuffer 1 gewaschen, um die nicht gebundenen cRNA Fragmente zu entfernen. Die Trennung des Microarray vom Gasketslide erfolgte mit Hilfe einer Pinzette. Anschließend wurden die Microarrays erneut in ein Bad mit Waschpuffer 1 gestellt und dort gesammelt, bis alle bearbeiteten Microarrayslides in Waschpuffer 1 standen. Daraufhin kamen die Microarrayslides für eine Minute in Waschpuffer 2 (31°C) und wurden langsam herausgezogen, damit die Flüssigkeit gleichmäßig abfließen konnte. Schließlich wurden die Microarrays in einem Agilent G2505C Scanner bei einer Auflösung von 3 µm gescannt.

4.7.8 Programme zur Auswertung der Microarrays

Agilent Feature Extraction Software Version 10.5.1.1

Die *Agilent Feature Extraction Software* diente zum Einlesen und Prozessieren der Bilddatei des Scans. Dadurch konnten die Daten weiter analysiert werden. Jedem *Feature* bzw. Spot auf dem Microarray wurde über ein ausgelegtes Raster eine *Probe-ID* zugeordnet. Außerdem rechnete die Software die Signalintensität jedes *Features* in einen Zahlenwert um. Zeigte ein *Feature* Abnormitäten, wurde es von der Software erkannt und entfernt. Ein Qualitätsreport wurde anhand der mitanalysierten *Spike-In*-Proben erstellt. Außerdem wurde von der Software über die *Spike-In*-Proben der lineare Bereich der Quantifikation, die Nachweisgrenze und der Punkt der Sättigung bestimmt.

Microarray Pipeline

Zur weiteren Auswertung der Microarray Daten wurde das von Alexander Graf (Genzentrum, LMU München) programmierte Programm „*Microarray Pipeline*“ verwendet. Dieses bedient sich des Programms Bioconductor „R“ Version 2.12.1 und „limma“ (*Linear Models for Microarray Data*) Version 3.6.9 zur Normalisierung und statistischen Auswertung der Daten.

Die „*Microarray Pipeline*“ benötigt eine Eingabedatei als Tabstopp getrennte Textdatei, aus der das Programm die Probenzugehörigkeit erkennt. In dieser Datei wurde der Programmpfad zum Speicherort der extrahierten Arraydaten und den Dateinamen der Datei, in der die Fluoreszenz Intensitäts-Werte der einzelnen Arrays zu finden sind, untereinander gelistet. In einer weiteren Zeile wurde jedem Array eine Probenzugehörigkeit (*Condition*) zugewiesen. Hatte man beispielsweise 15 Arrays in 3 Gruppen mit jeweils 5 Teilnehmern und hatte man diese in der Textdatei nacheinander gelistet, stand in der erwähnten Zeile: Conditions: a, a, a, a, a, b, b, b, b, b, c, c, c, c, c. In einer weiteren Zeile wurden dem Programm die gewünschten Vergleiche vorgegeben (*Comparisons*). Bei einem Vergleich aller Gruppen miteinander, musste für oben genanntes Beispiel folgendes angegeben werden: *Comparisons*: a-b, a-c, b-c. Des Weiteren konnte der WABG (*Well Above Background*) Wert festgelegt werden, von wie vielen Proben einer Gruppe ein Fluoreszenzsignal eines Spots gemessen werden konnte. Es wurde festgelegt, dass bei fünf Proben pro Gruppe mindestens bei vier der fünf Proben ein Fluoreszenzsignal messbar sein sollte. Nun errechnete das Programm die signifikant regulierten Gene anhand der manuell eingegebenen Grenzen. Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden Gene mit einem mindestens zweifachen Expressionsunterschied zwischen zwei Gruppen und einer FDR (*False Discovery Rate*) von weniger als oder gleich 5%, bzw. einem *adjusted p-value* von kleiner gleich 0,01, als signifikant reguliert betrachtet. Das Programm stellte verschiedene Ausgabedateien zur Verfügung. Zum einen die Qualitätskontrollen mit einer graphischen Darstellung der Daten vor und nach der Normalisierung (*raw_data_boxplot*, *mean_Sd_plot*, *_normalized_data_boxplot* und *heatmap*) und zum anderen eine Textdatei mit VSN (*Variance Stabilization and Normalization*) normalisierten Werten. Zudem erhielt man eine durch *limma* generierte Textdatei, aus der man alle Expressionswerte und die FDR, bzw. den *adjusted p-value*, ansehen konnte. Diese konnte man nun wiederum anhand des gewünschten Signifikanzniveaus filtern und mit den verbliebenen signifikant regulierten Genen manuell weiterarbeiten. Zusätzlich erhielt man verschiedene Graphiken in Form von PDF-Dateien. Aus einer dieser Dateien konnte man in Form von Venn Diagrammen die Schnittmengen an Genen zwischen den Gruppen erkennen. Zwei weitere PDF-Dateien stellten die Gene in Form einer MeV (*Multi experiment Viewer*) Analyse als *heatmap* bzw. in Form einer MeV SOTA (*Self Organizing Tree Algorithm*) Analyse als Clusteranalyse dar. Zur Generierung der *heatmap* wurden die signifikant regulierten Gene mit dem Programm *heatmap.2* aus dem Paket *clValid* geplottet. Dazu wurden die Expressionswerte mit Hilfe der Reihenmittelwerte normalisiert, um den gleichen dynamischen Bereich zwischen den einzelnen Genen zu erhalten. Zur Distanzberechnung wurde die euklidische Distanzmatrix verwendet. Die

Distanzwerte wurden dann heuristisch geclustert und in einer *heatmap* dargestellt. Die Clusteranalyse wurde ebenfalls mit dem Paket *clValid* durchgeführt. Dazu wurden wiederum die Expressionswerte mit Hilfe der Reihemittelwerte normalisiert und anschließend die Matrix mit der SOTA Funktion geplottet. Auch hier wurden die Distanzen mit der euklidischen Distanzmatrix berechnet. Diese Art der Analyse diente der Darstellung dynamischer Expressionsverläufe zwischen den Gruppen. Für beide Analysen erhielt man zudem noch Textdateien mit den Genen, die in den verschiedenen Clustern zu finden waren.

Berechnung der Expressionsänderung (fold change)

Mit dem *fold change* (FC) können Expressionsänderungen zwischen zwei Gruppen errechnet werden. Dafür wurden in einer Excel Tabelle die *Probe-IDs* der einzelnen Spots und deren durch die „Microarray Pipeline“ errechneter Koeffizient der einzelnen Vergleiche gelistet. Dieser Koeffizient gibt den logarithmierten FC jedes Spots der verschiedenen Gruppenvergleiche wider. Der FC wurde errechnet, indem man diesen Koeffizienten zur Basis 2 exponenzierte. Werte über 1 bedeuten, dass ein Spot in Gruppe 2 eine höhere Expression als in Gruppe 1 hat. Werte zwischen 0 und 1 bedeuten, dass ein Spot in Gruppe 2 eine weniger starke Expression als in Gruppe 1 hat. Ein Wert von 1 bedeutet, dass es keinen Expressionsunterschied zwischen Gruppe 1 und Gruppe 2 gibt. Zur vereinfachten Darstellung und besseren Interpretationsmöglichkeit der herunterregulierten FC-Werte wurden diese in negative Zahlenwerte umgerechnet. Dafür wurde folgende Excel Funktion durchgeführt: `=WENN(FC<1;-1/FC;FC)`. So ergab sich aus einem FC von 0,5 vor der Umrechnung, ein Wert von -2, also eine 2-fach schwächere Regulation/Herunterregulation des Spots.

Microsoft Office Access Datenbanksystem

Zur vergleichenden Analyse verschiedener Datensätze wurde Microsoft Access 2010 verwendet.

Pathway Express

Die Datensätze mit signifikant regulierten *Spots* aus den Microarray Experimenten wurden mit dem online Programm „Pathway Express“ (*Intelligent Systems and Bioinformatic Laboratory*) analysiert. Mit diesem Programm können die für die Analyse biologisch relevanten Signalwege identifiziert werden. Dabei bedient sich das Programm der KEGG Datenbank (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*). Für die Analyse mit „Pathway Express“ müssen eine Eingabedatei und eine Referenzdatei als Textdateien erstellt werden. Die Eingabedatei enthält die Gensymbole der signifikant regulierten Spots und die

entsprechenden FCs. Die Referenzdatei enthält alle orthologen Gensymbole, die auf dem Microarray zu finden sind. Als Ergebnis der Analyse erhält man ein Datenblatt mit den identifizierten Signalwegen und einigen weiteren Parametern. Außerdem erhält man eine Graphikdatei mit dem entsprechenden Signalweg. Zu den Parametern gehört der *Impact* Faktor, der *p-value* des Signalwegs und der *corrected gamma p-value*. Der *Impact* Faktor repräsentiert die Eindeutigkeit der enthaltenen Gene und deren Lage im Signalweg und der *p-value* die Signifikanz des Signalwerts. Der *corrected gamma p-value* wird aus dem *Impact* Faktor, dem FC und dem *p-value* errechnet. Er spiegelt die biologische Relevanz des Signalwegs wider. Als Grenzwert für die biologische Relevanz des Signalwegs wurde ein *corrected gamma p-value* von kleiner als 0,3 festgelegt.

PANTHER-Gene List Analysis

PANTHER ist ein im Internet frei verfügbares Programm (www.pantherdb.org/). Es analysiert hochgeladene Listen von Gensymbolen hinsichtlich genontologischer Kriterien. Die Ergebnisse sind als Kreisdiagramm oder Balkendiagramm darstellbar und beinhalten die prozentuale Aufteilung der beteiligten genontologischen Gruppen der hochgeladenen Genliste. Des Weiteren erhält man Listen mit Informationen über die ontologischen Gruppen, in welche die hochgeladenen Gene eingeteilt werden.

4.8 IMMUNGLOBULINQUANTIFIZIERUNG MITTELS ELISA

Material

Maxisorp Immunoplate 96-Lochplatten, Flachloch⁸

Beschichtungspuffer pH 9,6

3,11 g Natriumcarbonat (Na_2CO_3)¹⁰

6 g Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3)¹⁰

ad 1000 ml Aqua bidest., Einstellung auf pH 9,6, Lagerung bei 4°C

Caseinlösung 1%

1 g Casein²⁷

ad 100 ml PBS (siehe 4.3.3) pH 7,4, kurz vor Gebrauch ansetzen

PBS-T (0,05% Tween20)

0,5 ml Tween20^{®10}

ad 1000 ml PBS, pH 7,2, Lagerung bei Raumtemperatur

TBS-T

5,844 g NaCl ¹⁰

12,114 g TRIS¹⁰

ad 1000 ml Aqua dest.

pH 7,4, Lagerung bei 4°C

TMB-Puffer

8,2 g Na-Acetat (CH_3COONa)¹⁰

3,15 g Zitronensäure-Monohydrat ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{xH}_2\text{O}$)¹⁰

ad 1000 ml Aqua dest., Lagerung bei 4°C

TMB Stammlösung

6 mg 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB)¹⁰

ad 1 ml DMSO¹⁰

Lagerung bei Raumtemperatur, lichtgeschützt

TMB Gebrauchslösung

10 ml TMB-Puffer, auf 37°C erwärmt

332 µl TMB Stammlösung

3 µl 30% H_2O_2 ¹⁰

Lösung kurz vor Gebrauch ansetzen und sofort verwenden

esTMB²⁸

Substratpuffer für esTMB

7,09 g Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)¹⁰ (100 mM)

ad 500 ml Aqua dest.

10,507 g Zitronensäure ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$)¹⁰ (100 mM)

ad 500 ml Aqua dest.

Vor Gebrauch 60% 100 mM Na₂HPO₄ mit 40% 100 mM C₆H₈O₇ mischen

Schwefelsäure (H₂SO₄) 1M¹⁰

Hühner Serum²⁹

Fetales Kälberserum (FBS)³⁰

***E. coli* Nissle 1917 Lysat³²**

***Enterococcus faecium* DSM 7134 Lysat³²**

Durchführung

Wenn nicht anders aufgeführt, wurden NUNC-Maxisorp[®] Polystyren 96-Lochplatten über Nacht bei 4°C mit dem gewünschten Antikörper beziehungsweise Antigen, gelöst in Beschichtungspuffer, beschichtet. Die Platten wurden zwischen allen Schritten mit Hilfe eines ELISA-Washers³³ je dreimal mit PBS-T gewaschen und in jedem Schritt für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Volumenangaben beziehen sich jeweils auf eine Kavität der 96-Lochplatte. Die Blockierung der ELISA-Platten erfolgte stets mit 200 µl 1%iger Caseinlösung, um unspezifische Bindungen zu verhindern.

4.8.1 Gesamt Immunglobuline

Zur Bestimmung der Immunglobulinspiegel im Plasma (IgA, IgY, IgM), der Gallenflüssigkeit (IgA) und dem Inhalt des Caecums (IgA) der Hühner wurden ELISA-Platten mit je 100 µl der primären Antikörper (M1, A1, G1) in Beschichtungspuffer in der gewünschten Konzentration (Tabelle 9) beschichtet und inkubiert. Als Negativkontrolle wurde auf jeder Platte bei vier Dellen keine Beschichtung und bei vier weiteren Dellen keine Probe aufgetragen.

Tabelle 9: Verwendete primäre Antikörper

Antigen	Klon	Isotyp	Konzentration	Hersteller	Referenz
chIgM	M1	IgG1	1,5 µg/ml	15	[209]
chIgA	A1	IgG1	2 µg/ml	15	[209]
chIgY	G1	IgG1	5 µg/ml	15	[209]

Nach der Blockierung wurden von den Proben in den gewünschten Konzentrationen je 100 µl aufgetragen (Tabelle 10). Dies erfolgte jeweils im Doppelansatz. Mit Ausnahme der 1:20 Verdünnung, wurden bei allen Verdünnungen je 10% FBS zugegeben. Bei der 1:20 Verdünnung wurde 5% FBS hinzugefügt. Die Proben des Caecuminhalts wurden zuvor wie folgt präpariert: Der bei -20°C gelagerte Caecuminhalt wurde aufgetaut und in ein vorgewogenes Eppendorfgefäß überführt. In der Folge wurden 2 ml steriles PBS pro Gramm

Caecuminhalt hinzugegeben und bei 4°C über Nacht im Über-Kopf-Schüttler inkubiert. Im nächsten Schritt wurde das Präparat für 10 Minuten bei 225xg zentrifugiert. Der gewonnene Überstand wurde aliquotiert und bei -20°C gelagert. Die Bezeichnung Caecuminhalt bezieht sich im Folgenden stets auf in dieser Weise präparierte Proben.

Tabelle 10: Verdünnung der Proben

Nachweis von	chIgM	chIgA			chIgY
Probe	Plasma	Plasma	Galle	Caecum Inhalt	Plasma
Verdünnung der Proben	1:50	1:20	1:1000	1:200	1:10.000
	1:500	1:100	1:5000	1:1000	1:50.000
	1:25.000	1:500	1:25.000	1:5000	1:250.000
Verdünnungslösung	1% Casein in TBS-T	1% Casein in PBS-T			1% Casein in PBS-T

Im Folgenden wurde 50 µl des entsprechenden Detektionsantikörpers in gewünschter Verdünnung hinzugegeben (Tabelle 11) und inkubiert.

Tabelle 11: Verwendete Detektionsantikörper zum Nachweis von Gesamt-Immunglobulinen

Nachweis von	chIgM	chIgA	chIgY
Antikörper	M3-POD	A3-POD	4D12-POD
Verdünnung	1:1000	1:500	1:2000
Verdünnungslösung	1% Casein in TBS-T	1% Casein in PBS-T	1% Casein in PBS-T

Zur Entwicklung des ELISAs wurden 100 µl enhanced soluble TMB (esTMB), welches zuvor 1:3 mit Substratpuffer verdünnt wurde, zugegeben und für 10 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert, wobei eine Bindung der Immunglobuline durch eine Blaufärbung der Probe angezeigt wurde. Ohne Waschen wurde die Reaktion dann durch Zugabe von 50 µl 1M Schwefelsäure gestoppt, wodurch ein Farbumschlag von blau nach gelb erzielt wurde. Zur Quantifizierung wurde der ELISA im Plattenphotometer³⁴ bei 450 nm gemessen. Zur Normalisierung wurde mittels des mitgeführten Standardserums eines gesunden adulten Huhns eine Standardkurve erstellt und die optische Dichte in Standard Einheiten (SU) pro ml umgerechnet. Dabei wurden für das Standardserum folgende Ausgangskonzentrationen angenommen: IgA und IgM: 1000 SU/ml, IgY: 100.000 SU/ml.

4.8.2 *E.coli* Nissle (EcN) spezifische Immunglobuline

Zum Nachweis von EcN spezifischen Immunglobulinen in Plasma (IgA und IgY), Gallenflüssigkeit und Caecuminhalt (IgA) der Hühner wurden ELISA-Platten mit 100 µl eines *E. coli* Nissle 1917 Lysat in Beschichtungspuffer in einer Konzentration von 5×10^7

KBE/ml beschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Herstellung des Lysats erfolgte mittels Ultraschallbehandlung gemäß der Methode von Leitner *et al.* [211]. Nach Abwaschen des nicht gebundenen Beschichtungsantigens erfolgte die Blockierung der freien Bindungsstellen der Platte mit 200 µl Caseinlösung (1% in PBS pH 7,4), um unspezifische Bindungen zu verhindern. Anschließend wurde die Platte mit 100 µl der zu testenden Proben inkubiert, wobei Plasma und Gallenflüssigkeit je 1:200 und Caecuminhalt (vorbereitet wie in 4.8.1 beschrieben) 1:10 verdünnt wurden. Zum Verdünnen der Proben, sowie der Detektionsantikörper wurde 1%ige Caseinlösung in PBS pH 7,4, welcher Tween20® in einer 1:2000 Verdünnung hinzugegeben wurde, verwendet. Proben, die miteinander verglichen werden sollten, wurden stets auf derselben Platte in Triplikaten aufgetragen, von denen im Zuge der Auswertung der Mittelwert gebildet wurde. Im nächsten Schritt folgte die Inkubation mit 50 µl des POD-konjugierten Detektionsantikörpers (Tabelle 12). Zur Entwicklung des ELISAs wurden 100 µl TMB Gebrauchslösung zugegeben und für 10 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 µl 1M Schwefelsäure gestoppt. Zur Quantifizierung wurde der ELISA im Plattenphotometer bei 450 nm gemessen. Die Auswertung erfolgte durch Vergleich der optischen Dichte (OD) der Proben.

Tabelle 12: Verwendete Detektionsantikörper zum Nachweis von Stamm spezifischen Immunglobulinen

Nachweis von	IgA	IgY
Antikörper	A3-POD	4D12-POD
Verdünnung	1:8.000	1:32.000
Verdünnungslösung	1% Casein in PBS pH 7,4 + Tween (1:2000)	1% Casein in PBS pH 7,4 + Tween (1:2000)

4.8.3 *Enterococcus faecium* spezifische Immunglobuline

Zum Nachweis von *Enterococcus faecium* spezifischen Immunglobulinen in Plasma (IgA und IgY), Gallenflüssigkeit und Caecuminhalt (IgA) der Hühner wurden ELISA-Platten mit 100 µl eines *Enterococcus faecium* DSM 7134 Lysat in Beschichtungspuffer in einer Konzentration von 5×10^7 KBE/ml beschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Herstellung des Lysats erfolgte mittels Ultraschallbehandlung analog der Methode von Leitner *et al.* [211]. Da nach der Inaktivierung durch Ultraschall lebende Bakterien nachgewiesen werden konnten, folgte die Zugabe von 120 IU des Enzyms Mutanolysin⁷ pro 10 ml Lysat, eine Inkubationsphase über 2 Stunden bei 37°C und in der Folge zwei weitere Zyklen Ultraschallbehandlung von 15 Minuten bei 100 Watt. Die Durchführung der ELISAs erfolgte analog zu der Methode in 4.8.2.

4.9 STATISTISCHE AUSWERTUNG

Die statistische Auswertung der Ergebnisse aus der qRT-PCR erfolgte mit Microsoft® Excel 2010 für Windows. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des Student's T-Test ermittelt. Die statistische Auswertung der Microarray Experimente erfolgte mit den Programmen Bioconductor „R“ Version 2.12.1 und „limma“ (Linear Models for Microarray Data) Version 3.6.9. Die Ergebnisse der Immunglobulinquantifizierung wurden mittels GraphPad Prism® von GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA statistisch ausgewertet. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des Kruskal-Wallis Test mit anschließender Adjustierung nach Dunn berechnet.

Grafiken wurden mit GraphPad Prism® von GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA oder mittels Microsoft® Power Point 2010 angefertigt.

5. ERGEBNISSE

5.1 IMMUNHISTOLOGIE

Um zunächst einen Überblick über das intestinale Immunsystem der untersuchten Hühner zu erhalten, wurden der allgemeine Entwicklungsstand und die Zellverteilung im GALT der verschiedenen Darmabschnitte der Tiere mittels immunhistologischer Färbungen von Kryoschnitten deskriptiv untersucht. Hierzu wurden spezifische monoklonale Antikörper zur Markierung der im Darm vorkommenden Zellen des Immunsystems verwendet (siehe 4.3.3, Tabelle 7). Von den fünf untersuchten Tieren pro Gruppe wurde jeweils das Ergebnis ausgewählt, welches das durchschnittliche Erscheinungsbild der gesamten Gruppe am besten repräsentierte. Eine Übersicht aller Ergebnisse der Immunhistologie ist im Anhang (Abbildung 45 bis 82) zu finden. Auf eine semi-quantitative Auswertung dieser Daten wurde verzichtet, da die Quantifizierung nachfolgend durch Genexpressionsanalysen erfolgen sollte. Angaben zu mikroskopischen Vergrößerungen beziehen sich auf die Vergrößerung des jeweiligen Objektivs. Für die Gesamtvergrößerung muss der angegebene Wert nochmals mit der Vergrößerung des verwendeten Okulars (x10) multipliziert werden.

5.1.1 Caecum: Vergleich „Keimfrei“-„Konventionell“

Als erstes sollte die Kinetik der Immunzelleninfiltration der konventionell gehaltenen Hühner („Konventionell“) mit den keimfrei gehaltenen Hühnern („Keimfrei“) verglichen werden. Hierfür wurden Caecumschnitte von verschiedenen Zeitpunkten nach dem Schlupf (Tag 7, 14, 21, 28 und 55) immunhistologisch analysiert.

Zu den frühen Zeitpunkten 7 und 14 Tage nach dem Schlupf waren vor allem Zellen des angeborenen Immunsystems im Darm zu finden. Makrophagen konnten bereits an Tag 7 zahlreich in der Lamina propria nachgewiesen werden und blieben im Verlauf der ersten Lebenswochen in ihrer Zahl weitgehend konstant. Im Vergleich zwischen „Keimfrei“ und „Konventionell“ wies die Verteilung der Makrophagen keine Unterschiede auf (Abbildung 6). Gleiches galt für TCR1⁺ Zellen, welche jedoch in ihrer Zahl im Verlauf der ersten Lebenswochen anstiegen (Abbildung 45 im Anhang).

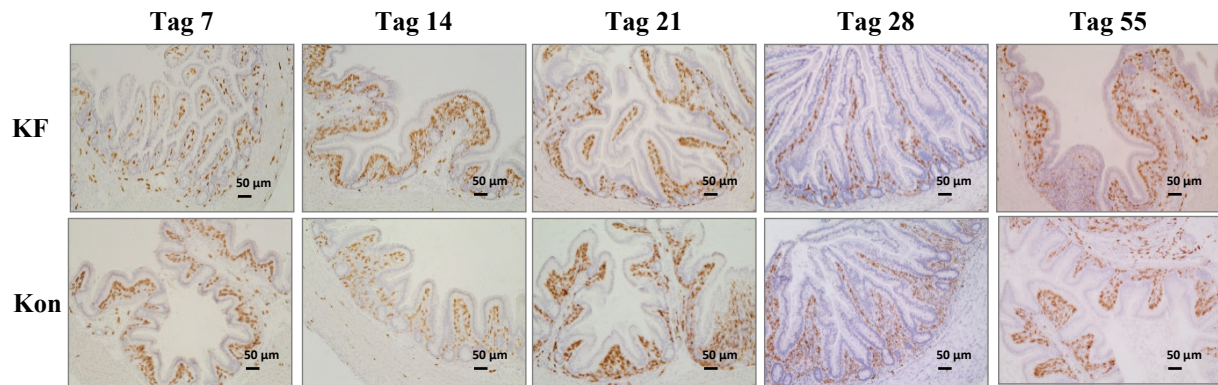


Abbildung 6: Makrophagen im Caecum

Immunhistologische Färbung des Caecums von keimfrei gehaltenen (KF) und konventionell gehaltenen (Kon) Hühnern an Tag 7, 14, 21, 28 und 55 nach dem Schlupf mit dem mAK Kul01. Vergrößerung 10x.

Die Zellen des adaptiven Immunsystems waren erst ab Tag 21 nach dem Schlupf vermehrt im Caecum vorhanden. Insbesondere bei der Anzahl und Verteilung der B-Lymphozyten war hier ein deutlicher Unterschied zwischen den keimfreien und den konventionellen Hühnern zu sehen. Im Caecum der konventionellen Tiere waren deutlich mehr B-Lymphozyten zu finden. Im Gegensatz zu den keimfrei gehaltenen Hühnern konnten hier außerdem isolierte lymphatische Follikel (ILFs) nachgewiesen werden, in denen sich B-Lymphozyten ansammeln. An Tag 55 nach den Schlupf waren auch Germinale Zentren (GCs) im Caecum der konventionell gehaltenen Tiere sichtbar. In der Keimfrei-Gruppe konnten zu keinem Zeitpunkt GCs identifiziert werden (Abbildung 7).

Auch ein Nachweis von IgA^+ Zellen war im Caecum der keimfreien Tiere zu keinem Zeitpunkt möglich. Bei der konventionellen Gruppe waren ab Tag 14 vereinzelt IgA^+ Zellen im Caecum angesiedelt. Ab Tag 28 waren hier zahlreiche IgA^+ Zellen und sekretorisches IgA nachweisbar, welches sich als brauner Film, der Schleimhaut aufliegend, darstellte (Abbildung 8).

Bei der Darstellung von IgM^+ Zellen waren die Unterschiede zwischen „Keimfrei“ und „Konventionell“ geringer, wobei analog zum IgA ihre Anzahl bei der konventionellen Gruppe im Vergleich mit der keimfreien Gruppe erhöht erschien (Abbildung 49 im Anhang).

Die Verteilung der T-Lymphozyten im Caecum zeigte weniger deutliche Unterschiede zwischen den Gruppen als die B-Lymphozyten, wobei hier vor allem $\text{CD4}^+\text{TCR2}^+$ Zellen bei den konventionellen Tieren ab Tag 21 nach dem Schlupf etwas zahlreicher vorkamen als bei den keimfreien Hühnern (Abbildung 47 und 48 im Anhang).

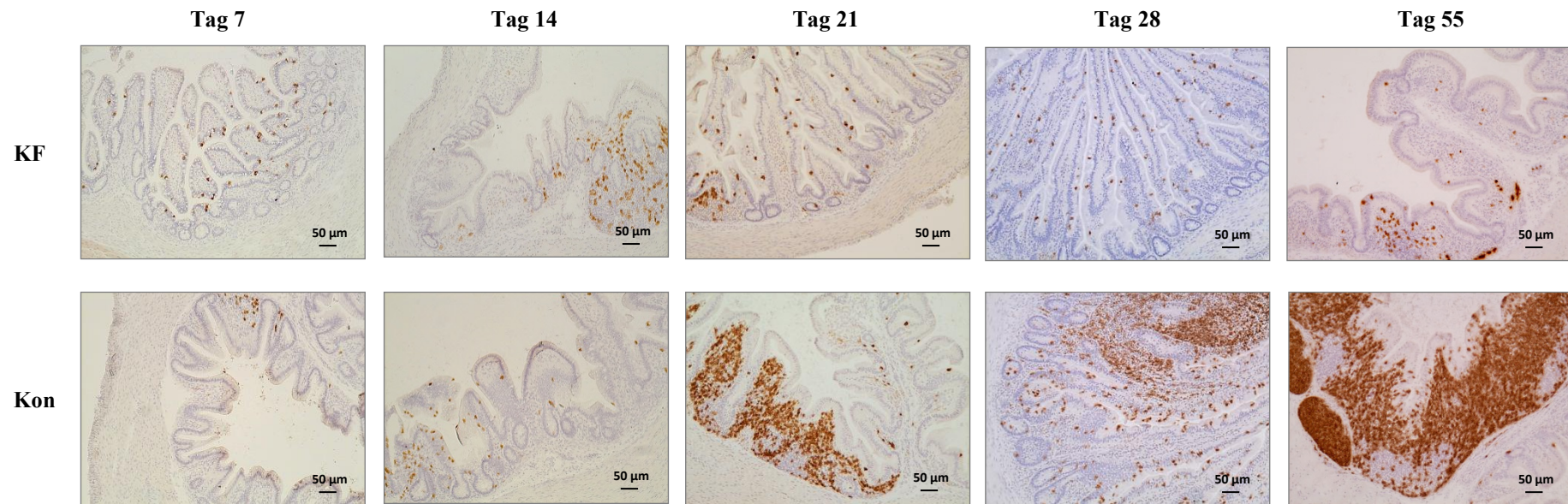


Abbildung 7: B-Lymphozyten im Caecum

Immunhistologische Färbung des Caecums von keimfrei gehaltenen (KF) und konventionell gehaltenen (Kon) Hühnern an Tag 7, 14, 21, 28 und 55 nach dem Schlupf mit dem Pan-B-Lymphozytenmarker AV20. Vergrößerung 10x.

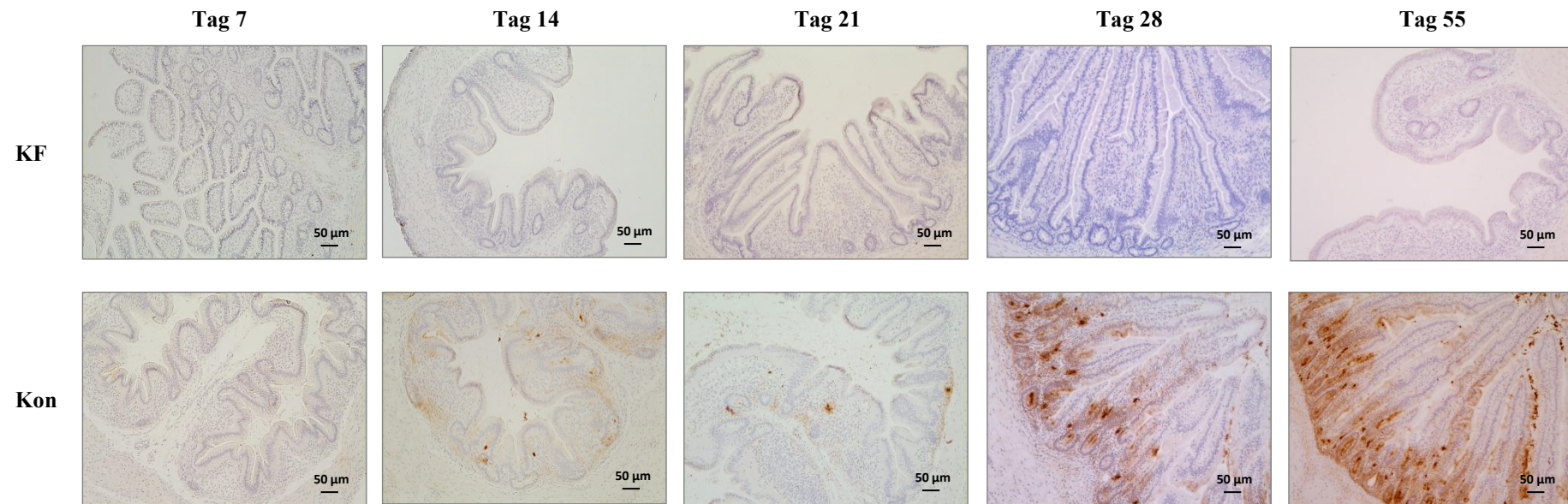


Abbildung 8: IgA im Caecum

Immunhistologische Färbung des Caecums von keimfrei gehaltenen (KF) und konventionell gehaltenen (Kon) Hühnern an Tag 7, 14, 21, 28 und 55 nach dem Schlupf mit dem für IgA spezifischen mAK A1. Vergrößerung 10x.

5.1.2 Vergleich der Tiergruppen an Tag 28 nach dem Schlupf

Um den Einfluss der verwendeten Bakterienstämme auf die Entwicklung des Darmimmunsystems zu untersuchen, wurden an Tag 28 nach dem Schlupf Kryoschnitte des Jejunums, der Caecaltonsille, des Caecums und des Colons der 4 Gruppen (keimfrei gehalten, konventionell gehalten, mono-rekonstituiert mit *E. coli* Nissle, tetra-rekonstituiert mit vier Bakterien; siehe 4.1.3) immunhistologisch gefärbt und ausgewertet.

Da im Jejunum am 28. Lebenstag mit Ausnahme der IgA⁺ Zellen keine Unterschiede zwischen keimfreien, mono-rekonstituierten und konventionellen Hühnern festgestellt werden konnte, wurde von einer weiteren immunhistologischen Untersuchung des Jejunums abgesehen (Abbildung 50 bis 54 im Anhang). Wie in Abbildung 9 ersichtlich, konnte in der Keimfrei-Gruppe kein IgA im Jejunum nachgewiesen werden. Im Jejunum der konventionell gehaltenen und der mono-rekonstituierten Hühner ließen sich etwa gleich viele IgA⁺ Zellen anfärben (Abbildung 54 im Anhang).

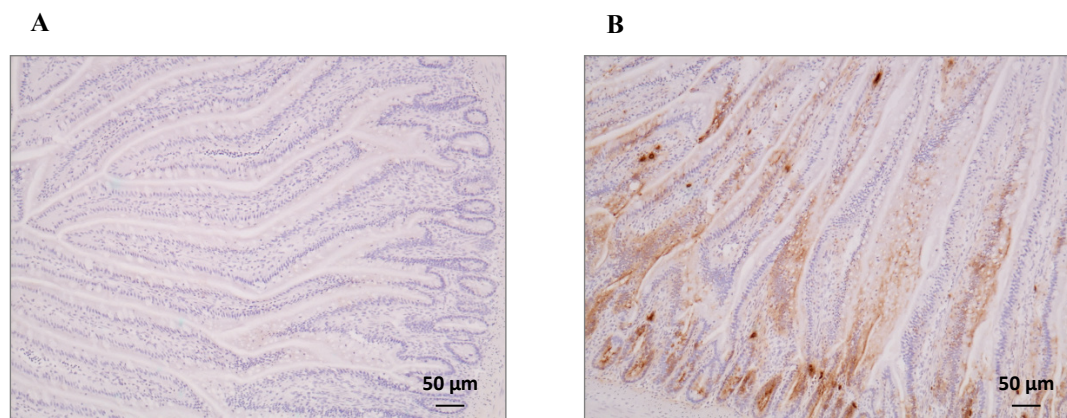


Abbildung 9: IgA im Jejunum am 28. Lebenstag

Immunhistologische Färbung des Jejunums von keimfrei gehaltenen (A) und konventionell gehaltenen (B) Hühnern an Tag 28 nach dem Schlupf mit dem für IgA spezifischen mAK A1. Vergrößerung 10x.

Der Entwicklungsstand der Caecaltonsillen (CTs) wies die deutlichsten Unterschiede im Vergleich der vier Gruppen auf. Wie in Abbildung 10 ersichtlich, zeigte das lymphatische Gewebe der Caecaltonsillen von keimfrei gehaltenen Hühnern einen deutlich geringeren Umfang, als die Caecaltonsillen der anderen Gruppen. Des Weiteren konnte bei keinem der keimfreien Tiere GCs in den CTs nachgewiesen werden. Die CTs von mono-rekonstituierten Hühnern wiesen einen intermediären Phänotyp auf. Ihr Gewebe war umfangreicher als das der Keimfrei-Gruppe und es waren GCs zu finden, welche jedoch kleiner waren und in geringerer Anzahl vorkamen, als bei der konventionellen Gruppe. Der Entwicklungsstand der CTs der

tetra-rekonstituierten Tiere war denen der konventionell gehaltenen Tiere am ähnlichsten.

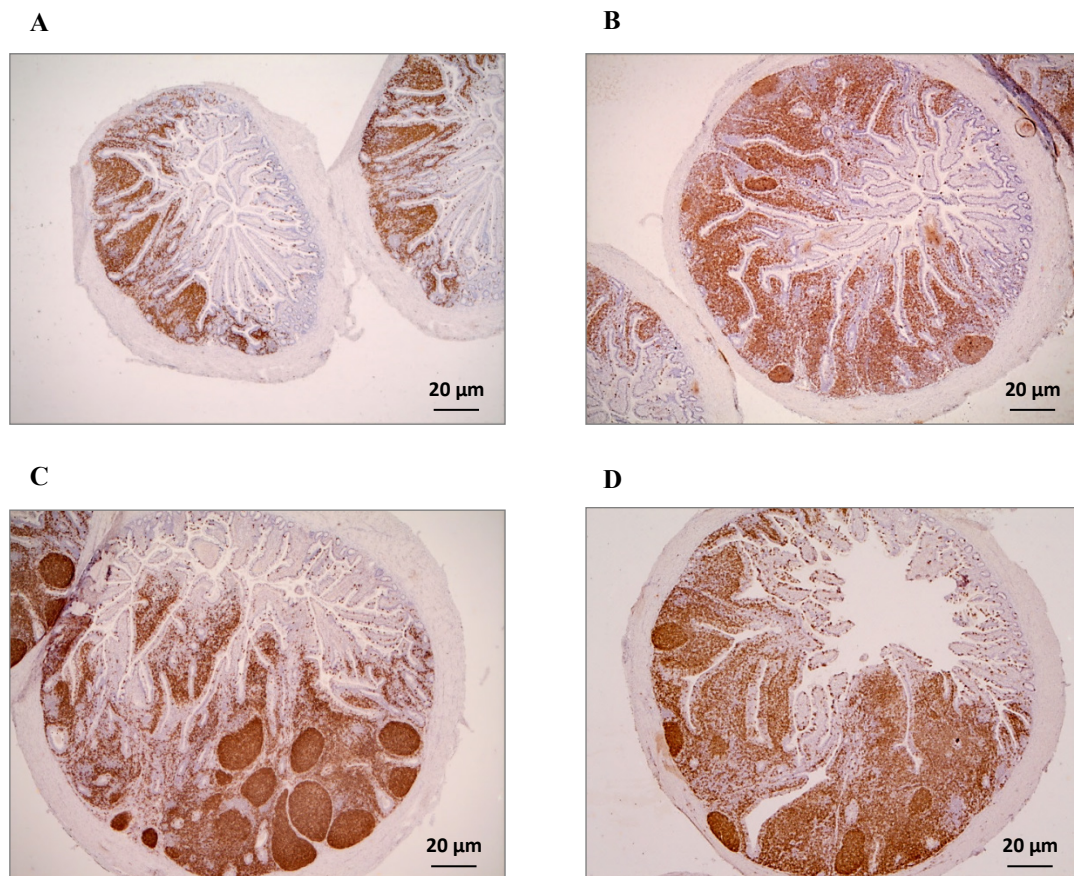


Abbildung 10: B-Lymphozyten in der CT am 28. Lebenstag

Immunhistologische Färbung der Caecaltonsille von keimfrei gehaltenen (A), mono-rekonstituierten (B), konventionell gehaltenen (C) und tetra-rekonstituierten (D) Hühnern an Tag 28 nach dem Schlupf mit dem Pan-B-Lymphozytenmarker AV20. Vergrößerung 2,5x.

Analog zu dem Ergebnis des Jejunums, war am 28. Lebenstag kein IgA in der CT der keimfrei gehaltenen Hühner immunhistologisch nachweisbar. In den CTs der konventionellen Gruppe waren zahlreiche IgA⁺ Zellen und sIgA zu sehen. Die mono- und die tetra-rekonstituierten Hühner wiesen IgA in den CTs auf, jedoch weniger zahlreich als die konventionell gehaltenen Tiere (Abbildung 11).

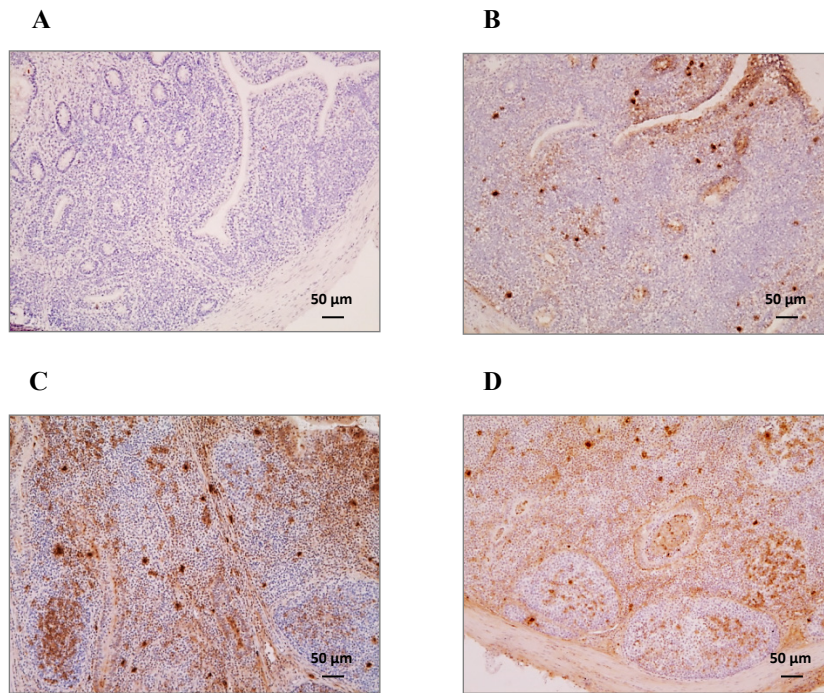


Abbildung 11: IgA in der Caecaltonsille am 28. Lebenstag

Immunhistologische Färbung der Caecaltonsille von keimfrei gehaltenen (A), mono-rekonstituierten (B), konventionell gehaltenen (C) und tetra-rekonstituierten (D) Hühnern an Tag 28 nach dem Schlupf mit dem für IgA spezifischen mAK A1. Vergrößerung 10x.

Die immunhistochemische Färbung von IgY fiel bei den keimfrei gehaltenen Tieren ebenfalls negativ aus. In den GCs der Caecaltonsillen der anderen Gruppen konnte IgY angefärbt werden (Abbildung 57 A, C, E und G im Anhang). Die Markierung von IgM zeigte weniger deutliche Unterschiede zwischen den Gruppen (Abbildung 57 B, D, F und H im Anhang). Gleiches galt für die Verteilung der T-Lymphozyten in der CT (Abbildung 12).

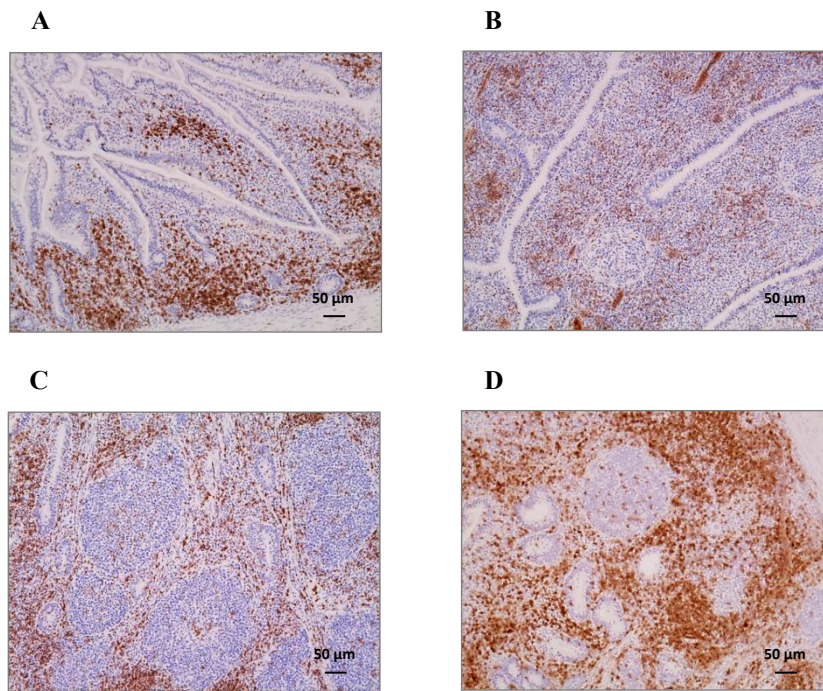


Abbildung 12: $\alpha V\beta 1$ T-Lymphozyten in der Caecaltonsille am 28. Lebenstag

Immunhistologische Färbung der Caecaltonsille von keimfrei gehaltenen (A), mono-rekonstituierten (B), konventionell gehaltenen (C) und tetra-rekonstituierten (D) Hühnern an Tag 28 nach dem Schlupf mit dem spezifischen mAK TCR2. Vergrößerung 10x.

Die Zellen des angeborenen Immunsystems (Makrophagen, $\gamma\delta$ T-Lymphozyten) zeigten in keinem der untersuchten Darmabschnitte einen Unterschied zwischen den Gruppen (Abbildung 50, 52, 55, 56, 58, 61, 62 und 66 im Anhang).

Bei der immunhistologischen Untersuchung des Caecums an Tag 28 wurden im Zuge der Analyse zur Kinetik der Immunzelleninfiltration der Gruppen „Keimfrei“ und „Konventionell“ bereits erste Hinweise auf Unterschiede zwischen diesen beiden Gruppen gewonnen (siehe 5.1.1). Analog zu diesen Daten wies die Verteilung der Zellen des angeborenen Immunsystem (Makrophagen, $TCR1^+$ Zellen) keine Unterschiede im Caecum zwischen den vier Gruppen auf (Abbildung 58 und 61 im Anhang), deutliche Unterschiede fanden sich bei den B-Lymphozyten und den Immunglobulinen, insbesondere das IgA betreffend. Sowohl bei der Mono-Gruppe, als auch bei der Tetra-Gruppe war IgA im Caecum immunhistologisch nachweisbar, jedoch in etwas geringerer Ausprägung als in der konventionellen Gruppe (Abbildung 13). In keiner der vier Gruppen konnte mittels Immunhistologie IgY im Caecum nachgewiesen werden. IgM^+ Zellen waren im Caecum der keimfreien Gruppe weniger zahlreich anzufärben. Die Mono-Gruppe, die Tetra-Gruppe und die konventionelle Gruppe zeigten keine Unterschiede bezüglich des Vorkommens von IgM im Caecum (Abbildung 60 B, D, F und H im Anhang).

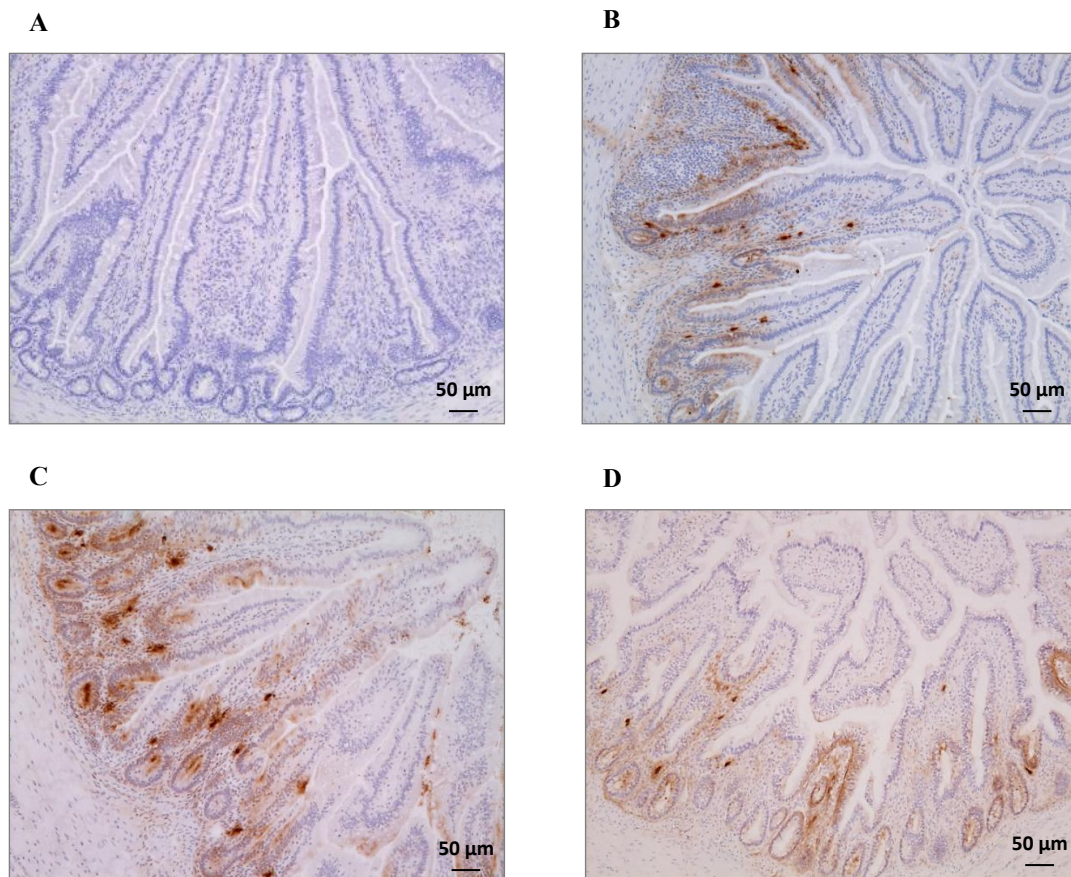


Abbildung 13: IgA im Caecum am 28. Lebenstag

Immunhistologische Färbung des Caecums von keimfrei gehaltenen (A), mono-rekonstituierten (B), konventionell gehaltenen (C) und tetra-rekonstituierten (D) Hühnern an Tag 28 nach dem Schlupf mit dem für IgA spezifischen mAK A1. Vergrößerung 10x.

Aus Abbildung 14 wird ersichtlich, dass bei der immunhistochemischen Markierung der B-Lymphozyten im Caecum der mono-rekonstituierten Tiere eine mit der Keimfrei-Gruppe vergleichbare Anzahl an B-Lymphozyten nachgewiesen werden konnte. Die Anzahl der B-Lymphozyten im Caecum der tetra-rekonstituierten Hühner war vergleichbar mit derjenigen der konventionellen Gruppe. Des Weiteren waren im Caecum der tetra-rekonstituierten Tiere regelmäßig ILFs ausgebildet, wohingegen bei mono-rekonstituierten Hühnern ILFs nur bei einzelnen Tieren nachgewiesen werden konnten.

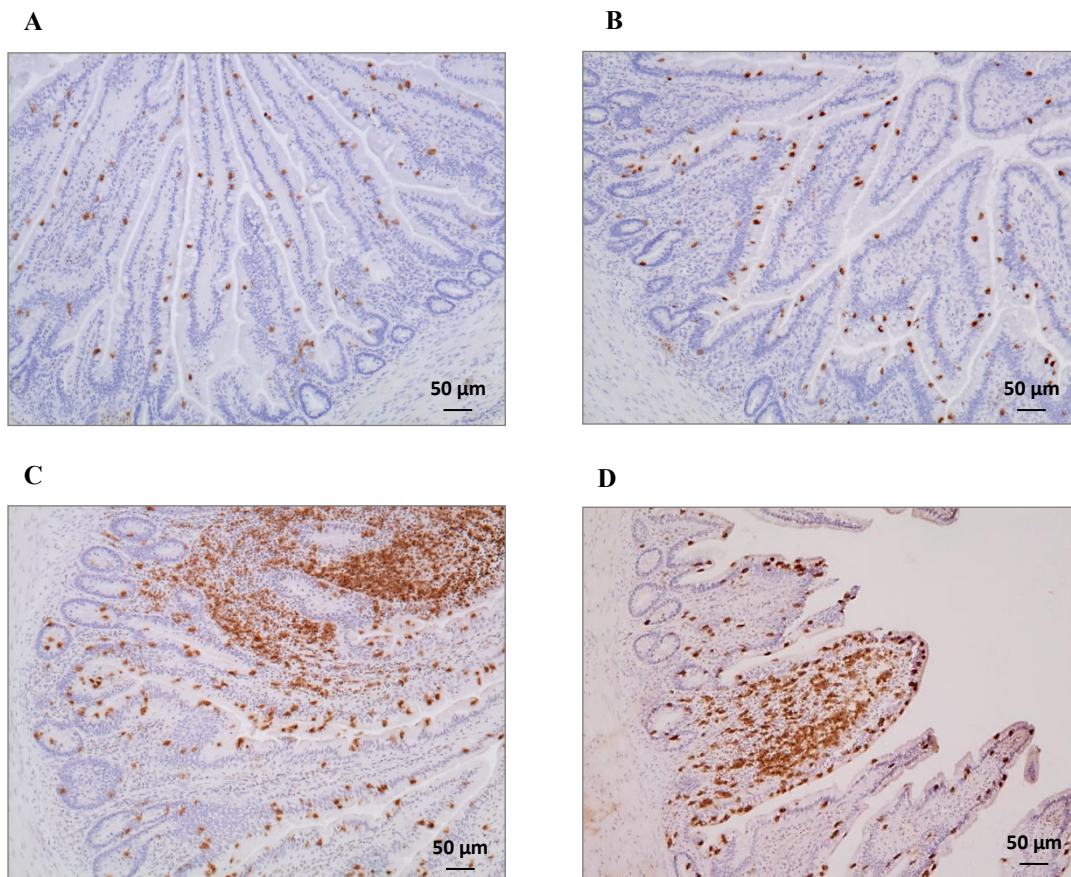


Abbildung 14: B-Lymphozyten im Caecum am 28. Lebenstag

Immunhistologische Färbung des Caecums von keimfrei gehaltenen (A), mono-rekonstituierten (B), konventionell gehaltenen (C) und tetra-rekonstituierten (D) Hühnern an Tag 28 nach dem Schlupf mit dem Pan-B-Lymphozytenmarker AV20. Vergrößerung 10x.

Wie schon in der Untersuchung zur Kinetik der Immunzelleninfiltration gezeigt, wies die Verteilung der T-Lymphozyten im Caecum weniger deutliche Unterschiede zwischen den Gruppen auf als die der B-Lymphozyten, wobei hier vor allem $CD4^{+}TCR2^{+}$ Zellen bei den konventionellen und den tetra-rekonstituierten Tieren etwas zahlreicher vorkamen als bei den keimfreien und den mono-rekonstituierten Hühnern (Abbildung 59 im Anhang).

Die Immunhistologische Analyse des Colons ergab ein weitestgehend übereinstimmendes Ergebnis mit dem Jejunum. Hier erfolgte auch die Untersuchung der Tetra-Gruppe, welche keine Unterschiede im Vergleich mit der konventionellen Gruppe aufwies (Abbildung 62 bis 66 im Anhang).

5.1.3 Vergleich der Tiergruppen an Tag 55 nach dem Schlupf

Um zu untersuchen, ob die Unterschiede zwischen den Gruppen im Entwicklungsstand des Darmimmunsystems sich zu einem späteren Zeitpunkt verstärken oder verringern, wurden das Caecum und die Caecaltonsillen der keimfrei gehaltenen, der tetra-rekonstituierten und der konventionell gehaltenen Hühner am 55. Lebenstag immunhistologisch untersucht, da die Unterschiede an Tag 28 nach dem Schlupf in diesen Darmabschnitten am deutlichsten auftraten. Da der erste Versuch, in welchem die Mono-Rekonstitution stattgefunden hat, nur bis zum 28. Lebenstag durchgeführt worden ist, lagen für die Mono-Gruppe keine Proben von Tag 55 nach dem Schlupf vor.

Die Untersuchung am 55. Lebenstag lieferte analoge Ergebnisse zu der Untersuchung an Tag 28 nach dem Schlupf (siehe 5.1.2), allerdings mit folgenden Ergänzungen.

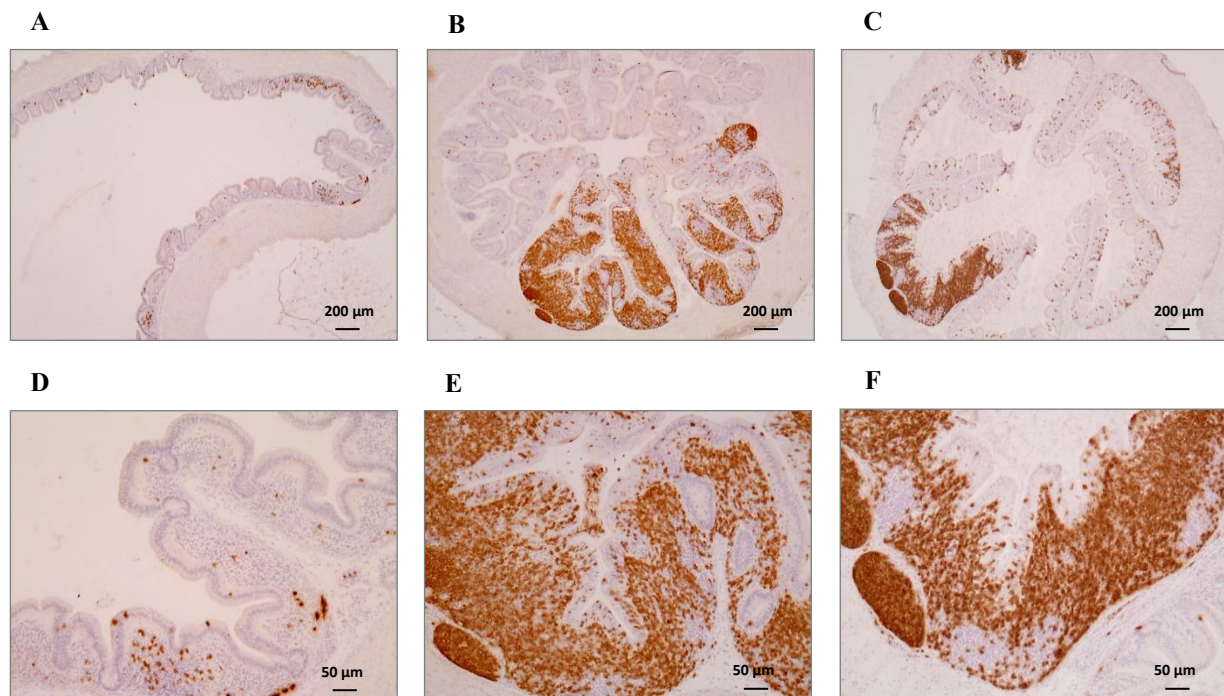


Abbildung 15: B-Lymphozyten im Caecum am 55. Lebenstag

Immunhistologische Färbung des Caecums von keimfrei gehaltenen (A, D), tetra-rekonstituierten (B, E) und konventionell gehaltenen (C, F) Hühnern an Tag 55 nach dem Schlupf mit dem Pan-B-Lymphozytenmarker AV20. Die obere Reihe (A-C) zeigt eine Übersicht (Vergrößerung 2,5x) mit jeweiliger Detailansicht in der unteren Reihe (D-F, Vergrößerung 10x).

Im Caecum der konventionell gehaltenen und der tetra-rekonstituierten Tiere fanden sich am 55. Lebenstag GCs, welche bei keinem der Tiere aus der Keimfrei-Gruppe nachgewiesen werden konnten. Auch der am 28. Lebenstag festgestellte Unterschied in der Verteilung der

B-Lymphozyten zwischen den Gruppen erschien an Tag 55 noch stärker ausgeprägt (Abbildung 15).

Des Weiteren konnten bei der immunhistochemischen Untersuchung der CT bei keimfrei gehaltenen Hühnern einzelne IgA⁺ Zellen nachgewiesen werden. In den CTs von tetra-rekonstituierten und konventionell gehaltenen Hühnern waren diese in großer Zahl, sowie auch sIgA vorhanden (Abbildung 16).

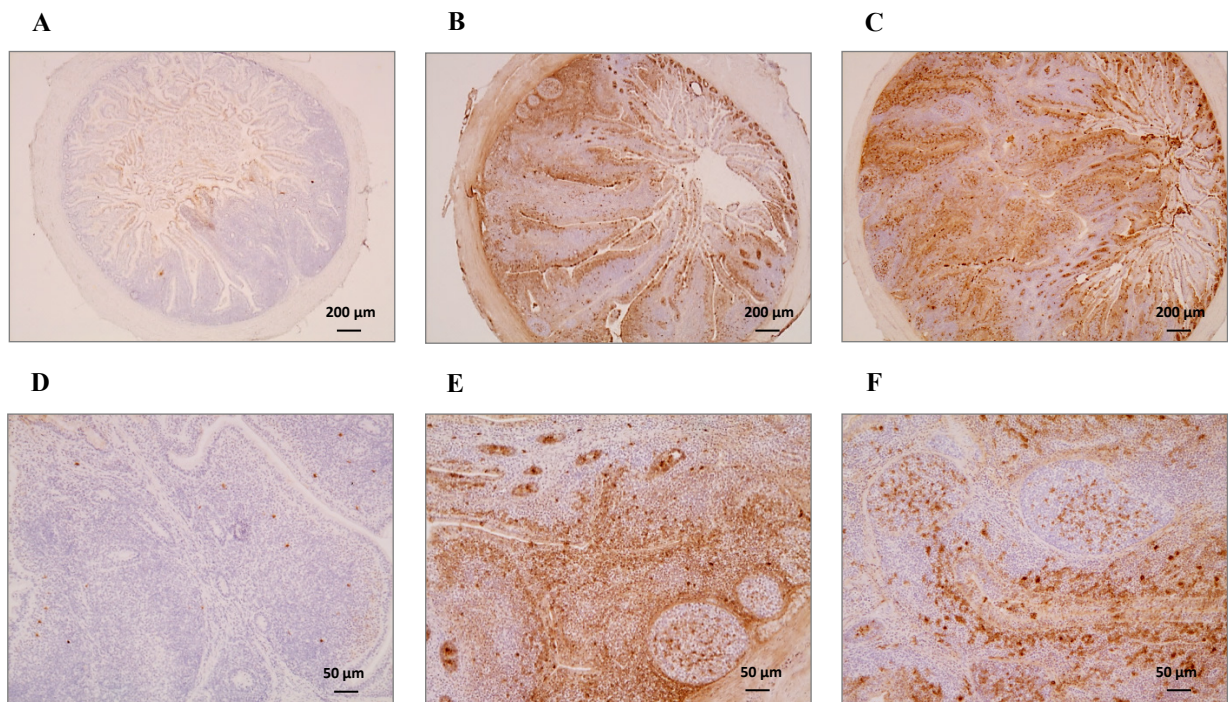


Abbildung 16: IgA in der Caecaltonsille am 55. Lebenstag

Immunhistologische Färbung der Caecaltonsille von keimfrei gehaltenen (A, D), tetra-rekonstituierten (B, E) und konventionell gehaltenen (C, F) Hühnern an Tag 55 nach dem Schlupf mit dem für IgA spezifischen mAK A1. Die obere Reihe (A-C) zeigt eine Übersicht (Vergrößerung 2,5x) mit jeweiliger Detailansicht in der unteren Reihe (D-F, Vergrößerung 10x).

5.2 MICROARRAYS

Zur vergleichenden Quantifizierung des immunologischen Status der untersuchten Hühner auf regulatorischer Ebene wurden holistische Genexpressionsanalysen in Form von Microarray Experimenten (*customized chicken Agilent 6x80k Microarray*) durchgeführt. Hierzu wurden an Tag 28 nach dem Schlupf Organproben von Jejunum, Caecum und der CT der keimfrei gehaltenen („Keimfrei“), der mono-rekonstituierten („Mono“), der tetra-rekonstituierten („Tetra“) und der konventionell gehaltenen („Konventionell“) Hühner zur RNA-Isolation gewonnen. Anschließend wurden die Proben mittels der in Kapitel 4.7 beschriebenen Technik analysiert. Das Caecum und die CT wurden ausgewählt, da sich hier in der immunhistologischen Untersuchung die deutlichsten Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen nachweisen ließen. Die Untersuchung des Jejunums als Bestandteil des Dünndarms erfolgte der Vollständigkeit halber. Mit Ausnahme der Tetra-Gruppe (drei Tiere) wurden bei der Untersuchung der CT vier Tiere pro Gruppe untersucht. Das Caecum wurde, mit Ausnahme der konventionellen Gruppe (vier Tiere), bei drei Tieren pro Gruppe untersucht. Bei der vergleichenden Microarray Analyse des Jejunums (vier keimfrei gehaltene und drei konventionell gehaltene Tiere) konnten keine signifikant regulierten Gene identifiziert werden.

In einem Microarray Experiment werden mehrere Tausend Gene gleichzeitig analysiert. Daraus resultiert eine sehr umfangreiche Menge an Expressionsdaten, welche bestmöglich kategorisiert und ausgewertet werden müssen. Hierzu hat sich folgende Herangehensweise bewährt (Abbildung 17): die im Microarray Experiment gewonnenen Rohdaten wurden zunächst auf grundsätzliche Verwendbarkeit überprüft und in Form einer sog. Heatmap inklusive eines Dendrogramms graphisch dargestellt. In der Folge wurden alle signifikant regulierten Gene durch statistische Berechnung identifiziert und in einer Tabelle zusammengefasst (siehe beiliegende CD, Mappe 1, Tabelle 22 und 23). Überschneidungen von signifikant regulierten Genen zwischen den verglichenen Gruppen wurden in sog. Venn Diagrammen dargestellt (siehe 5.2.3). Es folgten Datenbankanalysen um zu beurteilen, ob sich beispielsweise bestimmte Signalkaskaden in den untersuchten Proben unterschieden (Pathway Express, 5.2.4) oder die identifizierten Gene in funktionelle Untergruppen einzuteilen, um herauszufinden, ob sich die Gene der einzelnen Datensätze hinsichtlich ihrer Funktionalität unterschieden (Panther Gene List Analysis, 5.2.4). Bevor aus allen Analysen resultierende Schlussfolgerungen gezogen werden, können weitere gezielte Analysen auffälliger Gengruppen erfolgen.

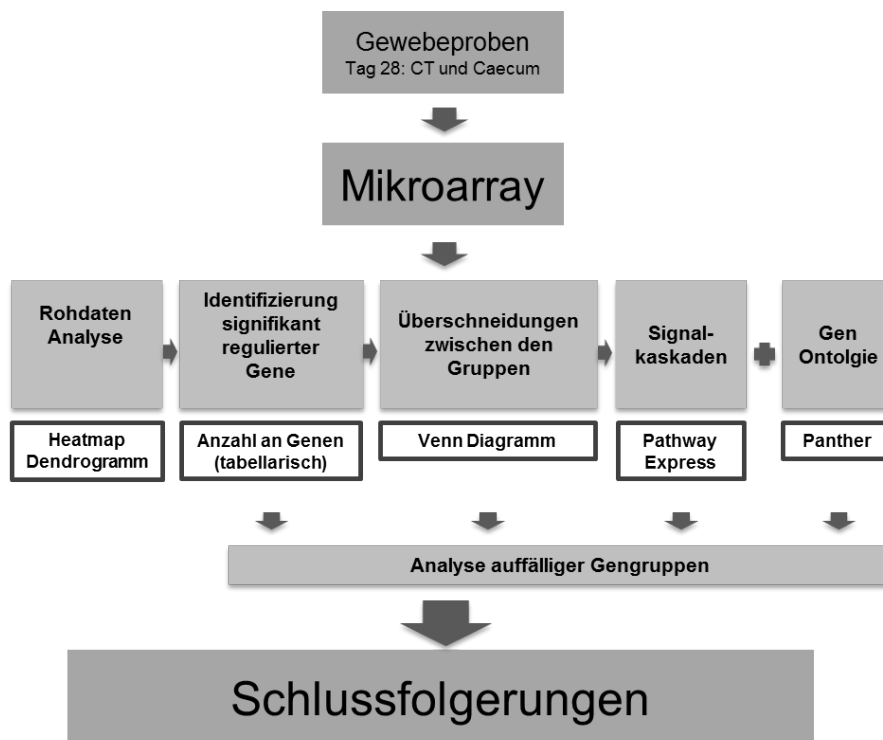


Abbildung 17: Ablauf der Microarray Experimente

Unter den Analysen sind jeweils die dafür verwendeten „Tools“ dargestellt. Modifiziert nach Röll [212].

5.2.1 Heatmap der im Microarray analysierten Proben

Nach Normalisierung mit dem Programm „R“ (Version 2.12.1. *The R Foundation for Statistical Computing*) wurden die Signalintensitäten der analysierten Proben mit dem *Bioconductor* Paket *Genplotter* in einer Heatmap graphisch dargestellt. Mit Hilfe dieser Heatmap lässt sich die Konformität der Proben innerhalb einer Gruppe zueinander und im Vergleich zu den anderen Gruppen beurteilen. Das Programm ignoriert die Gruppenzugehörigkeit und teilt die Proben allein anhand der Ähnlichkeit der Fluoreszenzsignale der einzelnen Spots, und damit anhand der Ähnlichkeit der Genexpression, ein. Diese Ähnlichkeit wird über ein Dendrogramm und ein Farbschema mit Farbabstufungen von Rot nach Blau graphisch abgebildet. Identische Signalintensitäten bzw. Genexpressionsmuster sind rot, sich in ihrer Genexpression stark unterscheidende Proben sind blau dargestellt. Abstufungen zwischen diesen beiden Gegensätzen, werden in weniger kräftigen Rot- und Blautönen beschrieben. Das Dendrogramm veranschaulicht die Einteilung durch das Programm in Gruppen hinsichtlich ihrer Verwandtschaft im Genexpressionsmuster. Je näher die Knotenpunkte zueinander liegen, desto ähnlicher sind die Gruppen.

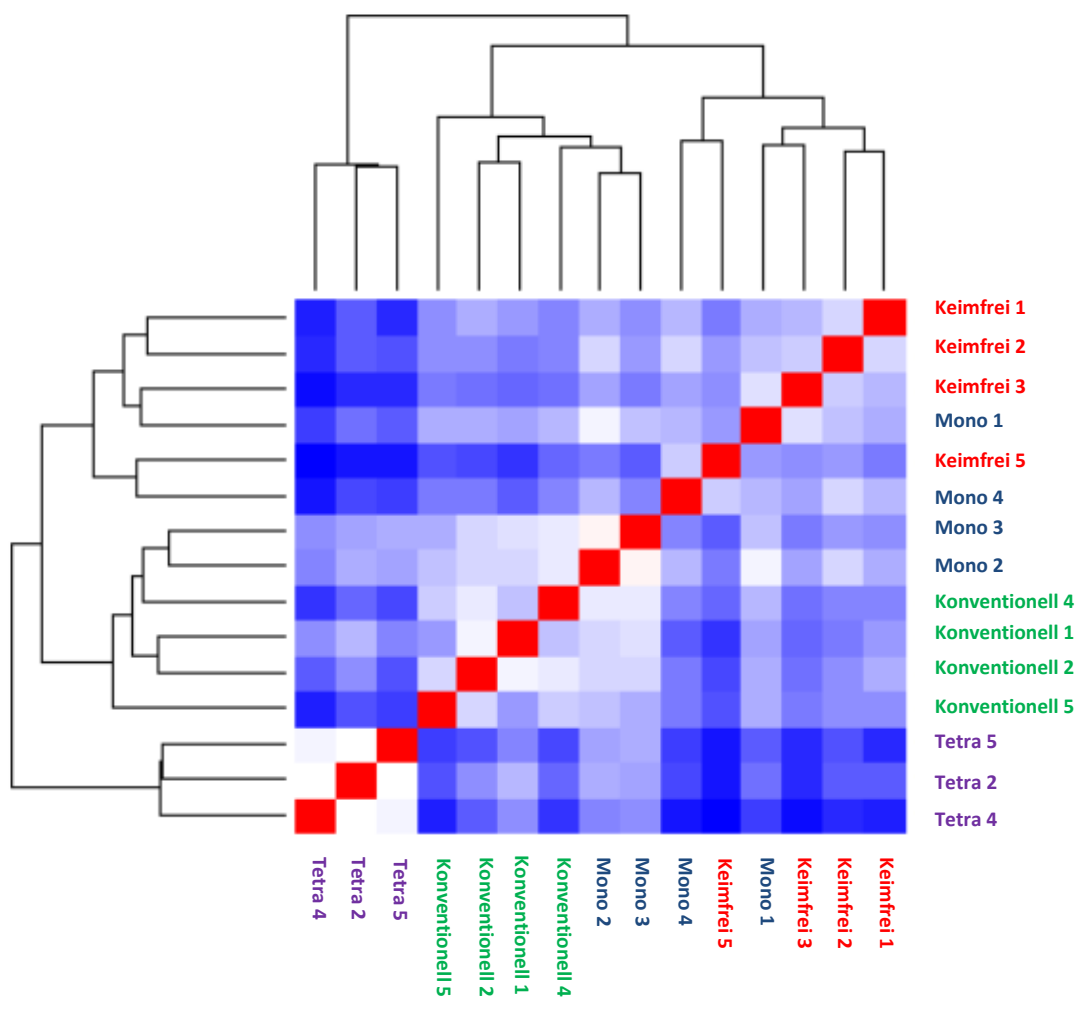


Abbildung 18: Heatmap der untersuchten Proben der Caecaltonsille

Einteilung der Genexpressionsprofile über eine Ähnlichkeit der Fluoreszenz-Signalintensitäten mit Hilfe des Programms „R“ für die Proben der Caecaltonsille. Die einzelnen Datensätze sind nach ihrer Gruppenzugehörigkeit gefolgt von der Tiernummer benannt. Je ähnlicher Datensätze zueinander sind, desto röter ist das Schnittfeld, je unähnlicher das Genexpressionsmuster zweier Proben ist, desto blauer stellt sich das Farbfeld dar. Dunkelrote Felder entsprechen identischen Proben, die mit sich selbst verglichen werden. Das Dendrogramm veranschaulicht die Einteilung des Programms in Gruppen hinsichtlich ihrer Verwandtschaft im Genexpressionsmuster. Je näher die Knotenpunkte zueinander liegen desto ähnlicher sind die Gruppen.

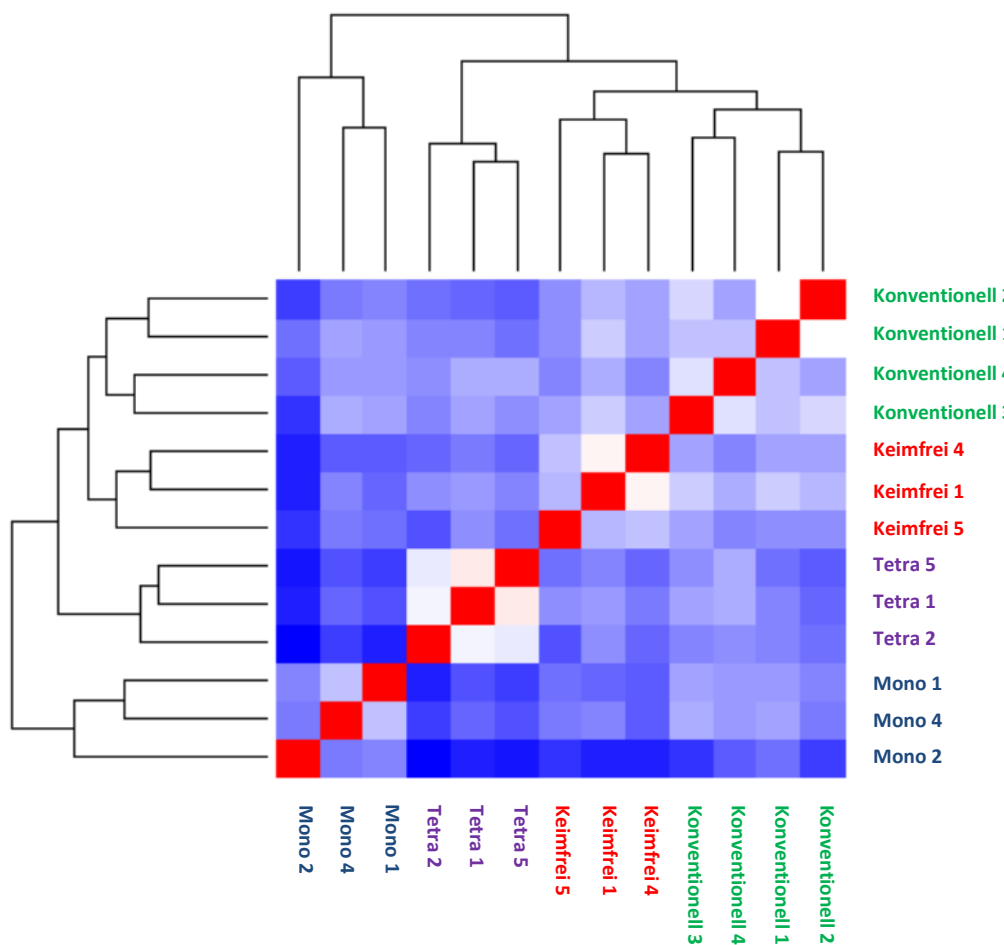


Abbildung 19: Heatmap der untersuchten Proben des Caecums

Einteilung der Genexpressionsprofile über eine Ähnlichkeit der Fluoreszenz-Signalintensitäten mit Hilfe des Programms „R“ für die Proben des Caecums. Die einzelnen Datensätze sind nach ihrer Gruppenzugehörigkeit gefolgt von der Tiernummer benannt. Je ähnlicher Datensätze zueinander sind, desto röter ist das Schnittfeld, je unähnlicher das Genexpressionsmuster zweier Proben ist, desto blauer stellt sich das Farbfeld dar. Dunkelrote Felder entsprechen identischen Proben, die mit sich selbst verglichen werden. Das Dendrogramm veranschaulicht die Einteilung des Programms in Gruppen hinsichtlich ihrer Verwandtschaft im Genexpressionsmuster. Je näher die Knotenpunkte zueinander liegen desto ähnlicher sind die Gruppen.

Aus den Abbildungen 18 und 19 wird ersichtlich, dass fast alle Proben korrekt geclustert haben. Dies deutete darauf hin, dass die vier Tiergruppen Unterschiede in ihren Genexpressionsprofilen aufwiesen.

Im Caecum (Abbildung 19) war eine klare Eingruppierung der Proben innerhalb der Gruppe erkennbar, die Proben der konventionellen Gruppe hatten also sehr ähnliche Genexpressionsmuster untereinander, die sich deutlich von denen der Keimfrei-Gruppe unterschieden. Ein noch deutlicher Unterschied bestand im Vergleich mit der Genexpression in den Caeca der tetra-rekonstituierten Tiere und den Genexpressionsprofilen der mono-rekonstituierten Gruppe.

Bei der Analyse der CT (Abbildung 18) war in der Tetra-Gruppe die Clusterbildung am homogensten. Die Mono-Gruppe wies hinsichtlich ihrer Genexpressionsmuster Überschneidungen sowohl mit der Keimfrei-Gruppe als auch mit der konventionellen Gruppe auf. Diese Ergebnisse erlaubten weitere Analysen, wobei die Ähnlichkeit der Genexpressionsmuster der verschiedenen Gruppen in der CT berücksichtigt werden mussten.

5.2.2 Identifizierung signifikant regulierter Gene der vier Gruppen

Die normalisierten Datensätze wurden nach folgenden Kriterien mittels des Programms „limma“ (*Linear Models for Microarray Data*) Version 3.6.9. statistisch ausgewertet. Die Signifikanz wurde anhand der FDR (*false discovery rate*), wodurch die Wahrscheinlichkeit von falsch positiven Spots reduziert werden soll, und dem FC (*fold change*), welcher die x-fache Expression eines Gens zwischen zwei Tiergruppen darstellt, berechnet. Ein Gen wurde dementsprechend als signifikant reguliert betrachtet, wenn es eine FDR von kleiner gleich 5% und einen Expressionsunterschied (FC) von mindestens ± 2 aufwies.

Da viele Gene mehrfach auf dem Microarray repräsentiert waren und einige noch nicht eindeutig einem bestimmten Gen zugeordnet werden konnten, wurde zuerst aus der Anzahl der signifikant regulierten Spots die Anzahl an signifikant regulierten Genen ermittelt. In Tabelle 13 ist die Anzahl der signifikant regulierten Gene in der Caecaltonsille und im Caecum zwischen den aufgeführten Gruppen aufgelistet.

Tabelle 13: Signifikant regulierte Gene in der Caecaltonsille und im Caecum

Gelistet ist die Anzahl der signifikant regulierten Gene der unterschiedlichen Gruppenvergleiche. Dabei sind die Gesamtzahl der signifikant regulierten Gene und die jeweilige Anzahl an in der erstgenannten Gruppe stärker exprimierten (schwarz) und schwächer exprimierten (rot) Genen gezeigt. (FDR<5%; FC mindestens +/-2)

		Gene		
			+	-
Caecaltonsille	Keimfrei verglichen mit Mono-Rekonstitution	83	+	20
			-	63
	Keimfrei verglichen mit Tetra-Rekonstitution	591	+	345
			-	246
	Keimfrei verglichen mit Konventionell	263	+	71
			-	192
Caecum	Keimfrei verglichen mit Mono-Rekonstitution	432	+	253
			-	179
	Keimfrei verglichen mit Tetra-Rekonstitution	208	+	148
			-	60
	Keimfrei verglichen mit Konventionell	151	+	67
			-	84

Eine Liste aller signifikant regulierten Gene ist auf der beiliegenden CD in Mappe 1, Tabelle 22 und 23 zu finden.

Die Analyse hat gezeigt, dass in allen Gruppen im Vergleich zu der Keimfrei-Gruppe zahlreiche differentiell exprimierte Gene zu finden sind. Es handelt sich hierbei um einen relativen Vergleich, was bedeutet, dass Gene die in den keimfrei gehaltenen Tieren schwächer exprimiert waren, in den anderen Gruppen entsprechend relativ stärker exprimiert wurden.

Die Genexpression war zwischen den keimfrei gehaltenen und den mono-rekonstituierten Tieren in der CT sehr ähnlich. Hier fanden sich insgesamt nur 83 signifikant regulierte Gene, während sich zwischen der Keimfrei-Gruppe sowohl im Vergleich zu der Tetra-Gruppe als auch zu der konventionellen Gruppe zahlenmäßig deutliche Unterschiede fanden (Tabelle 13). Dabei fiel auf, dass in den CTs der mono-rekonstituierten und der konventionell gehaltenen Tiere im Vergleich zu den Keimfrei gehaltenen Tieren mehr als doppelt so viele Gene stärker exprimiert waren (63 zu 20 und 192 zu 71), während sich die Anzahl der signifikant stärker exprimierten Gene zwischen der Tetra- und der Keimfrei-Gruppe etwa die Waage hielt (246 zu 345). Bei diesem Vergleich waren zudem mehr Gene in den keimfrei gehaltenen Tieren stärker exprimiert als in den tetra-rekonstituierten Hühnern.

Im Caecum hingegen waren zwischen den Gruppen „Keimfrei“ und „Konventionell“ verhältnismäßig wenig Gene signifikant differentiell exprimiert (151), während deutliche Expressionsunterschiede zwischen „Keimfrei“ und „Mono“ (432) und zwischen Keimfrei und Tetra (208) zu finden waren. Innerhalb der beiden letztgenannten Vergleiche, waren deutlich mehr Gene in der Keimfrei-Gruppe stärker reguliert, als in der Vergleichsgruppe. Interessanterweise fanden sich im Vergleich mit den konventionell gehaltenen Hühnern vergleichsweise wenig stärker exprimierte Gene in der Keimfrei-Gruppe.

Insgesamt konnten mit dieser Analyse viele signifikant differentiell regulierte Gene zwischen den Gruppen identifiziert werden, welche zur weiteren Klassifizierung im Folgenden näher betrachtet werden sollen.

5.2.3 Genüberschneidungen zwischen den vier Gruppen

Um die Vielzahl an signifikant regulierten Genen zu klassifizieren, wurden die differentiell exprimierten Gene hinsichtlich Überschneidungen zwischen den Gruppen untersucht. Abbildung 20 zeigt in Venn Diagrammen einen Abgleich der Überschneidungen in der CT.

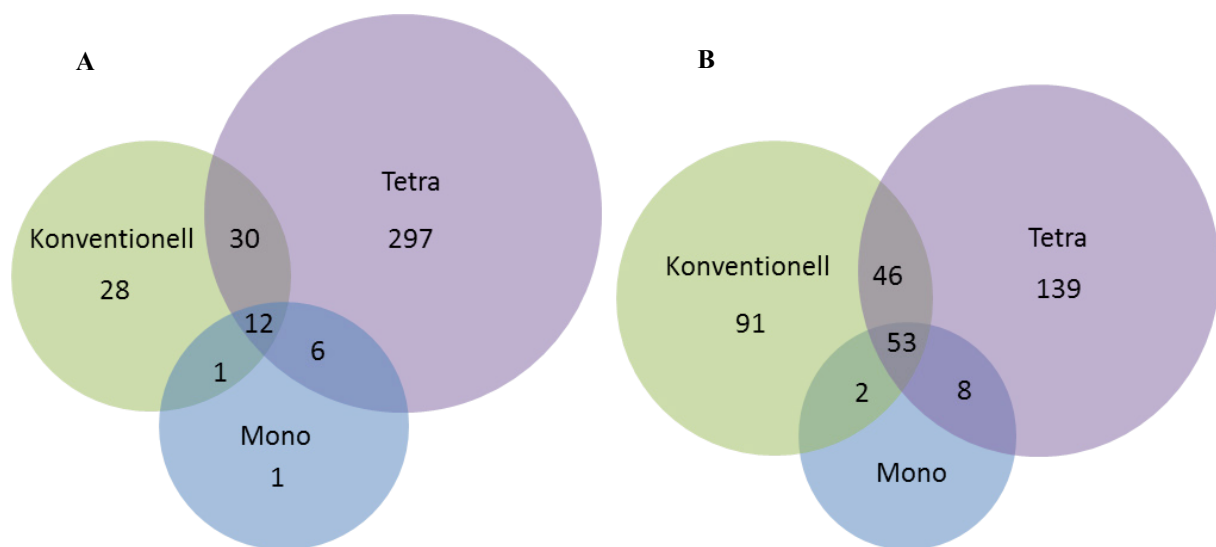


Abbildung 20: Genüberschneidungen der signifikant differentiell regulierten Gene in der CT

Verteilung der signifikant stärker (A) und schwächer (B) regulierten Gene in der Caecaltonsille von keimfrei gehaltenen Hühnern im Vergleich mit konventionell gehaltenen (grün), mono-rekonstituierten (blau) und tetra-rekonstituierten (violett) Hühnern an Tag 28 nach dem Schlupf. Die Zahlen geben die Anzahl von Genen innerhalb der Schnittmengen an.

In der CT fanden sich 12 Gene, die bei keimfrei gehaltenen Hühnern stärker exprimiert wurden als in allen anderen Gruppen. Die von diesen Genen am stärksten regulierten Gene

waren zum einen HIPK2 (*homeodomain interacting protein kinase 2*), welches eine 26fach schwächere Expression in der Tetra-Gruppe, eine 7fach schwächere Expression in der konventionellen Gruppe und eine drei mal schwächere Expression in der Mono-Gruppe aufwies und RERE (*arginine-glutamic acid dipeptide (RE) repeats*) welches in den keimfrei gehaltenen Tieren dreizehn mal stärker exprimiert war als in den tetra-rekonstituierten Hühnern, vier mal stärker als in der konventionellen Gruppe und doppelt so stark wie in den mono-rekonstituierten Tieren reguliert wurde. HIPK2 codiert für das Enzym “Homeodomänen Interagierende Protein Kinase 2“ [213], welches mit verschiedenen Homeodomänen Transkriptionsfaktoren interagiert, was unter anderem eine Inhibition der Zellproliferation zur Folge hat [214]. RERE codiert für das *Arginine-glutamic acid dipeptide repeats* Protein, welches mit einem Transkriptionsfaktor im Zellkern co-lokalisiert und dessen Überexpression Apoptose triggert [215].

Des Weiteren waren unter diesen 12 Genen zwei Gene zu finden, die für Transportvorgänge verantwortlich sind. SLC2A5 (*solute carrier family 2 (facilitated glucose/fructose transporter), member 5*), welches für den Glukose/Fruktose Transporter GLUT5 codiert [216] und beim Menschen hauptsächlich im Dünndarm vorkommt und TMC2 (*transmembrane channel-like 2*), welches für Transmembranproteine codiert und in Zusammenhang mit der Inhibition von T-Lymphozyten, durch Hemmung der enzymatischen Funktion des Co-stimulierenden Moleküls CD26 gebracht werden konnte [217].

30 Gene wurden in den CTs der keimfrei gehaltenen Tiere im Vergleich zu denen der tetra-rekonstituierten und der konventionell gehaltenen Tiere höher exprimiert. Zu ihnen gehörte FLBLIM1 (*filamin binding LIM protein 1*), das 3fach stärker als in der konventionellen Gruppe und 14fach stärker als in der Tetra-Gruppe exprimiert wurde und für ein Protein codiert, welches an Zellverbindungen lokalisiert und an Vorgängen, wie Adhäsion und Motilität der Zelle beteiligt ist, aber auch für die Zellmorphologie eine Rolle spielt [218]. Zudem waren auch in dieser Gen-Gruppe wieder einige Transportmoleküle bei den keimfrei gehaltenen Hühnern hoch reguliert. So beispielsweise SLC5A1 (*solute carrier family 5 (sodium/glucose cotransporter), member 1*), welcher im Vergleich zu den tetra-rekonstituierten und zu den konventionell gehaltenen Tieren 2fach stärker exprimiert wurde und SLC5A11 (*solute carrier family 5 (sodium/glucose cotransporter), member 11*), der 2fach stärker in der Keimfrei-Gruppe als in der konventionellen Gruppe und 3fach stärker als in der Tetra-Gruppe exprimiert wurde. Des Weiteren SLC22A13 (*solute carrier family 22 (organic anion transporter), member 13*), der in den keimfrei gehaltenen Tieren 3fach stärker als in den beiden anderen Gruppen exprimiert wurde. Der Begriff SLC-Transporter umfasst

48 Familien von Transportproteinen. Die Einteilung erfolgt über die biologische Funktion, wodurch die Familienzugehörigkeit verdeutlicht, welche Moleküle jeweils transportiert werden. In Tabelle 14 sind alle differentiell exprimierten Gene der SLC-Transporter Familie zusammengefasst.

Im Vergleich mit der Tetra- und der Mono-Gruppe waren in den CTs von keimfrei gehaltenen Hühnern sechs Gene in beiden Gruppen 2-3fach stärker exprimiert. In den konventionell gehaltenen Tieren wiesen diese Gene keinen signifikanten Expressionsunterschied auf. Zu ihnen zählten CRH (*corticotropin releasing hormon*), MME (*membrane metallo-endopeptidase*) und REEP6 (*receptor accessory protein 6*). MME codiert für eine membrangebundene Metalloprotease (CD10, Neprilysin), welche auf hämatopoetischen Vorläuferzellen zu finden ist, aber auch in einer Vielzahl anderer Gewebe vorkommt, wie im Glomerulum der Niere, im Endometrium und in den Epithelzellen des Magens und des Colons [219]. Desweiteren konnte festgestellt werden, dass MME bei Patienten mit Morbus Crohn überexprimiert wurde [220].

ACOX1 (*acyl-Coenzyme A oxidase 1, palmitoyl*) war mit einer 2fach stärkeren Expression das einzige Gen, welches sowohl im Vergleich zu der konventionellen Gruppe als auch zu der Mono-Gruppe bei den keimfrei gehaltenen Hühnern stärker exprimiert war. ACOX1 codiert für das erste Enzym der β -Oxidations-Kaskade von Fettsäuren [221].

Zahlreiche Gene konnten identifiziert werden, die in den CTs der keimfrei gehaltenen Tiere ausschließlich im Vergleich mit den konventionell gehaltenen Tieren oder ausschließlich verglichen mit der Tetra-Gruppe stärker exprimiert waren.

Zu den ausschließlich im Vergleich mit den konventionell gehaltenen Hühnern signifikant regulierten Genen zählten: IGFBP1 (*insulin-like growth factor binding protein 1*), MT3 (*metallothionein 3*), MMP10 (*matrix metalloproteinase 10 (stromelysin 2)*) und außerdem viele Gene, die für Enzyme codieren wie beispielsweise Katalase (RCJMB04_1j22), Oxoglutarat Dehydrogenase (OGDHL), Aldehyd Oxidase und Glutamyl Aminopeptidase (ENPEP). Des Weiteren waren auch in dieser Gen-Gruppe abermals einige Gene für Transporter und Kanäle signifikant reguliert, so wie beispielsweise SLC16A9 (*solute carrier family 16, member 9 (monocarboxylic acid transporter 9)*), AQP4 (*aquaporin 4*), SLC6A2 (*solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, noradrenalin), member 2*) und SLC15A1 (*solute carrier family 15 (oligopeptide transporter), member 1*) (Tabelle 14). Allerdings waren alle Gene in der Keimfrei-Gruppe maximal 3fach stärker exprimiert.

Tabelle 14: Signifikant regulierte Gene der SLC-Transporter Familie

Signifikant regulierte Gene der SLC-Transporter Familie in der Caecaltonsille (CT) und dem Caecum von keimfrei gehaltenen Hühnern im Vergleich mit konventionell gehaltenen (Konv), mono-rekonstituierten (Mono) und tetra-rekonstituierten (Tetra) Hühnern an Tag 28 nach dem Schlupf. Dargestellt ist der Expressionsunterschied (fold change) bezogen auf den Wert der Expression bei den keimfrei gehaltenen Tieren (=1). Negative Zahlen stehen für Gene, die bei den keimfrei gehaltenen Tieren schwächer exprimiert wurden, positive Zahlen stehen für eine Hochregulation der Gene in der Keimfrei-Gruppe.

Gen	Gen Beschreibung	CT			Caecum		
		Konv	Tetra	Mono	Konv	Tetra	Mono
SLC11A2	solute carrier family 11 (proton-coupled divalent metal ion transporters), member 2	1,04	2,36	1,13	-	-	-
SLC12A4	solute carrier family 12 (potassium/chloride transporters), member 4	-16,22	-12,10	-19,31	-533	-145	-406
SLC13A2	solute carrier family 13 (sodium-dependent dicarboxylate transporter), member 2	-	-	-	-3	-1	5
SLC15A1	solute carrier family 15 (oligopeptide transporter), member 1	2,22	1,46	1,49	2	-1	30
SLC16A14	solute carrier family 16, member 14 (monocarboxylic acid transporter 14)	-	-	-	-2	-3	-5
SLC16A2	solute carrier family 16, member 2 (monocarboxylic acid transporter 8)	-	-	-	1	2	1
SLC16A6	solute carrier family 16, member 6 (monocarboxylic acid transporter 7)	-	-	-	-1	-1	-2
SLC16A9	solute carrier family 16, member 9 (monocarboxylic acid transporter 9)	2,13	1,58	1,62	1	-1	4
SLC17A5	solute carrier family 17 (anion/sugar transporter), member 5	-	-	-	1	-1	2
SLC1A1	solute carrier family 1 (neuronal/epithelial high affinity glutamate transporter, system Xag), member 1	-	-	-	3	1	5
SLC22A13	solute carrier family 22 (organic anion transporter), member 13	3,06	2,77	1,72	-	-	-
SLC22A18	solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 18	1,51	2,17	1,14	-	-	-
SLC22A4	solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 4	1,38	2,49	1,25			
SLC25A15	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; ornithine transporter) member 15	-	-	-	2	-1	2
SLC28A2	solute carrier family 28 (sodium-coupled nucleoside transporter), member 2	-	-	-	1	-1	5
SLC2A3	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 3	-1,45	-2,05	-1,56	-2	-1	-2
SLC2A5	solute carrier family 2 (facilitated glucose/fructose transporter), member 5	3,18	3,06	2,02	6	2	17

SLC34A2	solute carrier family 34 (sodium phosphate), member 2	-	-	-	3	1	59
SLC38A4	solute carrier family 38, member 4	-	-	-	-1	1	-3
SLC3A1	solute carrier family 3 (cystine, dibasic and neutral amino acid transporters, activator of cystine, dibasic and neutral amino acid transport), member 1	-	-	-	2	-1	11
SLC46A1	solute carrier family 46, member 1	-	-	-	1	-1	3
SLC5A1	solute carrier family 5 (sodium/glucose cotransporter), member 1	2,41	2,19	1,55	3	2	6
SLC5A11	solute carrier family 5 (sodium/glucose cotransporter), member 11	2,34	2,50	1,77	3	1	5
SLC5A9	solute carrier family 5 (sodium/glucose cotransporter), member 9	-	-	-	-2	1	9
SLC6A19	solute carrier family 6 (neutral amino acid transporter), member 19	-	-	-	2	-1	41
SLC6A2	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, noradrenalin), member 2	2,16	1,05	1,22	-	-	-
SLC6A6	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, taurine), member 6	-	-	-	1	2	-3
SLC7A13	solute carrier family 7, (cationic amino acid transporter, y+ system) member 13	-	-	-	-1	-3	-2
SLC7A9	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 9	-	-	-	1	-1	13
SLC8A1	solute carrier family 8 (sodium/calcium exchanger), member 1	-	-	-	1	1	-2
SLC9A3R1	solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger), member 3 regulator 1	-	-	-	-1	-1	2

Zu den Genen, die ausschließlich im Vergleich zu den tetra-rekonstituierten Hühnern in der Keimfrei-Gruppe stärker exprimiert waren, zählten viele stark exprimierte Gene wie ST5 (*suppression of tumorigenicity 5*), mit einer 8fachen Expression und TRIM2 (*tripartite motif-containing 2*), mit einer 7fachen Expression in der Keimfrei-Gruppe. TRIM2 wird eine neuroprotektive Rolle zugesprochen [222]. Außerdem konnte ein TGF-beta *signal pathway antagonist* (SMAD7B) identifiziert werden, welcher 5fach stärker exprimiert war. Auch in dieser Gen-Gruppe fanden sich erneut Transmembranproteine wie TMEM184B (*transmembrane protein 184B*), IRS-1 (*Insulin receptor substrate 1*) und IGFBP3 (*insulin-like growth factor binding protein 3*), ein Calcium Kanal CACNA1B (*calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1B subunit*) und ein *Gap junction* Protein GJB1 (*gap junction protein, beta 1, 32kDa*). Außerdem konnten abermalig zahlreiche SLC-Transporter identifiziert werden, wie beispielsweise SLC22A4 (*solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 4*), SLC11A2 (*solute carrier family 11 (proton-coupled divalent metal ion transporters), member 2*) und weitere, die Tabelle 14 zu entnehmen sind. Interessanterweise zählten zu den Genen, welche bei den keimfrei gehaltenen Tieren höher exprimiert waren als bei der Tetra-Gruppe auch die Gene für den IL-11 Rezeptor alpha (IL11RA) und den Chemokin Rezeptor CCR8, welche beide bei der Keimfrei-Gruppe 2fach hoch reguliert waren.

Bei der Auswertung der Gene, welche in den keimfrei gehaltenen Tieren schwächer reguliert waren, als in den anderen Gruppen (Abbildung 20 B) fiel auf, dass hier das Ausmaß des Expressionsunterschiedes (FC) deutlich größer war, als bei den signifikant höher exprimierten Genen der Keimfrei-Gruppe. Es wurden 53 Gene identifiziert, die in der Keimfrei-Gruppe schwächer exprimiert waren als in den anderen drei Gruppen. Dazu zählten IgY (*IgG H-chain 3'-region (HC86) C part*), das massiv mindereexprimiert war und mit einem FC von 72 bei den tetra-rekonstituierten Tieren, das in der CT der keimfrei gehaltenen Hühnern am schwächsten exprimierte Gen überhaupt war, IgJ (*immunoglobulin J polypeptide, linker protein for immunoglobulin alpha and mu polypeptides*), Igl (*similar to immunoglobulin lambda chain*), CD72 (*CD72 molecule*), TACI (*TNFRSF13B, tumor necrosis factor receptor superfamily, member 13B*), Mitglieder der CXCL13 Familie, ah221 (*chemokine ah221*), IL1B (*interleukin 1, beta*), der IL1R2 (*interleukin 1 receptor, type II*) und viele weitere immunrelevante Gene. Auch in dieser Gruppe zählte zu den am stärksten regulierten Genen ein Transporter, SLC12A4 (*solute carrier family 12 (potassium/chloride transporters), member 4*), der insbesondere bei den konventionell gehaltenen Tieren 16fach stärker exprimiert wurde als in den keimfrei gehaltenen Hühnern. Ein weiteres außerordentlich schwach exprimiertes Gen in

der Keimfrei-Gruppe war *mature avidin*, welches auch nach bakteriellen Infektionen hoch reguliert wird [223].

Insgesamt 46 signifikant regulierte Gene waren im Vergleich mit der konventionellen Gruppe und im Vergleich mit der Tetra-Gruppe bei den keimfrei gehaltenen Tieren schwächer exprimiert, zeigten jedoch keine Expressionsunterschiede im Vergleich mit den mono-rekonstituierten Hühnern. Immunrelevante Gene in dieser Gen-Gruppe waren beispielsweise Lyg2 (*lysozyme G-like 2*), IL8 (*interleukin 8 = CXCLi2*), B6.1 (Bu-1b), K203 (*chemokine (C-C motif) ligand 4*, CCL-16 Homolog), CCR5 (*chemokine (C-C motif) receptor 5*), IL16 und CXCR4. Allerdings sind diese Gene maximal 3fach schwächer in der Keimfrei-Gruppe exprimiert.

Nur zwei Gene wurden in den keimfrei gehaltenen Hühnern im Vergleich mit der konventionellen Gruppe und der Mono-Gruppe schwächer exprimiert. Dabei handelte es sich um ST6GALNAC1 (ST6 (*alpha-N-acetyl-neuraminy-2,3-beta-galactosyl-1,3*)-N-acetylgalactosaminide *alpha-2,6-sialyltransferase 1*) und CSF3R (*colony stimulating factor 3 receptor (granulocyte)*). Im Vergleich mit der Mono- und der Tetra-Gruppe waren acht Gene bei keimfrei gehaltenen Hühnern schwächer exprimiert. Hier seien lediglich IRG1 (*immunoresponse 1 homolog*) und IL18 (*interleukin 18 (interferon-gamma-inducing factor)*) als eminente Gene erwähnt.

In den keimfrei gehaltenen Hühnern war kein Gen ausschließlich im Vergleich zu den mono-rekonstituierten Tieren schwächer exprimiert. Viele Gene waren jedoch lediglich im Vergleich mit der konventionellen Gruppe oder ausschließlich verglichen mit den tetra-rekonstituierten Tieren in der Keimfrei-Gruppe schwächer exprimiert.

Die nur im Vergleich mit den tetra-rekonstituierten Tieren schwächer regulierten Gene waren vor allem MX-1 (*myxovirus (influenza virus) resistance 1*), SOCS3 (*suppressor of cytokine signaling 3*), SOCS2 (*suppressor of cytokine signaling 2*) und SOCS1 (*suppressor of cytokine signaling 1*), Ly96 (*lymphocyte antigen 96*), IFNG (*interferon, gamma*), IL6 (*interleukin 6*) und IL22, aber auch viele weitere immunrelevante Gene.

Eminente Gene, welche lediglich im Vergleich mit den konventionell gehaltenen Tieren in der Keimfrei-Gruppe schwächer exprimiert wurden, waren beispielsweise CD8B (*CD8b molecule*), C3 (*complement component 3*), EBF1 (*early B-cell factor 1*) und CD79B (*CD79b molecule, immunoglobulin-associated beta*).

Ebenso wie bei der CT sollten auch Genüberschneidungen im Caecum näher betrachtet werden (Abbildung 21).

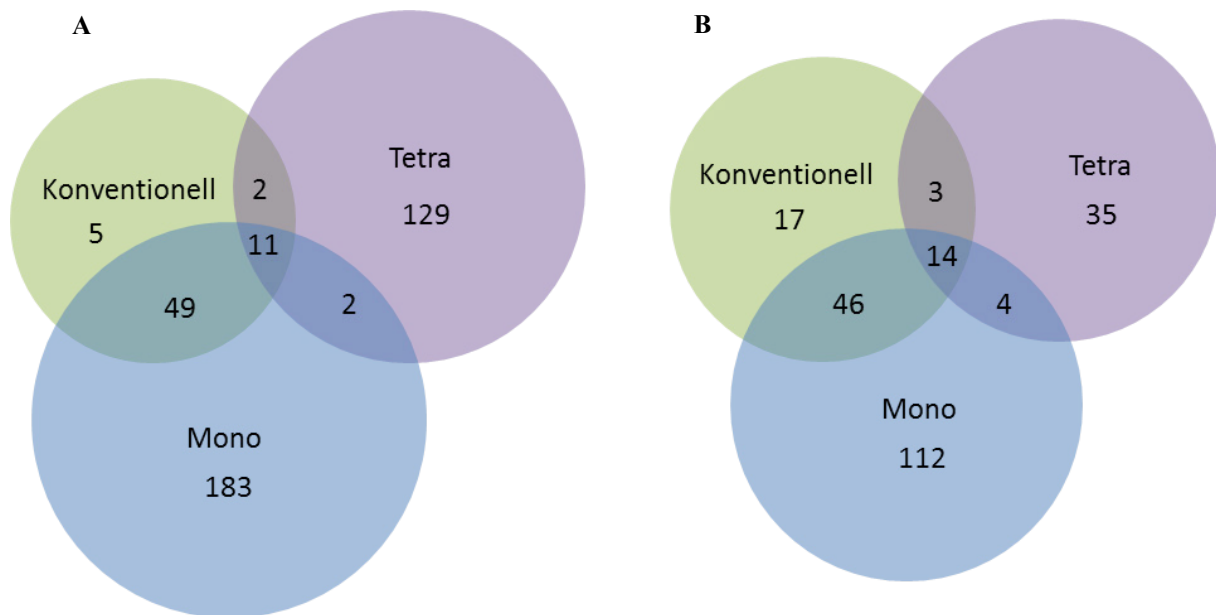


Abbildung 21: Genüberschneidungen der signifikant differentiell regulierten Gene im Caecum

Verteilung der signifikant stärker (A) und schwächer (B) regulierten Gene im Caecum von keimfrei gehaltenen Hühnern im Vergleich mit konventionell gehaltenen (grün), mono-rekonstituierten (blau) und tetra-rekonstituierten (violett) Hühnern an Tag 28 nach dem Schlupf. Die Zahlen geben die Anzahl von Genen innerhalb der Schnittmengen an.

Im Caecum konnten insgesamt deutlich höhere Expressionsunterschiede festgestellt werden, als in der CT, insbesondere bei den mono-rekonstituierten Tieren, bei denen außerdem auch die Zahl der signifikant regulierten Gene im Caecum deutlich höher war als in der CT.

Bei den keimfrei gehaltenen Tieren waren im Caecum 11 Gene höher exprimiert als in allen anderen Gruppen. Zu diesen Genen gehörten *APOB* (*apolipoprotein B (including Ag(x) antigen)*), welches mit einer 56fach erhöhten Expression verglichen mit den mono-rekonstituierten Tieren das stärkste regulierte Gen in diesem Vergleich darstellte. *APOB* codiert für das Apolipoprotein B, welches zum einen als Bestandteil der Chylomikronen für die Fettresorption im Darm von Bedeutung ist und zum anderen beim Transport von Fetten in Blut und Lymphe eine Rolle spielt. Ein weiteres Gen, welches an der Fettresorption im Darm beteiligt ist und bei der Keimfrei-Gruppe stark hochreguliert war, ist *FABP6* (*fatty acid binding protein 6, ileal (gastrotropin)*). Analog zu der CT fanden sich auch im Caecum einige Gene für SLC-Transporter, die bei den keimfrei gehaltenen Tieren stärker exprimiert waren, als bei den anderen Gruppen. Zu diesen zählten beispielsweise *SLC2A5* (*solute carrier family*

2 (*facilitated glucose/fructose transporter*), *member 5*) und SLC5A1 (*solute carrier family 5 (sodium/glucose cotransporter)*, *member 1*). Weitere differentiell exprimierte Vertreter dieser Gen-Familie sind in Tabelle 14 angegeben.

Insgesamt 49 Gene waren bei den keimfrei gehaltenen Tieren im Vergleich mit der konventionellen Gruppe und den mono-rekonstituierten Tieren höher exprimiert, während nur jeweils 2 Gene sowohl nach Tetra-Rekonstitution als auch nach konventioneller Haltung bzw. nach Tetra- und Mono-Rekonstitution schwächer exprimiert waren als bei den keimfrei gehaltenen Hühnern. Von den erstgenannten 49 Genen codieren abermals viele für Transporter und Kanäle, wie beispielsweise TMC2, MME und SLC5A11, die bereits in der CT der keimfrei gehaltenen Hühnern signifikant stärker reguliert waren, sowie SLC34A2 (*solute carrier family 34 (sodium phosphate)*, *member 2*), SLC1A1 (*solute carrier family 1 (neuronal/epithelial high affinity glutamate transporter, system Xag)*, *member 1*) und MMP10 (*matrix metalloproteinase 10 (stromelysin 2)*). Von den Genen, welche nur im Vergleich mit der Mono und der Tetra-Gruppe in den keimfrei gehaltenen Tieren hochreguliert waren, sei GRPR (*gastrin-releasing peptide receptor*) erwähnt. Aktivierung des Gastrin-freisetzenden Peptidrezeptors führt zur Freisetzung von gastrointestinalen Hormonen und Epithelzellproliferation. Eine differentielle Expression von GRPR konnte außerdem unter anderem bei Krebserkrankungen des Colons nachgewiesen werden [224].

Zahlreiche in der Keimfrei-Gruppe signifikant stärker regulierte Gene konnten im Vergleich mit der Mono-Gruppe oder der Tetra-Gruppe identifiziert werden, jedoch nur fünf Gene waren im Vergleich mit der konventionellen Gruppe im Caecum der keimfrei gehaltenen Tiere höher exprimiert.

Zu den erstgenannten zählten erneut viele Gene, die für SLC-Transporter codieren, welche Tabelle 14 zu entnehmen sind. Außerdem konnten hier wiederum Gene gefunden werden, die für Kanäle codieren, wie AQP5 (*aquaporin 5*) und TMC7 (*transmembrane channel-like 7*). MUC2 (*mucin 2, oligomeric mucus/gel-forming*) und IL15 (*interleukin 15*) waren bei den keimfrei gehaltenen Tieren im Vergleich zu den mono-rekonstituierten Tieren 2fach hoch reguliert.

Allein im Vergleich mit der Tetra-Gruppe waren bei der Keimfrei-Gruppe unter anderen folgende Gene höher exprimiert: B2M (*beta-2-microglobulin*), CCL21 (*chemokine (C-C motif) ligand 21*), IGFN1 (*immunoglobulin-like and fibronectin type III domain containing 1*) und SLC16A2 (*solute carrier family 16, member 2 (monocarboxylic acid transporter 8)*).

Insgesamt 14 Gene waren im Caecum von keimfrei gehaltenen Hühnern schwächer exprimiert

als in den anderen drei Gruppen. Darunter waren bereits aus der CT bekannte Vertreter wie SLC12A4 (*solute carrier family 12 (potassium/chloride transporters), member 4*), sowie viele immunrelevante Gene wie IgY, IgJ, PIGR (*polymeric immunoglobulin receptor*) und K60 (CXCLi1, IL8 Homolog). Außerdem war unter diesen 14 Genen ein weiterer Transporter, SLC16A14 (*solute carrier family 16, member 14 (monocarboxylic acid transporter 14)*), welcher in der CT nicht reguliert war.

Weitere immunrelevante Gene waren im Vergleich zu der Mono-Gruppe und der konventionellen Gruppe bei den keimfrei gehaltenen Tieren schwächer exprimiert, wie beispielsweise TNFSF13B (BAFF, *tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13b*), JAK3 (*janus kinase 3 (a protein tyrosine kinase, leukocyte)*), IL8 (CXCLi2 interleukin 8 Homolog), IL21R (*interleukin 21 receptor*), IL13RA2 (*interleukin 13 receptor, alpha 2*), SOCS3 (*suppressor of cytokine signaling 3*), welches auch in der CT im Vergleich mit der Tetra-Gruppe reguliert war, und erneut Mitglieder der CXCL13 Familie. Außerdem waren unter diesen Genen auch CD8b, CD79b (*CD79b molecule, immunoglobulin-associated beta*), CD72 (*CD72 molecule*), CD4 (*CD4 molecule*) und CD28 (*CD28 molecule*).

Gene, welche nur verglichen mit der Mono-Gruppe im Caecum der Keimfrei-Gruppe schwächer exprimiert wurden, waren beispielsweise VCAM1 (*vascular cell adhesion molecule 1*), TNFRSF1B (CD120b, *tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1B*), IL2RG (*interleukin 2 receptor, gamma (severe combined immunodeficiency)*), CXCR4 (*chemokine (C-X-C motif) receptor 4*), C3 (*complement component 3*), welches auch in der CT im Vergleich mit der konventionellen Gruppe schwächer exprimiert war, aber auch abermals einige SLC-Transporter (Tabelle 14).

Nur wenig Gene waren einzig im Vergleich mit den konventionell gehaltenen Tieren im Caecum der keimfrei gehaltenen Tiere schwächer exprimiert. Zu ihnen zählten BLB1 (MHC *class II antigen B-F minor heavy chain*), CD3E (CD3e *molecule, epsilon (CD3-TCR complex)*), LYG2 (*lysozyme G-like 2*), ein Defensin und einige Enzyme.

Im alleinigen Vergleich mit den tetra-rekonstituierten Tieren waren im Caecum der Keimfrei-Gruppe 35 Gene schwächer exprimiert. Zu diesen zählten beispielsweise MX-1 (*myxovirus (influenza virus) resistance 1*), das auch schon in der CT in diesem Vergleich herunter reguliert war und ein Transporter-Gen SLC7A13 (*solute carrier family 7, (cationic amino acid transporter, y⁺ system) member 13*).

Im Caecum gab es interessanterweise auch 11 Gene die im Vergleich zu den unterschiedlichen Gruppen gegenläufig entweder stärker oder schwächer exprimiert wurden.

Dazu zählten beispielsweise die Cytidin Deaminase, SLC13A2 (*solute carrier family 13 (sodium-dependent dicarboxylate transporter), member 2*) und SLC5A9, welche im Vergleich mit der konventionellen Gruppe und der Tetra-Gruppe schwächer, verglichen mit den mono-rekonstituierten Tieren aber stärker exprimiert wurden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei den mikrobiell kolonisierten und den keimfrei gehaltenen Hühnern jeweils bestimmte Prozesse eine übergeordnete Rolle zu spielen scheinen. So sind beispielsweise in den mikrobiell kolonisierten Gruppen (Konventionell, Mono, Tetra) Gene, die für immunrelevante Moleküle codieren bei den hoch regulierten Genen überrepräsentiert. Zahlreiche höher exprimierte Gene, die für Transportproteine codieren deuten darauf hin, dass in den CTs und den Caeca der keimfrei gehaltenen Tiere Transportprozesse eine wichtige Rolle spielen könnten. Eine Liste aller Genüberscheidungen zwischen den Gruppen findet sich auf beiliegender CD, Mappe 1, Tabelle 24 und 25.

5.2.4 Funktionelle Analysen

Gene Ontology

Um herauszufinden ob sich die Gene, die bei den keimfrei gehaltenen Hühnern stärker exprimiert waren und solche, die bei den mikrobiell kolonisierten Hühnern (Konventionell, Tetra, Mono) stärker exprimiert waren, in unterschiedliche funktionelle Gruppen unterteilen lassen, wurden die Datensätze mit der Panther Gene List Analysis verglichen und in verschiedene GO-Hauptgruppen eingeteilt. Es wurden alle signifikant regulierten Gene in das Programm geladen, von denen die in Tabelle 15 abgebildete Anzahl vom Programm erkannt wurden und zur Analyse herangezogen werden konnten.

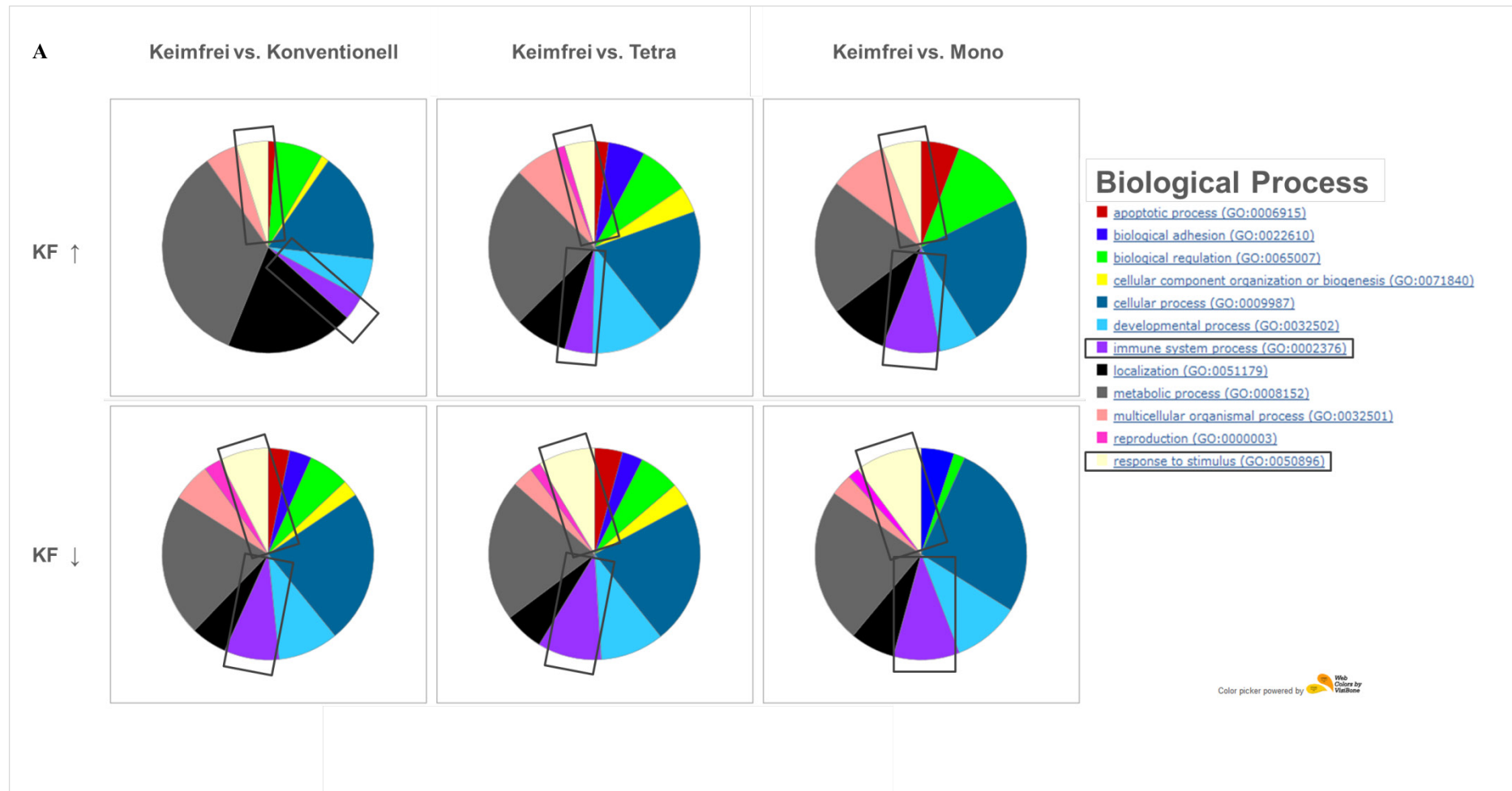
Die Analyse ergab, dass innerhalb der ausgewählten GO-Hauptgruppen „Molecular function“ und „Biological Process“ einige GO-Untergruppen bei den keimfrei gehaltenen Hühnern deutlich vermehrt vorhanden waren, während andere GO-Untergruppen bei den kolonisierten Tieren eine größere Rolle zu spielen schienen. Jedoch konnten auch Unterschiede in der Relevanz einzelner GO-Untergruppen zwischen den drei mikrobiell kolonisierten Gruppen gefunden werden (Abbildung 22 und Abbildung 23). Die prozentualen Anteile der jeweiligen Untergruppen gemessen an der Anzahl erkannter Gene sind in Tabelle 15 zusammengefasst und in Abbildung 22 und Abbildung 23 graphisch dargestellt. Eine Liste aller gefundenen Gene innerhalb der GO-Untergruppen findet sich auf beiliegender CD, Tabelle 26 und 27.

Tabelle 15: Analyse der signifikant differentiell exprimierten Gene mittels Panther Gene List Analysis

Alle signifikant differentiell exprimierten Gene (rote Zahlen) in der Caecaltonsille (CT) und dem Caecum von keimfrei gehaltenen Hühnern (KF) verglichen mit konventionell gehaltenen (Konv), tetra-rekonstituierten (Tetra) und mono-rekonstituierten (Mono) Tieren wurden in das Programm Panther Gene List Analysis geladen, welches einen bestimmten Anteil dieser Gene (fett gedruckte Zahlen) erkennen, auf ihre Zugehörigkeit zu funktionellen Gruppen überprüfen und in verschiedene Hauptgruppen und Untergruppen einteilen konnte. Dargestellt sind die prozentualen Anteile der erkannten Gene, die jeweils den verschiedenen Untergruppen innerhalb der beiden Hauptgruppen „Molecular function“ und „Biological Process“ zugeordnet wurden.

	CT						Caecum					
Vergleich	KF vs. Konv		KF vs. Tetra		KF vs. Mono		KF vs. Konv		KF vs. Tetra		KF vs. Mono	
Regulation	KF ↑	KF ↓	KF ↑	KF ↓	KF ↑	KF ↓	KF ↑	KF ↓	KF ↑	KF ↓	KF ↑	KF ↓
Erkannte Gene/ signifikante Gene	56/71	124/192	215/345	172/246	16/20	39/63	54/67	64/84	82/148	41/60	193/253	142/179
MOLECULAR FUNCTION												
binding (GO:0005488)	12,5	32,3	23,7	32	18,8	20,5	13,0	26,6	29,3	29,3	25,4	29,0
catalytic activity (GO:0003824)	30,4	29,8	28,4	32,6	18,8	30,8	40,7	28,1	35,4	34,1	38,3	30,4
enzyme regulator activity (GO:0030234)	3,6	5,6	2,3	3,5	2,6	-	3,7	3,1	8,5	4,9	2,6	4,3
nucleic acid binding transcription factor activity (GO:0001071)	3,6	6,5	7,4	4,7	-	2,6	3,7	6,3	12,2	9,8	5,7	3,6
protein binding transcription factor activity (GO:0000988)	1,8	-	0,5	-	-	-	-	-	3,7	-	-	-
receptor activity (GO:0004872)	1,8	12,9	8,8	11,0	12,5	17,9	5,6	10,9	11,0	7,3	4,1	15,2
structural molecule activity (GO:0005198)	5,4	7,3	7,0	7,0	6,3	-	7,4	3,1	8,5	4,9	8,3	5,8
translation regulator activity (GO:0045182)	1,8	-	-	0,6	-	-	1,9	3,1	-	-	0,5	1,4
transporter activity (GO:0005215)	23,2	1,6	8,4	3,5	12,5	2,6	18,5	7,8	7,3	12,2	16,6	10,1

BIOLOGICAL PROCESS												
apoptotic process (GO:0006915)	1,8	6,5	3,7	8,7	12,5	-	-	3,1	3,7	2,4	2,6	6,5
biological adhesion (GO:0022610)	-	6,5	9,8	6,4	-	7,7	9,3	7,8	9,8	4,9	3,6	8,0
biological regulation (GO:0065007)	-	12,1	13,5	12,8	25,0	2,6	14,8	14,1	22,0	17,1	11,9	15,2
cellular component organization or biogenesis (GO:0071840)	10,7	4,8	7,0	7,0	-	-	1,9	1,6	11,0	2,4	5,2	2,2
cellular process (GO:0009987)	1,8	45,2	34,4	44,8	50,0	41,0	22,2	45,3	32,9	31,7	30,1	47,8
developmental process (GO:0032502)	25	17,7	19,1	19,8	12,5	15,4	13,0	20,3	20,7	26,8	16,1	24,6
immune system process (GO:0002376)	8,9	16,1	7,4	19,8	18,8	15,4	11,1	29,7	9,8	19,5	8,8	23,9
localization (GO:0051179)	5,4	10,5	14	12,2	18,8	10,3	22,2	17,2	14,6	17,1	19,2	19,6
metabolic process (GO:0008152)	28,6	41,9	43,3	44,2	43,8	35,9	61,1	39,1	58,5	51,2	52,3	42,0
multicellular organismal process (GO:0032501)	50,0	11,3	11,6	6,4	18,8	5,1	13,0	3,1	8,5	14,6	8,8	12,3
reproduction (GO:0000003)	7,1	4,8	2,3	3,5	-	2,6	-	3,1	2,4	9,8	2,6	4,3
response to stimulus (GO:0050896)	7,1	14,5	7,9	17,4	12,5	15,4	11,1	28,1	11,0	17,1	8,3	23,2



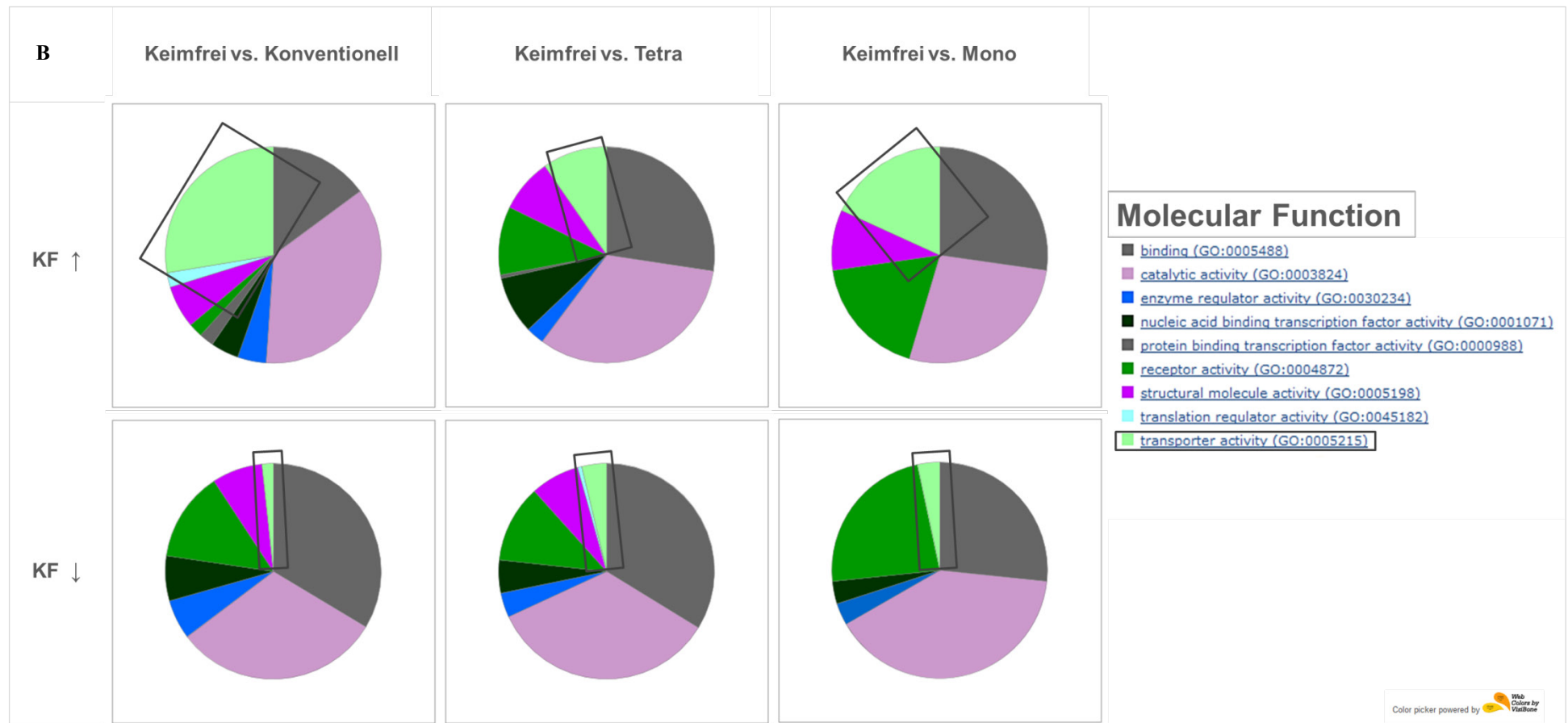
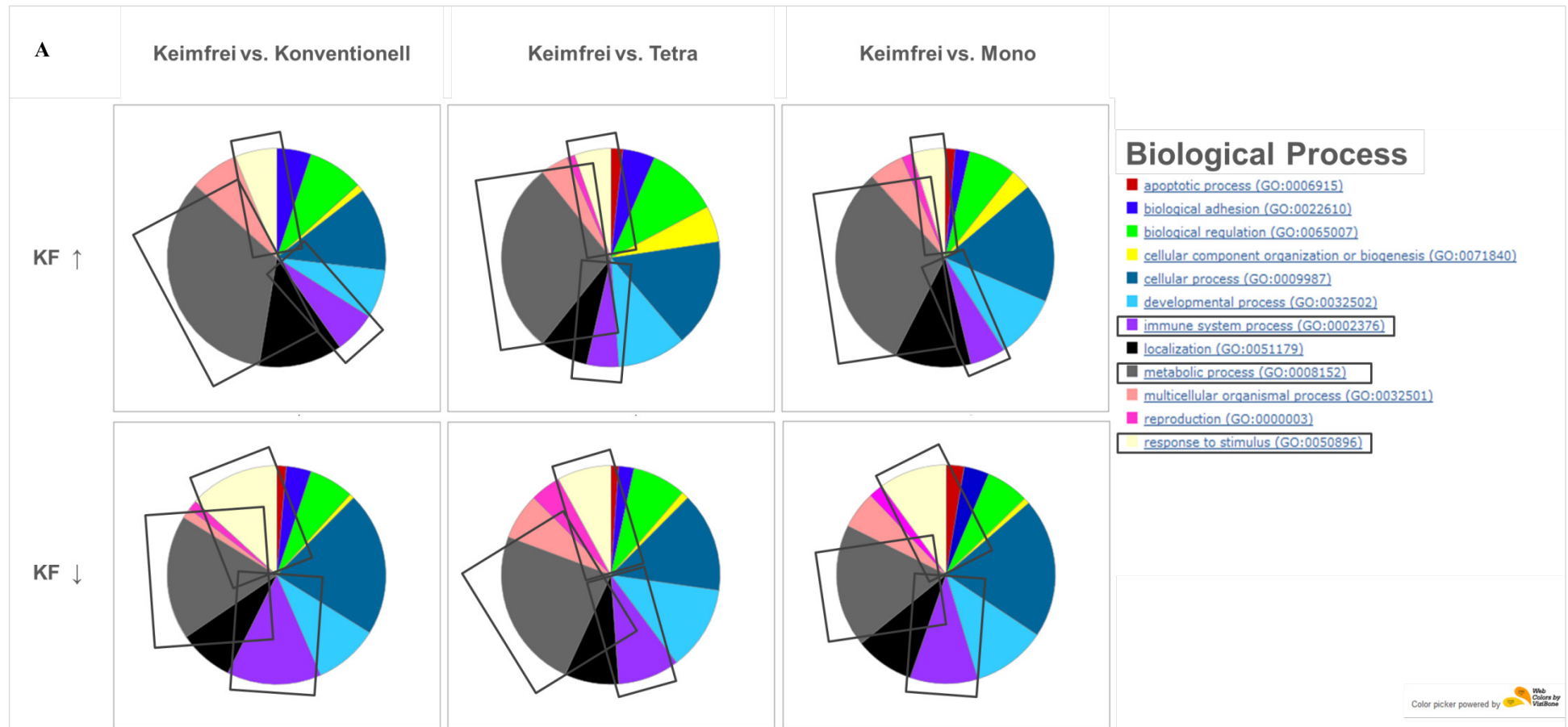


Abbildung 22: Gene Ontology der CT

Die identifizierten signifikant stärker (KF ↑) und schwächer (KF ↓) exprimierten Gene in den Caecaltonsillen von keimfrei gehaltenen (Keimfrei = KF) Hühnern verglichen mit mono-rekonstituierten (Mono), konventionell gehaltenen (Konventionell) und tetra-rekonstituierten (Tetra) Hühnern an Tag 28 nach dem Schlupf wurden mittels des Programms Panther Gene List Analysis auf ihre Zugehörigkeit zu funktionellen Gruppen überprüft und in verschiedene Hauptgruppen und Untergruppen eingeteilt. Dargestellt sind die funktionellen Gruppen „Biological Process“ (A) und „Molecular function“ (B). Auffällige Gruppen sind mit Vierecken gekennzeichnet.



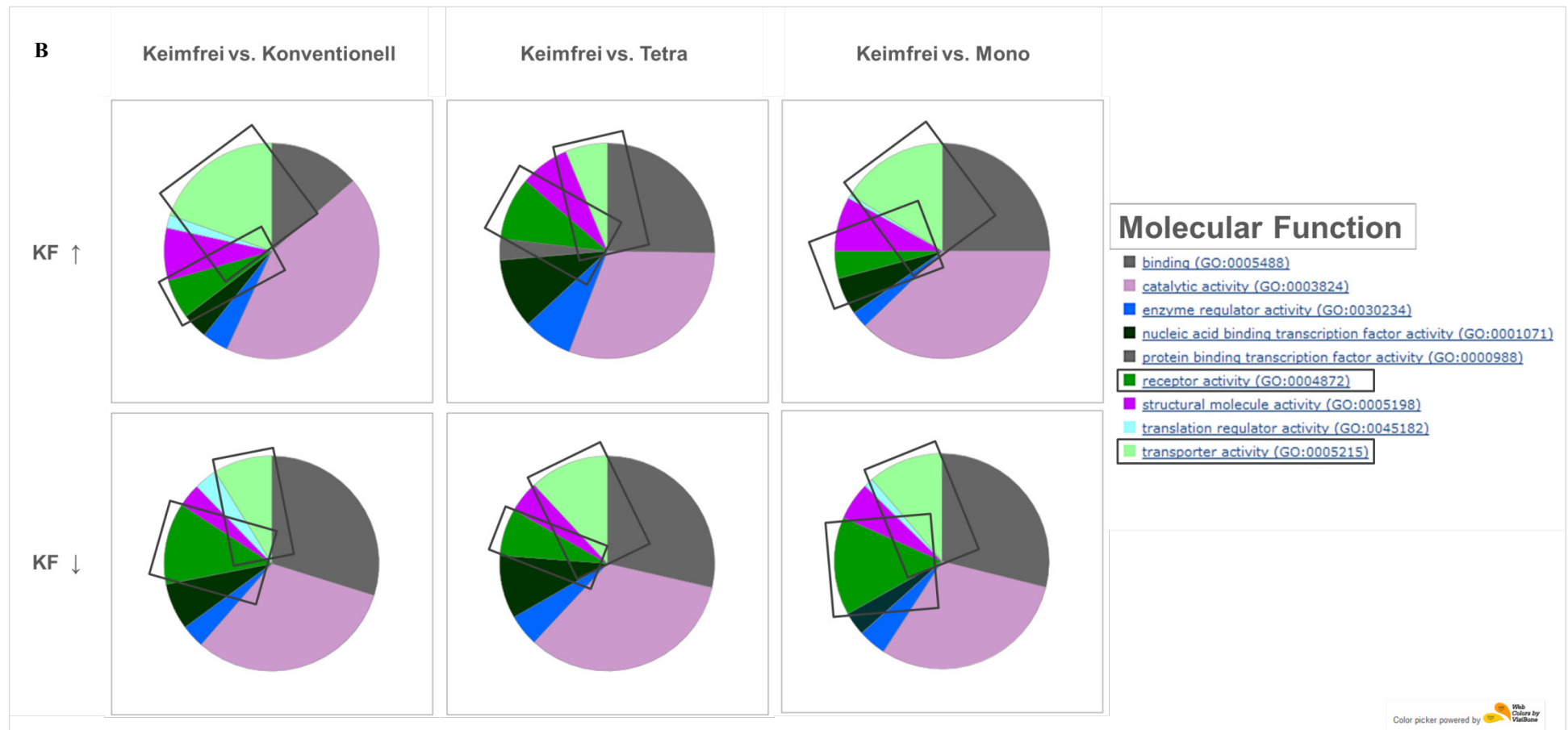


Abbildung 23: Gene Ontology des Caecums

Die identifizierten signifikant stärker (KF ↑) und schwächer (KF ↓) exprimierten Gene im Caecum von keimfrei gehaltenen (Keimfrei = KF) Hühnern verglichen mit mono-rekonstituierten (Mono), konventionell gehaltenen (Konventionell) und tetra-rekonstituierten (Tetra) Hühnern an Tag 28 nach dem Schlupf wurden mittels des Programms Panther Gene List Analysis auf ihre Zugehörigkeit zu funktionellen Gruppen überprüft und in verschiedene Hauptgruppen und Untergruppen eingeteilt. Dargestellt sind die funktionellen Gruppen „Biological Process“ (A) und „Molecular function“ (B). Auffällige Gruppen sind mit Vierecken gekennzeichnet.

Wie die genauere Betrachtung der bei den mikrobiell kolonisierten Tieren signifikant stärker regulierten Gene in der CT und im Caecum bereits vermuten ließ, fielen innerhalb der GO-Hauptgruppe „Biological Process“ insbesondere die GO-Untergruppen „Response to stimulus“ und „Immune system process“ ins Gewicht (Abbildung 22 A und Abbildung 23 A), da eine Vielzahl von Genen die bei den keimfrei gehaltenen Tieren schwächer exprimiert waren als bei den mikrobiell kolonisierten Hühnern, mit einer Immunantwort in Verbindung gebracht werden konnten. Gene, die für diese Gewichtung verantwortlich waren, waren beispielsweise CD4, K60 (CXCL1), CD5, CD28, IL8, IL21R, einige β -Defensine und Mitglieder der CXCL13 Familie.

Einige bei der Keimfrei-Gruppe signifikant höher regulierten Gene, die „Immune system process“ und „Response to stimulus“ zugeordnet wurden, waren beispielsweise GRPR (*gastrin-releasing peptide receptor*), CCR8, VEGFA (*Vascular endothelial growth factor A*) und PDGFD (*platelet-derived growth factor D*).

Im Caecum schien zudem „Metabolic Process“ in den keimfrei gehaltenen Tieren eine Rolle zu spielen. „Metabolic Process“ beinhaltet Gene, die mit anabolen und katabolen chemischen Reaktionen und Signalkaskaden assoziiert werden um beispielsweise DNA zu reparieren, zu replizieren, Proteine zu synthetisieren und diese zu degradieren. Zu diesen Genen zählten beispielsweise MME (*membrane metallo-endopeptidase*) und die Vielzahl an SLC-Transporter-Gene. Des Weiteren wird auch GRPR zu dieser Gruppe gezählt, welches bereits in den GO-Untergruppen „Response to stimulus“ und „Immune system process“ gelistet wurde.

In der GO-Hauptgruppe „Molecular function“ fiel die Relevanz von „Transporter activity“ bei den in den keimfrei gehaltenen Tieren höher exprimierten Genen auf (Abbildung 22 B und Abbildung 23 B). Dies bestätigte erneut den Eindruck, dass viele bei den keimfrei gehaltenen Tieren höher exprimierten Gene mit Transportvorgängen in Verbindung gebracht werden können, wie z. B. die diversen SLC-Transporter, TMC (*transmembrane channel-like protein 2*), Aquaporine, aber auch ABCC8, TMEM184B (*transmembrane protein 184B*), CACNA1B (*voltage-dependent n-type calcium channel subunit alpha-1B*), COL4A3 (*collagen, type IV, alpha 3 (Goodpasture antigen)*) und COL4A1 (*collagen alpha-1(IV) chain*).

Gene die allgemein stärker in den mikrobiell kolonisierten Tieren exprimiert waren, wurden hingegen zu großen Teilen der GO-Untergruppe „Receptor activity“ zugeordnet. Dies lag mitunter an vielen Chemokin- und Zytokinrezeptoren, wie IL21R, IL13Ra2, TNFRSF1B (CD120b, *tumor necrosis factor receptor superfamily member 1B*), CXCR4, aber auch Genen

für costimulatorische Moleküle wie CD86 und an CD79b, welches für einen Teil des B-Lymphozyten-Rezeptors codiert.

Vergleicht man die prozentualen Anteile der verschiedenen GO-Untergruppen zwischen den drei mikrobiell kolonisierten Tiergruppen, so fällt auf, dass innerhalb der GO-Hauptgruppe „Biological Process“ sich die Verteilung der in den drei mikrobiell kolonisierten Tiergruppen höher exprimierten Gene insgesamt sehr ähnlich war. Einige Unterschiede zu der Tetra und der konventionellen Gruppe zeigte hier allerdings die Mono-Gruppe in der CT, bei der keine höher exprimierten Gene den GO-Untergruppen „Apoptotic process“ und „Cellular component organization or biogenesis“ zugeordnet werden konnten (Abbildung 22 A).

Auch bei „Molecular function“ bestanden Unterschiede in der Unterteilung zwischen den mikrobiell kolonisierten Gruppen vor allem in der CT der Mono-Gruppe. Wie schon in der vorherigen Hauptgruppe waren sich auch hier die konventionell gehaltenen und die tetra-rekonstituierten Tiere in der Unterteilung ihrer höher exprimierten Gene sehr ähnlich. In der CT der Mono-Gruppe konnte kein höher reguliertes Gen „Structural molecule activity“ zugeordnet werden (Abbildung 22 B).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass viele der in den mikrobiell kolonisierten Tieren (konventionelle-, Mono- und Tetra-Gruppe) höher exprimierten Gene in die funktionellen Gruppen „Response to stimulus“, „Immune system process“ und „Receptor activity“ eingeteilt werden konnten, wohingegen bei den keimfrei gehaltenen Tieren die höher exprimierten Gene zu großen Teilen in die funktionellen Gruppen „Transporter activity“ und „Metabolic Process“ fielen. Des Weiteren ähnelten sich die beiden Tiergruppen „Konventionell“ und „Tetra“ in der funktionellen Unterteilung ihrer hoch regulierten Gene stark, wohingegen die Mono-Gruppe teilweise von den beiden erstgenannten abwich.

Pathway Express

Das Programm Pathway Express von Onto-tools ermöglicht die Analyse von Datensätzen hinsichtlich biologisch relevanter Signalkaskaden. Um zu sehen ob in den Caeca und CTs der mikrobiell kolonisierten bzw. keimfrei gehaltenen Hühner unterschiedliche Signalwege induziert oder supprimiert werden, wurden die signifikant regulierte Gene von Caecum und CT zwischen den keimfrei und den konventionell gehaltenen Hühnern, zwischen tetra-rekonstituierten und keimfrei gehaltenen Hühnern und zwischen den mono-rekonstituiert und keimfrei gehaltenen Hühnern mit diesem Tool untersucht. Eine Liste aller gefundenen Signalwege und die darin enthaltenen Gene ist auf beiliegender CD, Mappe 1, Tabelle 28 bis 35 zu finden. Ein Signalweg wurde als biologisch relevant evaluiert wenn der *corrected*

gamma p-value, als statistisches Maß für die Signifikanz eines Signalweges, kleiner als 0,3 war. Von den biologisch relevanten Signalwegen wurden die Signalwege, die keine Relevanz für das Immunsystem haben abgezogen und die verbliebenen, immunrelevanten Signalwege aufgelistet (Tabelle 16).

Tabelle 16: Analyse von Datensätzen hinsichtlich biologisch relevanter Signalkaskaden

Anzahl aller identifizierten Signalwege, der biologisch relevanten Signalwege und der immunrelevanten Signalwege in den Datensätzen von Caecum und CT der mit den keimfrei gehaltenen Hühnern verglichenen Tiergruppen (Konventionell, Tetra, Mono) welche mittels Pathway Express ermittelt wurden.

	CT			Caecum		
	Konvent	Tetra	Mono	Konvent	Tetra	Mono
Anzahl aller identifizierten Signalwege	62	81	30	54	67	78
Anzahl biologisch relevanter Signalwege	14	18	10	11	22	14
davon immunrelevant	10	11	9	9	10	12

Tabelle 17: Immunologisch relevante Signalwege

Immunrelevanten Signalwege in den Datensätzen der Caecaltonsille (CT) und des Caecums keimfrei gehaltener Hühner jeweils im Vergleich zu konventionell gehaltenen (Konv), tetra-rekonstituierten (Tetra) und mono-rekonstituierten (Mono) Hühnern. Gelistet ist jeweils der entsprechende *corrected gamma p-value*. Als biologisch relevant wurde ein *corrected gamma p-value* von <0,3 angesehen (rot geschrieben).

Name des Signalwegs	CT			Caecum		
	Vergleichsgruppe			Vergleichsgruppe		
	Konv	Tetra	Mono	Konv	Tetra	Mono
MAPK signaling pathway	1,95E-01	6,10E-02	1,77E-01	8,66E-01	2,94E-01	7,59E-01
Phosphatidylinositol signaling system	6,76E-15	6,45E-12	3,99E-17	7,25E-04	-	9,30E-08
Calcium signaling pathway	2,55E-01	2,63E-01	3,22E-01	-	-	-
Antigen processing and presentation	1,62E-01	6,81E-17	-	1,25E-11	7,64E-01	4,93E-06
Insulin signaling pathway	1,99E-01	2,65E-01	-	6,23E-01	2,41E-01	5,17E-01
Cytokine-cytokine receptor interaction	8,67E-02	4,48E-01	6,66E-02	8,05E-01	7,83E-01	1,39E-01
Jak-STAT signaling pathway	2,69E-01	2,65E-01	8,70E-02	1,98E-01	5,50E-01	2,71E-01
Apoptosis	3,40E-01	2,91E-01	2,22E-01	-	-	-
Focal adhesion	3,89E-01	2,95E-01	1,76E-01	8,51E-01	1,07E-01	6,91E-01
Tight junction	5,43E-01	2,36E-01	2,98E-01	4,66E-01	4,27E-01	5,39E-06

Adherens junction	2,16E-02	-	-	1,91E-02	1,64E-01	1,44E-06
ErbB signaling pathway	2,09E-01	4,20E-01	-	-	1,27E-01	7,48E-01
Natural killer cell mediated cytotoxicity	6,78E-02	3,34E-01	-	-	2,59E-01	-
Cell adhesion molecules (CAMs)	7,94E-01	6,67E-29	-	5,34E-12	8,58E-01	4,39E-298
Gap junction	-	6,57E-02	-	-	1,18E-01	7,15E-01
Leukocyte transendothelial migration	4,37E-01	2,52E-74	-	5,46E-27	6,41E-01	<4,39E-298
Hematopoietic cell lineage	3,29E-01	5,60E-01	1,05E-01	6,75E-02	9,29E-01	2,69E-01
Renin-angio tensin system	-	-	-	5,78E-02	-	6,68E-02
B cell receptor signaling pathway	-	-	-	2,72E-01	5,03E-01	6,52E-01
Cell cycle	-	-	-	9,35E-01	1,89E-01	8,84E-01
mTOR signaling pathway	-	-	-	-	2,68E-01	7,67E-01
p53 signaling pathway	-	-	-	7,81E-01	2,93E-01	8,74E-01
Regulation of actin cytoskeleton	-	-	-	-	2,16E-01	7,38E-01
Complement and coagulation cascades	-	-	-	9,35E-01	5,25E-01	2,17E-01
PPAR signaling pathway	-	-	-	6,89E-01	6,94E-01	2,51E-01

Aus Tabelle 16 wird ersichtlich, dass unter den als biologisch relevant erachteten Signalwegen die Mehrzahl auch immunrelevant war. Die immunologisch relevanten Signalwege sind in Tabelle 17 gelistet. Dabei spiegeln die relevanten Signalwege (und damit die darin enthaltenen signifikant regulierten Gene) alle Schritte einer Immunantwort wieder, angefangen mit der Antigenerkennung und Prozessierung, über Signaltransduktionswege und die Chemotaxis von Effektorzellen, bis hin zu spezifischen Immunantworten.

Der Prozess der Antigenerkennung und Prozessierung unterschied sich sowohl in der CT als auch im Caecum zwischen den keimfrei gehaltenen und den mikrobiell kolonisierten Tieren, unter anderem aufgrund von in den kolonisierten Tieren stärker exprimierten Genen wie MHCII, CD4, CD8 und IFI30 (*interferon, gamma-inducible protein 30*).

Auch wichtige Signaltransduktionswege, die nach Antigenerkennung zur Induktion einer Immunantwort führen, scheinen durch mikrobielle Kolonisation des Darms beeinflusst zu werden. So beispielsweise der MAPK Signalweg, der in der CT bei allen Vergleichen relevant war. Nach Mono-Rekonstitution und konventioneller Haltung wurde er vor allem aufgrund der erhöhten Expression von IL1 und IL1R bei den mikrobiell kolonisierten Tieren

als relevant eingestuft, nach Tetra-Rekonstitution zudem aufgrund einer stärkeren Expression von FGF (*Fibroblast growth factor*), RAS (*RAS related protein*) und der Serine/Threonine Kinase RAF1 in den keimfrei gehaltenen Tieren. Auch der Jak-Stat Signalweg, der Calciumsignalweg und der Phosphoinositolsignalweg wurden als biologisch relevant eingestuft. Der Calciumsignalweg war in der CT insbesondere aufgrund von Genen für G-Protein gekoppelte Rezeptoren und Calcium-abhängigen Rezeptoren und Kanälen, welche bei keimfrei gehalten Tieren stärker exprimiert waren, relevant. Des Weiteren scheinen Signalwege, die bei der Zellmigration in immunologischen Prozessen eine Rolle spielen, sich bei dem Vergleich zwischen mikrobiell kolonisierten Tieren und keimfrei gehaltenen Tieren zu unterscheiden, wie die biologische Relevanz von *Cytokine- cytokine receptor interaction*, *Cell adhesion molecules* und *Leukocyte transendothelial migration* verdeutlicht.

In der CT zeigte bei der Mono und der Tetra-Gruppe auch der Signalweg für Apoptose eine vermehrte Induktion, welcher vor allem aufgrund der Gene PIK3CD (*phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit delta*) und IL1b, die bei den mikrobiell kolonisierten Tieren stärker exprimiert waren, als relevant eingestuft wurde.

Eine sehr große Rolle scheint außerdem die Aufrechterhaltung der Zell- und Gewebearchitektur zu spielen, wie die biologische Relevanz der Signalwege *Focal adhesion*, *Tight junction*, *Adherens junction* und *Gap junction* zeigt. In diesen Signalwegen finden sich viele Gene die bei den keimfrei gehaltenen Tieren stärker exprimiert wurden, wie Wachstumsfaktoren diverser Zelllinien (VEGFA, EPS8), ITGB (*integrin, beta 3 (platelet glycoprotein IIIa, antigen CD61)*), RAS, PRKCD (*protein kinase C, delta*), CLDN5 (*claudin 5*), aber auch PTEN (*phosphatase and tensin homolog*), welches in den konventionell gehaltenen und mono-rekonstituierten Tieren im Caecum und bei allen Vergleichsgruppen in der CT stärker exprimiert war.

Zusammenfassend konnten deutliche Unterschiede im Caecum und der CT von keimfreien und mikrobiell kolonisierten Hühnern bezüglich der immunologisch relevanten Signalkaskaden gefunden werden.

5.3 QUANTITATIVE REAL TIME POLYMERASE KETTEN-REAKTION (QRT-PCR)

Um die Ergebnisse der Microarray Analysen zu verifizieren und um die in der Immunhistologie gewonnenen Eindrücke quantitativ erfassen zu können wurden gezielt einzelne Gene mittels qRT-PCR untersucht. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 8 (siehe Kapitel 4.6) zusammengefasst.

Zur Untersuchung des B-Lymphozyten Systems wurden IgA und IgY als Gene für die entsprechenden Immunglobuline, IgJ als Gen für die J-Kette der Immunglobuline A und M, chB6 als Gen für das gleichnamige Oberflächenmolekül, welches auf allen B-Lymphozyten lokalisiert ist und die Gene für den BAFF-Rezeptor (TNFRSF13C) und den Chemokinrezeptor CXCR5, welche ebenfalls von jedem B-Lymphozyt exprimiert werden, untersucht. BAFF (TNFSF13B) und CD40L wurden ausgewählt, da sie für die entsprechenden B-Lymphozyten-Zytokine/Chemokine codieren. Anhand von TGFb und AICDA sollte der Vorgang des Immunglobulin-Klassenwechsels der verglichenen Gruppen beurteilt werden, da diese für den transformierenden Wachstumsfaktor β (TGF- β) und das Enzym aktivierungsinduzierte Cytidin-Desaminase (AID) codieren, welche wichtige Faktoren des Klassenwechsels darstellen. Um den funktionellen Aspekt der Antikörpersekretion in das Darmlumen und die Gallenflüssigkeit zu analysieren wurde PIGR untersucht, welches für den Poly-Ig-Rezeptor, der für diesen Vorgang essentiell ist, codiert. Zur Klassifizierung der Immunantwort wurden IL6 und IL1b, die für die proinflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-1 β codieren, und IL21, das für das gleichnamige regulatorische Zytokin codiert, gemessen. CD4 und CD8a dienten der Untersuchung des T-Lymphozyten Systems. Eine Auflistung aller Ergebnisse der qRT-PCR Untersuchungen findet sich im tabellarischen Anhang, Tabelle 18.

5.3.1 Genexpression im Caecum im Vergleich „Keimfrei“ - „Konventionell“

Analog zu der immunhistologischen Untersuchung sollte zunächst im zeitlichen Verlauf der ersten Lebenswochen die Expression der ausgewählten Gene im Caecum von konventionell gehaltenen Hühnern („Konventionell“) mit der von keimfrei gehaltenen Hühnern („Keimfrei“) verglichen werden. Dazu wurde von Caecumproben an verschiedenen Zeitpunkten nach dem Schlupf (Tag 3, 7, 14, 21 und 28) Gesamt-RNA isoliert und die mRNA in cDNA umgeschrieben. Die umgeschriebene cDNA wurde als Matrize in der qRT-PCR eingesetzt, wodurch die relative Menge an cDNA eines bestimmten Gens in der Probe und

damit die Expressionsrate der jeweils zugrundeliegenden mRNA ermittelt werden konnte. Es wurden meist fünf, mindestens aber vier Tiere pro Gruppe untersucht. Dargestellt ist jeweils der $40-\Delta\text{CT}$ Wert, um einerseits einen zum Expressionsunterschied zwischen den Gruppen direkt proportionalen Wert zu erhalten und zudem den zeitlichen Verlauf beider Gruppen besser darstellen zu können.

Wie in Abbildung 24 zu sehen, konnte am 14., 21. und 28. Lebenstag eine signifikant höhere Expression von IgA im Caecum der konventionellen Tiere verglichen mit den keimfrei gehaltenen Tieren gemessen werden. Die mRNA Abundanz von IgA im Caecum der Keimfrei-Gruppe stieg von Tag 3 bis 21 nach dem Schlupf leicht an und fiel am 28. Lebenstag wieder ab. Bei den konventionellen Tieren hingegen, stieg die Menge an mRNA von IgA im Caecum im Laufe der ersten Lebenswochen kontinuierlich an und zeigte an Tag 28. nach dem Schlupf eine 261fach höhere Expression als in den keimfrei gehaltenen Tieren. Somit wurde der Unterschied in der IgA Expression zwischen der Keimfrei-Gruppe und der konventionellen Gruppe größer, je älter die Tiere wurden.

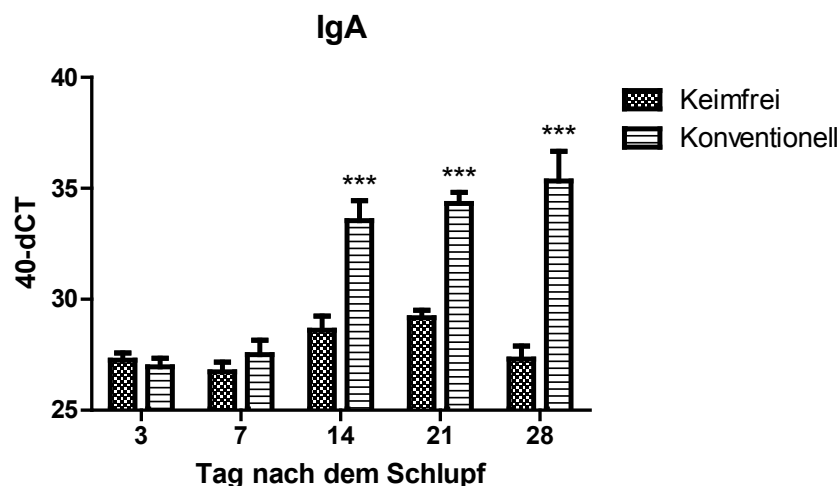


Abbildung 24: Expression von IgA im Caecum

Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde die mRNA aus dem Caecum von keimfrei gehaltenen (Keimfrei) und konventionell gehaltenen (Konventionell) Hühnern isoliert und die Expression von IgA mittels qRT-PCR untersucht. Keimfrei $n=5$, Konventionell $n=4$ (Tag 3, 7 und 28) bzw. 5 (Tag 14 und 21). *** $P < 0,001$.

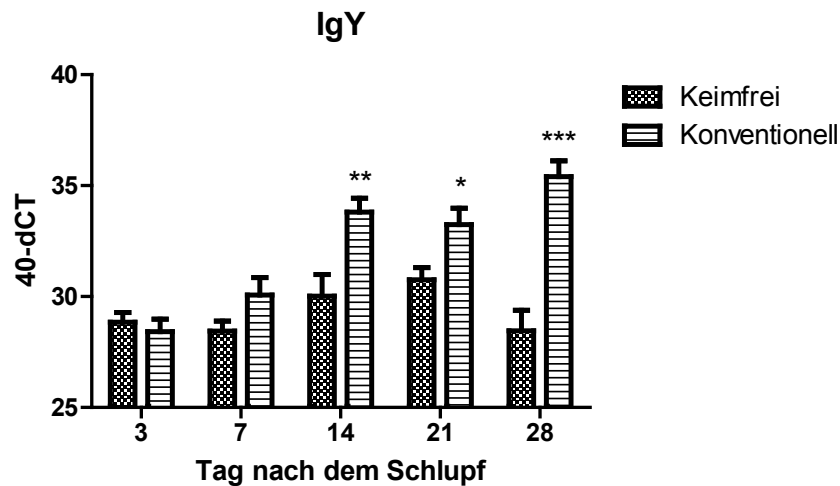


Abbildung 25: Expression von IgY im Caecum

Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde die mRNA aus dem Caecum von keimfrei gehaltenen (Keimfrei) und konventionell gehaltenen (Konventionell) Hühnern isoliert und die Expression von IgY mittels qRT-PCR untersucht. Keimfrei $n=5$, Konventionell $n=4$ (Tag 3 und 7) bzw. 5 (Tag 14, 21 und 28). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

In Abbildung 25 ist die Expression von IgY im Caecum dargestellt. Analog zu der IgA Expression konnte eine signifikant höhere mRNA Abundanz von IgY bei den konventionellen Hühnern an Tag 14, 21 und 28 nach dem Schlupf festgestellt werden, mit einer 124fachen Expression bei der konventionellen Gruppe am 28. Lebenstag. Auch hier wurde der Expressionsunterschied zwischen „Keimfrei“ und „Konventionell“ im Laufe der Entwicklung größer. Gleiches galt für die Expression von IgJ (Abbildung 26). Hier war außerdem bereits am 7. Lebenstag ein signifikanter Unterschied zwischen der mRNA Abundanz von IgJ im Caecum von konventionell gehaltenen und keimfrei gehaltenen Hühnern zu sehen. Der FC an Tag 28 nach dem Schlupf lag hier bei 32. Die Gene der Immunglobuline zeigten also insgesamt ein ähnliches Expressionsmuster.

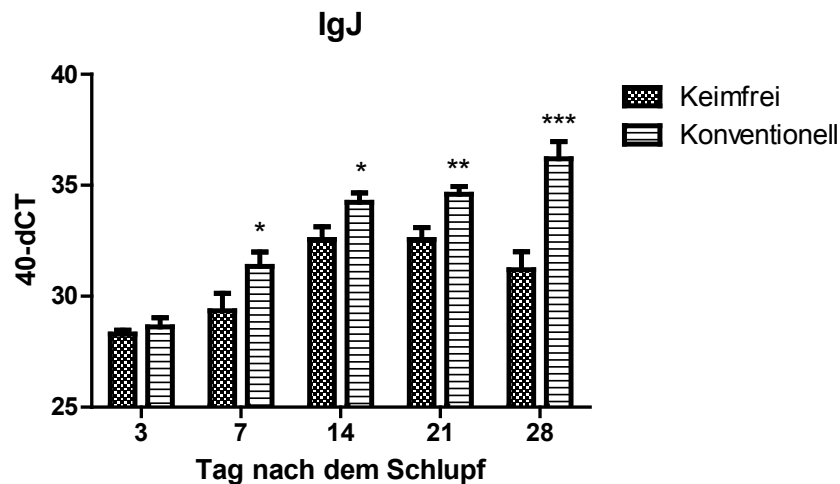


Abbildung 26: Expression von IgJ im Caecum

Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde die mRNA aus dem Caecum von fünf keimfrei gehaltenen (Keimfrei) und vier (Tag 3 und 7) bzw. fünf (Tag 14, 21 und 28) konventionell gehaltenen (Konventionell) Hühnern isoliert und die Expression von IgJ mittels qRT-PCR untersucht. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

Die Expression von PIGR ist in Abbildung 27 dargestellt. Ab Tag 7 nach dem Schlupf konnte zu allen folgenden Untersuchungszeitpunkten eine signifikant höhere Menge an mRNA für PIGR bei der konventionellen Gruppe nachgewiesen werden. In diesem Fall erhöhte sich auch die mRNA Abundanz der Keimfrei-Gruppe im Laufe der ersten Wochen, blieb aber insgesamt auf einem deutlich niedrigeren Niveau, als die der konventionell gehaltenen Tiere.

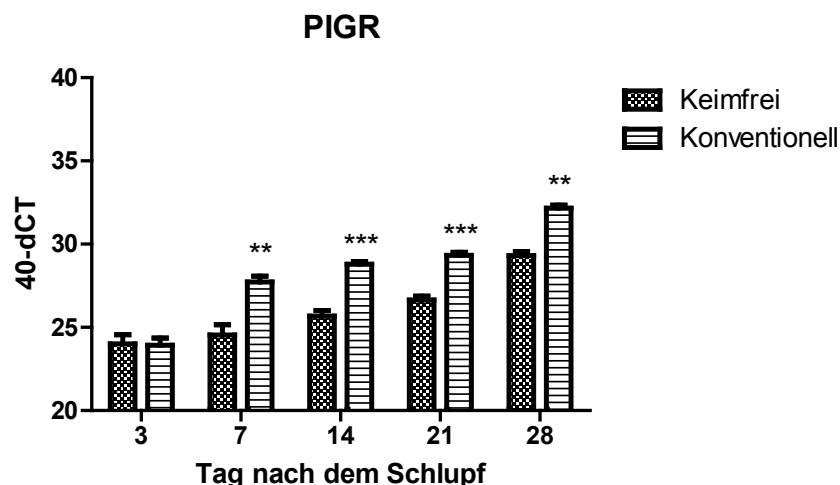


Abbildung 27: Expression von PIGR im Caecum

Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde die mRNA aus dem Caecum von fünf keimfrei gehaltenen (Keimfrei) und vier (Tag 3, 7 und 28) bzw. fünf (Tag 14 und 21) konventionell gehaltenen (Konventionell) Hühnern isoliert und die Expression von PIGR mittels qRT-PCR untersucht. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

Wie in Abbildung 28 zu erkennen ist, konnte für IL21 kein signifikanter Expressionsunterschied zwischen der Keimfrei und der konventionellen Gruppe an Tag 3, 7, 14 und 21 nach dem Schlupf nachgewiesen werden. Erst am 28. Lebenstag wiesen die konventionell gehaltenen Tiere eine signifikant höhere mRNA Abundanz für IL21 auf, als die keimfrei gehaltenen Tiere. Die Expressionshöhe blieb bei beiden Tiergruppen vom dritten bis 21. Lebenstag relativ konstant, wobei dies für die Keimfrei-Gruppe auch für den 28. Lebenstag galt, an dem jedoch die IL21 Expression der konventionellen Tiere deutlich angestiegen war.

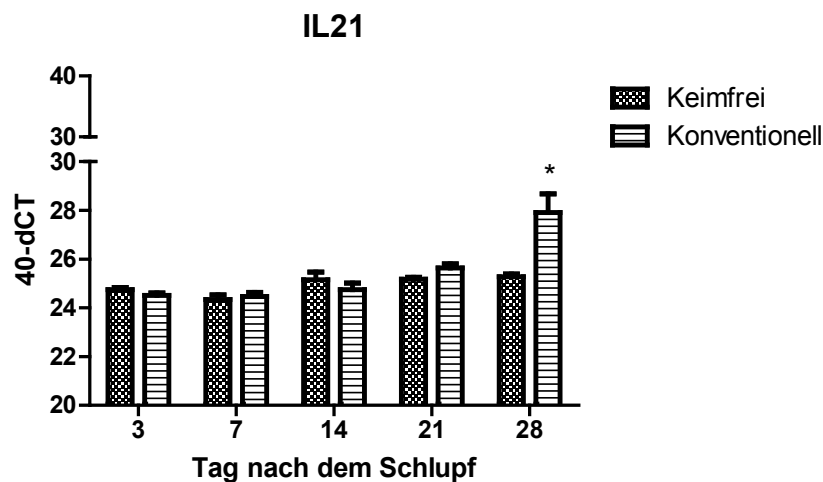


Abbildung 28: Expression von IL21 im Caecum

Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde die mRNA aus dem Caecum von fünf keimfrei gehaltenen (Keimfrei) und vier (Tag 3, 7 und 28) bzw. fünf (Tag 14 und 21) konventionell gehaltenen (Konventionell) Hühnern isoliert und die Expression von IL21 mittels qRT-PCR untersucht. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

Die Untersuchung der Gene CD4, CD8, TGFb, AID, chB6 und TNFRSF13C ergab keine signifikanten Unterschiede in ihrer mRNA Abundanz im Caecum zwischen den beiden Gruppen.

5.3.2 Vergleich der Tiergruppen an Tag 28 nach dem Schlupf

Um die Auswirkung der mikrobiellen Besiedlung mit den gewählten Bakterienstämmen (siehe 4.1.3) auf die Expression der ausgesuchten immunrelevanten Gene (siehe 5.3) zu untersuchen, wurden am 28. Lebenstag die jeweilige mRNA Abundanz in der CT und im Caecum der konventionell gehaltenen, der mono-rekonstituierten und der tetra-rekonstituierten Tiere mittels qRT-PCR ermittelt und mit der gemessenen mRNA Abundanz der keimfrei gehaltenen Hühner verglichen. Daraus ergab sich der Wert der jeweils x-fachen

Genexpression (*fold change*, FC) von mikrobiell kolonisierten im Vergleich zu keimfrei gehaltenen Hühnern.

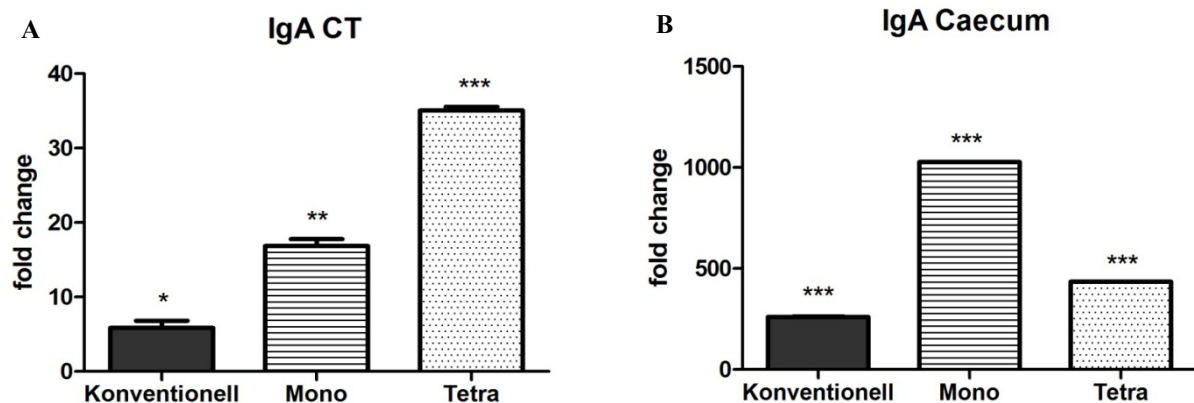


Abbildung 29: Expression von IgA in der CT und im Caecum am 28. Lebenstag

An Tag 28 nach dem Schlupf wurde die mRNA aus der Caecaltonsille (CT) und dem Caecum von keimfrei gehaltenen, konventionell gehaltenen (Konventionell), mono-rekonstituierten (Mono) und tetra-rekonstituierten (Tetra) Hühnern isoliert und die Expression von IgA mittels qRT-PCR untersucht. Dargestellt ist der Expressionsunterschied (*fold change*) bezogen auf den Wert der Expression bei den keimfrei gehaltenen Tieren (=1). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

Die für die Immunglobuline A und Y und für die J-Kette codierenden Gene zeigten in der CT und im Caecum bei allen untersuchten mikrobiell kolonisierten Tiergruppen eine signifikant höhere mRNA Abundanz, als bei den keimfrei gehaltenen Hühnern (Abbildung 29 und Abbildung 30). In der CT wies dabei die Tetra-Gruppe die jeweils höchsten FC-Werte auf, wobei dies im Caecum für die Mono-Gruppe der Fall war. Die größten Unterschiede der Genexpression zwischen keimfrei gehaltenen und mikrobiell kolonisierten Tieren ergaben sich bei der Messung von IgA im Caecum (Abbildung 29 B), mit einer 1024fach erhöhten Expression der mono-rekonstituierten Tiere. In der CT war die Expression von IgA bei den konventionell gehaltenen Tieren 6fach, den mono-rekonstituierten 17fach und den tetra-rekonstituierten 35fach höher als bei der Keimfrei-Gruppe.

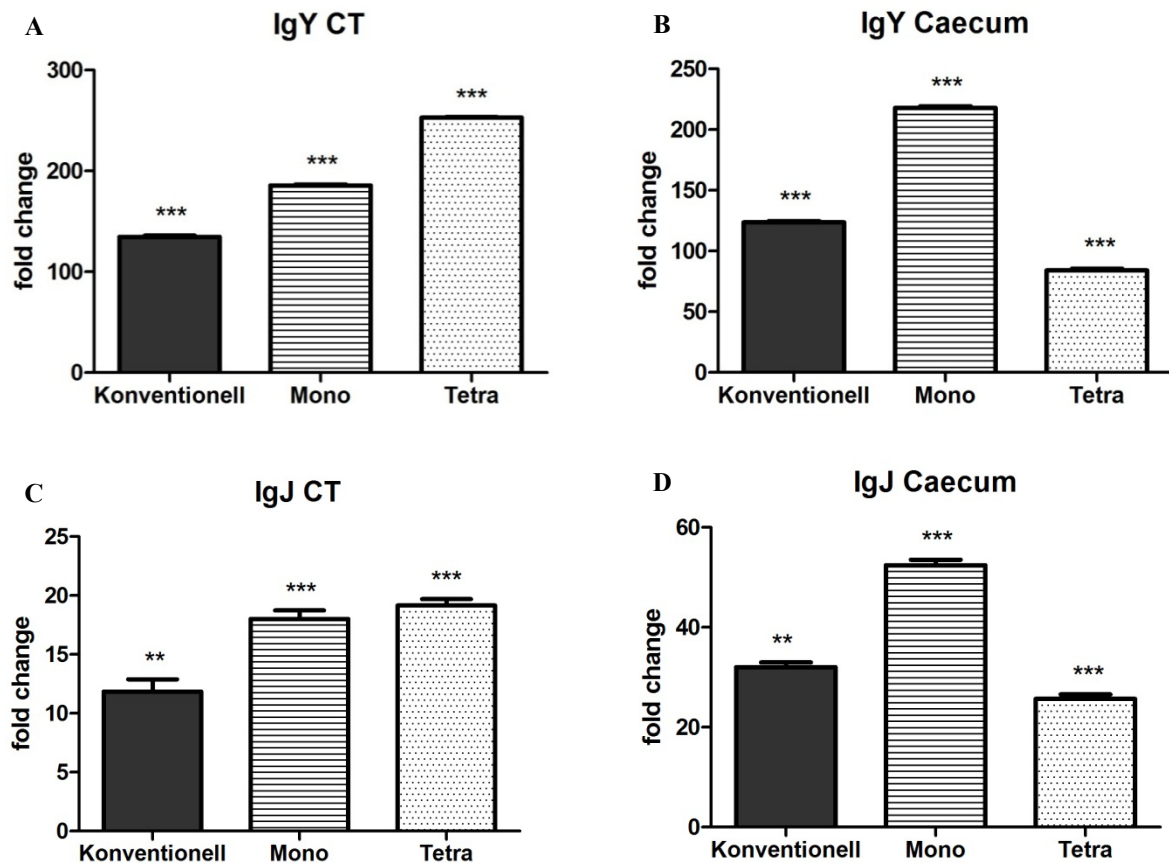


Abbildung 30: Expression von IgY und IgJ in der CT und im Caecum am 28. Lebenstag

An Tag 28 nach dem Schlupf wurde die mRNA aus der Caecaltonsille (CT) und dem Caecum von keimfrei gehaltenen, konventionell gehaltenen (Konventionell), mono-rekonstituierten (Mono) und tetra-rekonstituierten (Tetra) Hühnern isoliert und die Expression von IgY (A, B) und IgJ (C, D) mittels qRT-PCR untersucht. Dargestellt ist der Expressionsunterschied (fold change) bezogen auf den Wert der Expression bei den keimfrei gehaltenen Tieren (=1). ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

Die Anzahl von Transkripten an IgY, verglichen mit denen der Keimfrei-Gruppe, variierten in der CT (Abbildung 30 A) zwischen einer 253fachen Erhöhung bei den tetra-rekonstituierten Tieren und einer 135 mal höheren Menge an mRNA in der CT der konventionell gehaltenen Hühner. Im Caecum war die IgY Expression der mono-rekonstituierten Hühner 218fach stärker und die Expression der Tetra-Gruppe 84fach höher als in der Keimfrei-Gruppe (Abbildung 30 B).

Die Expressionsmuster für IgJ entsprachen denen der anderen Immunglobuline, allerdings mit insgesamt niedrigeren FC-Werten zwischen 12fach in der CT der konventionellen Gruppe (Abbildung 30 C) und 52fach im Caecum der Mono-Gruppe (Abbildung 30 D).

Die mRNA Abundanz für chB6 und BAFF-R wiesen in keinem der untersuchten Gewebe signifikante Unterschiede zwischen den Tiergruppen auf.

Die Gene der B-Lymphozyten-Zytokine BAFF und CD40L und des Chemokin-Rezeptors CXCR5 zeigten nur in der CT von konventionell gehaltenen und tetra-rekonstituierten Tieren signifikante Expressionsunterschiede zu der Keimfrei-Gruppe (Abbildung 31).

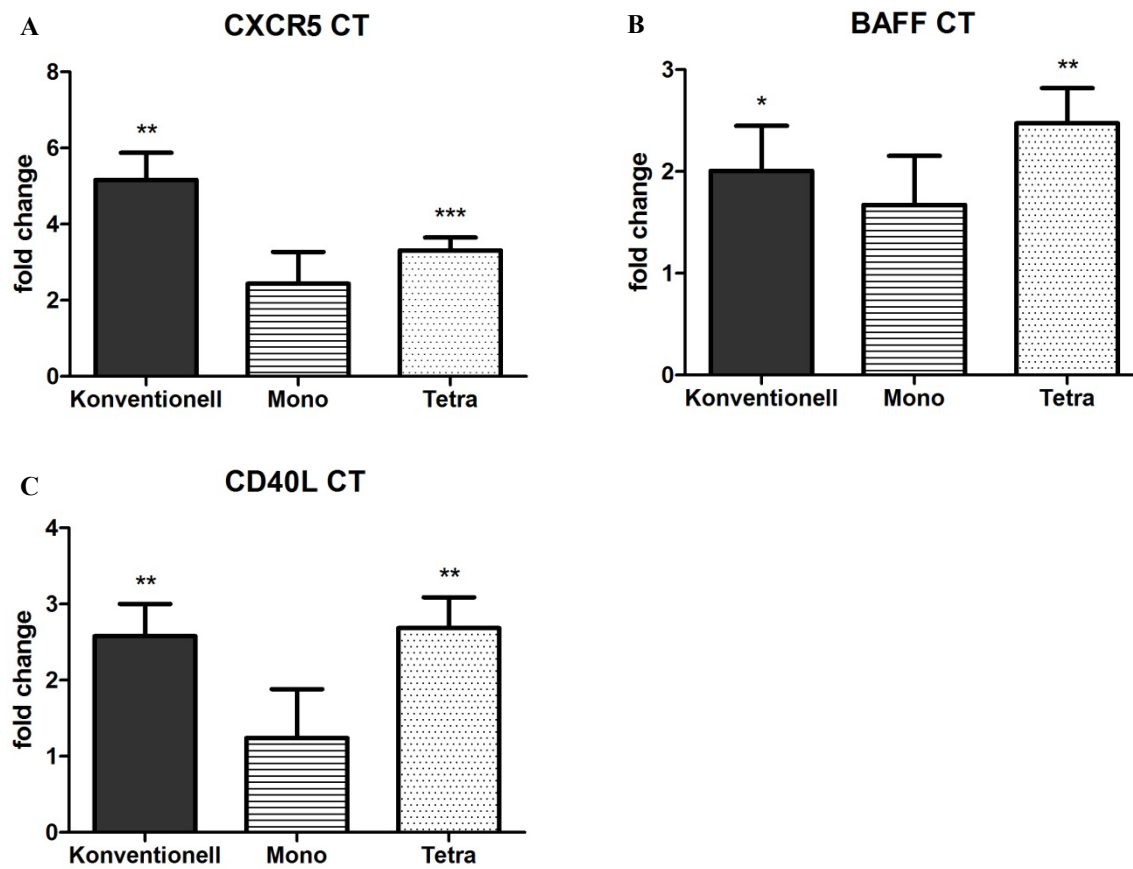


Abbildung 31: Expression von CXCR5, BAFF und CD40L in der CT am 28. Lebenstag

An Tag 28 nach dem Schlupf wurde die mRNA aus der Caecaltonsille (CT) von keimfrei gehaltenen, konventionell gehaltenen (Konventionell), mono-rekonstituierten (Mono) und tetra-rekonstituierten (Tetra) Hühnern isoliert und die Expression von CXCR5 (A), BAFF (B) und CD40L (C) mittels qRT-PCR untersucht. Dargestellt ist der Expressionsunterschied (fold change) bezogen auf den Wert der Expression bei den keimfrei gehaltenen Tieren (=1). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

Die Expression von CXCR5 war mit einer 5fachen Erhöhung im Vergleich zu den keimfrei gehaltenen Tieren bei der konventionellen Gruppe am höchsten, wobei eine etwa gleich große Menge an Transkripten von BAFF (TNFSF13B) und CD40L bei der konventionellen Gruppe und der Tetra-Gruppe gemessen wurde, woraus sich ein FC von 2-3 ergab.

Für PI3K hingegen konnte lediglich im Caecum von konventionell gehaltenen Hühnern eine höhere Menge an mRNA gemessen werden als bei den keimfrei gehaltenen Hühnern (FC = 4) (Abbildung 32).

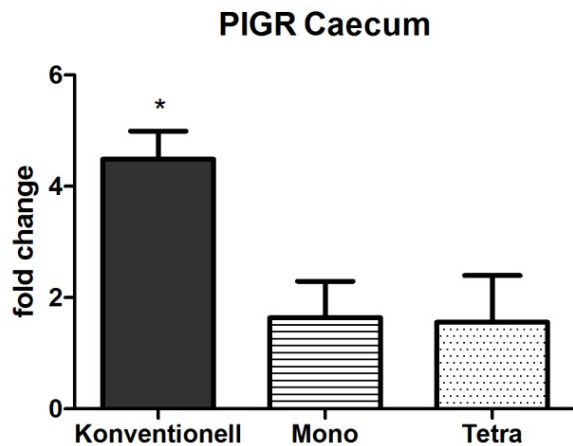


Abbildung 32: Expression von PIGR im Caecum am 28. Lebenstag

An Tag 28 nach dem Schlupf wurde die mRNA aus dem Caecum von keimfrei gehaltenen, konventionell gehaltenen (Konventionell), mono-rekonstituierten (Mono) und tetra-rekonstituierten (Tetra) Hühnern isoliert und die Expression von PIGR mittels qRT-PCR untersucht. Dargestellt ist der Expressionsunterschied (fold change) bezogen auf den Wert der Expression bei den keimfrei gehaltenen Tieren (=1). * $P < 0,05$.

Bei der Untersuchung der für den Immunglobulin-Klassenwechsel und die Affinitätsreifung der Antikörper wichtigen Gene, konnte für TGFb weder im Caecum, noch in der CT ein signifikanter Expressionsunterschied zwischen mikrobiell kolonisierten und keimfrei gehaltenen Hühnern nachgewiesen werden. Aus Abbildung 33 wird ersichtlich, dass AID in der CT in allen drei mikrobiell kolonisierten Gruppen hoch reguliert wurde, wobei dies im Caecum nur bei der Tetra-Gruppe der Fall war (FC 2). Obwohl hier bei der konventionellen Gruppe ein FC von 3 vorlag, konnte auf Grund der hohen Standardabweichung keine Signifikanz für diese Tiergruppe errechnet werden (Abbildung 33 B). In der CT war die Expression von AID in der konventionellen Gruppe und der Tetra-Gruppe etwa gleich hoch, mit einer etwa 15fach höheren mRNA Abundanz als bei den keimfrei gehaltenen Tieren, wobei der FC der Mono-Gruppe nur bei 6 lag (Abbildung 33 A).

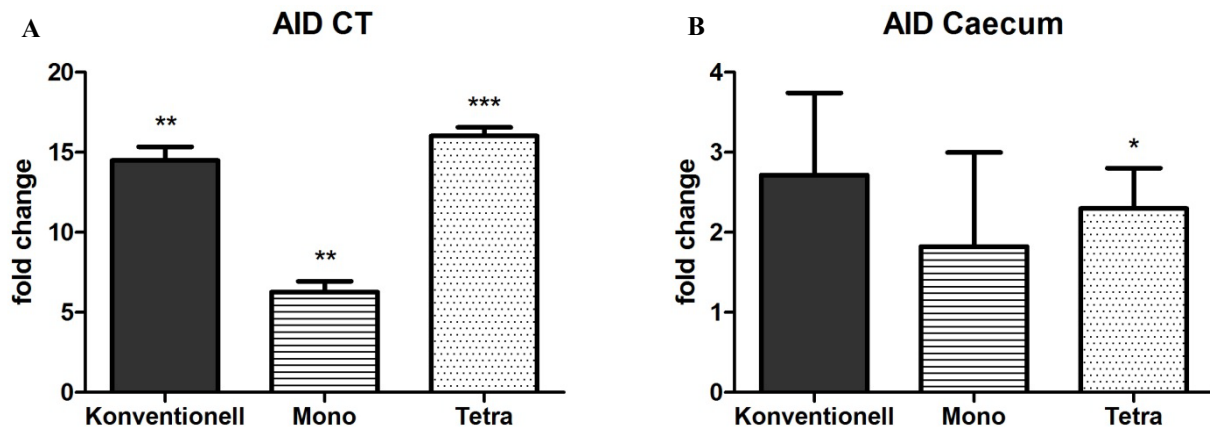


Abbildung 33: Expression von AID in der CT und im Caecum am 28. Lebenstag

An Tag 28 nach dem Schlupf wurde die mRNA aus der Caecaltonsille (CT) und dem Caecum von keimfrei gehaltenen, konventionell gehaltenen (Konventionell), mono-rekonstituierten (Mono) und tetra-rekonstituierten (Tetra) Hühnern isoliert und die Expression von AID mittels qRT-PCR untersucht. Dargestellt ist der Expressionsunterschied (fold change) bezogen auf den Wert der Expression bei den keimfrei gehaltenen Tieren (=1). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

Eine im Vergleich mit der Keimfrei-Gruppe signifikant höhere Expression von IL1b und IL6 konnte erneut nur in der CT nachgewiesen werden, wobei IL1b nur in der Tetra-Gruppe signifikant höher exprimiert wurde (FC 5) (Abbildung 34 A). IL6 wurde in der Tetra-Gruppe massiv hoch reguliert, mit einer 54fachen Expression verglichen mit den keimfrei gehaltenen Hühnern. In der konventionellen Gruppe lag der FC für IL6 nur bei 4, wobei IL6 in der Mono-Gruppe 10fach hoch reguliert war (Abbildung 34 B).

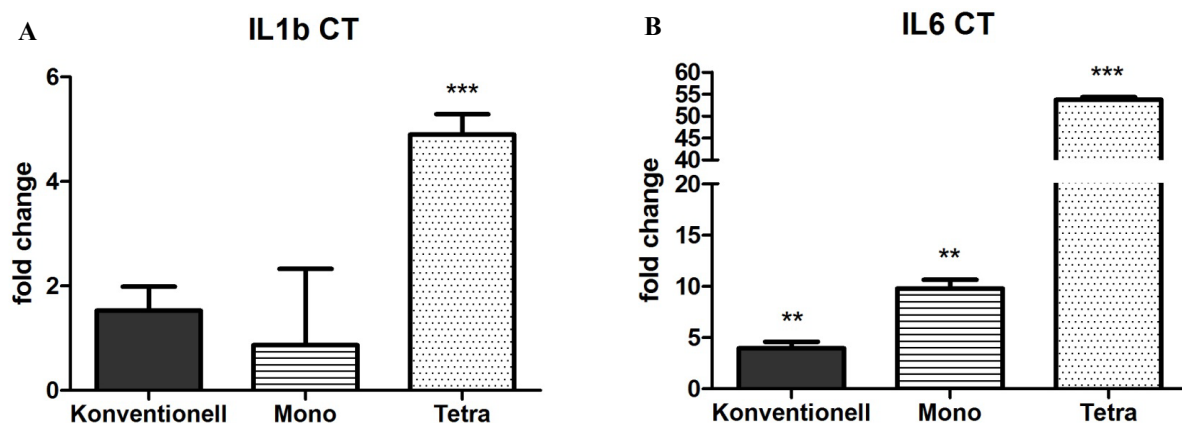


Abbildung 34: Expression von IL1b und IL6 in der CT am 28. Lebenstag

An Tag 28 nach dem Schlupf wurde die mRNA aus der Caecaltonsille (CT) von keimfrei gehaltenen, konventionell gehaltenen (Konventionell), mono-rekonstituierten (Mono) und tetra-rekonstituierten (Tetra) Hühnern isoliert und die Expression von IL1b und IL6 mittels qRT-PCR untersucht. Dargestellt ist der Expressionsunterschied (fold change) bezogen auf den Wert der Expression bei den keimfrei gehaltenen Tieren (=1). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

Aus Abbildung 35 wird ersichtlich, dass in der CT von allen drei mikrobiell kolonisierten Tiergruppen signifikant höhere Mengen an mRNA für IL21, als bei der Keimfrei-Gruppe nachgewiesen werden konnten (Abbildung 35 A). In der Tetra-Gruppe war IL21 130fach hochreguliert. Bei der konventionellen Gruppe lag ein FC von 68, bei der Mono-Gruppe ein FC von 38 vor. Im Caecum war IL21 bei den konventionell gehaltenen und den tetra-rekonstituierten Tieren 4fach höher exprimiert, als in der Keimfrei-Gruppe. In der Mono-Gruppe konnte kein signifikanter Expressionsunterschied im Caecum festgestellt werden (Abbildung 35 B).

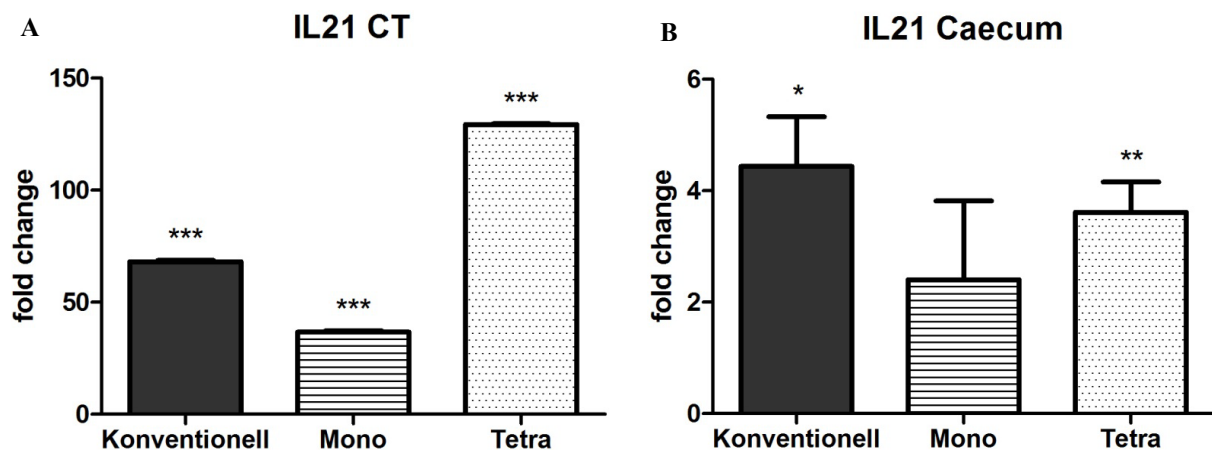


Abbildung 35: Expression von IL21 in der CT und im Caecum am 28. Lebenstag

An Tag 28 nach dem Schlupf wurde die mRNA aus der Caecaltonsille (CT) und dem Caecum von keimfrei gehaltenen, konventionell gehaltenen (Konventionell), mono-rekonstituierten (Mono) und tetra-rekonstituierten (Tetra) Hühnern isoliert und die Expression von IL21 mittels qRT-PCR untersucht. Dargestellt ist der Expressionsunterschied (fold change) bezogen auf den Wert der Expression bei den keimfrei gehaltenen Tieren (=1). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

Die für T-Lymphozyten spezifischen Gene CD4 und CD8 waren wiederum einzig in der CT von tetra-rekonstituierten Hühnern höher exprimiert als bei keimfrei gehaltenen Tieren. CD4 wies dabei eine doppelt so hohe und CD8 eine 3fach höhere mRNA Abundanz auf (Abbildung 36).

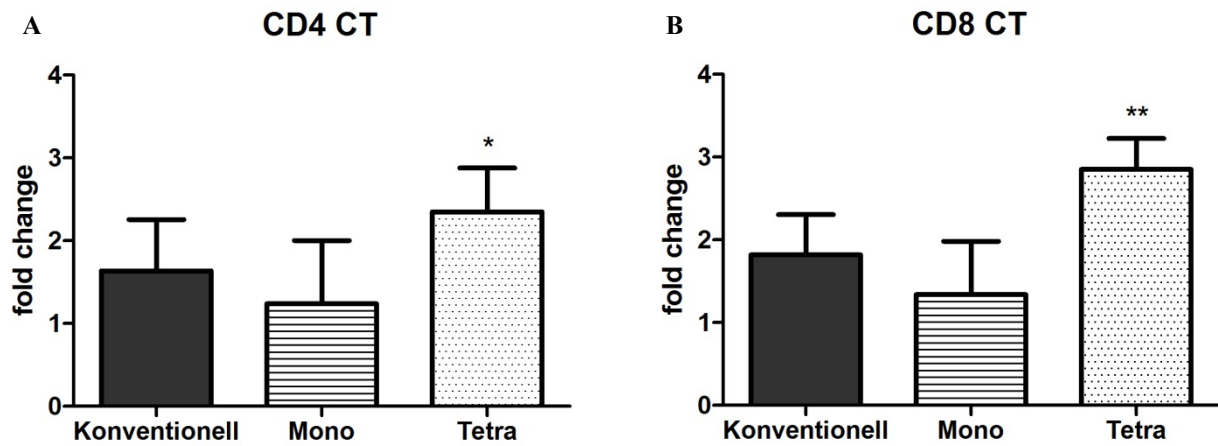


Abbildung 36: Expression von CD4 und CD8 in der CT am 28. Lebenstag

An Tag 28 nach dem Schlupf wurde die mRNA aus der Caecaltonsille (CT) von keimfrei gehaltenen, konventionell gehaltenen (Konventionell), mono-rekonstituierten (Mono) und tetra-rekonstituierten (Tetra) Hühnern isoliert und die Expression von CD4 (A) und CD8 (B) mittels qRT-PCR untersucht. Dargestellt ist der Expressionsunterschied (fold change) bezogen auf den Wert der Expression bei den keimfrei gehaltenen Tieren (=1). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

5.4 IMMUNGLOBULINQUANTIFZIERUNG

Um die Immunantwort der mikrobiell kolonisierten und der keimfrei gehaltenen Tiere auf Protein-Ebene zu vergleichen und eine Verbindung zum systemischen Immunsystem herzustellen, wurden Immunglobuline der untersuchten Tiere in Plasma, Gallenflüssigkeit und Caecuminhalt zu verschiedenen Zeitpunkten nach dem Schlupf mittels ELISA quantifiziert. Dabei wurden zum einen die Gesamt-Immunglobuline bestimmt und zum anderen Immunglobuline, die für zwei der bei der Rekonstitution verwendeten Bakterienstämme spezifisch waren: *E. coli* Nissle 1917 und *Enterococcus faecium* DSM 7134.

5.4.1 Gesamt-Immunglobulinbestimmung im Plasma

Zur Bestimmung der Menge an IgA, IgM und IgY wurden an Tag 7, 14, 21 und 28 nach dem Schlupf von keimfrei gehaltenen, mono-rekonstituierten und konventionell gehaltenen Hühnern Plasmaproben gewonnen und mittels ELISA untersucht.

Aus Abbildung 37 wird ersichtlich, dass signifikante Unterschiede zwischen den IgA- und IgM-Plasmaspiegeln von keimfrei gehaltenen und mikrobiell kolonisierten Hühnern bestehen. Die Plasmaspiegel von IgA und IgM stiegen in den ersten Lebenswochen in allen drei Gruppen stetig an. Für IgA konnten bereits am 7. Lebenstag signifikant höhere IgA-Konzentrationen bei konventionell gehaltenen und mono-rekonstituierten Tieren als bei keimfrei gehaltenen Hühnern gemessen werden. Dies war auch an Tag 14 und 21 nach dem Schlupf der Fall. Am 28. Lebenstag konnte aufgrund der hohen Standardabweichung in der konventionellen Gruppe, nur für die mono-rekonstituierten Hühner ein signifikant höherer IgA-Plasmaspiegel als bei den keimfrei gehaltenen Tieren nachgewiesen werden (Abbildung 37 A). Die IgM-Konzentrationen waren an Tag 7 bei der konventionellen und der Mono-Gruppe, an Tag 14 bei der konventionellen Gruppe und an Tag 28 bei der Mono-Gruppe signifikant höher als bei den keimfrei gehaltenen Hühnern (Abbildung 37 B). Bis zum Tag 28 nach dem Schlupf konnten für IgY keine Unterschiede festgestellt werden, da in allen untersuchten Tiergruppen nach dem Schlupf zunächst hohe maternale IgY-Konzentrationen vorlagen und nur geringe Mengen von endogenem IgY produziert wurden (Abbildung 37 C).

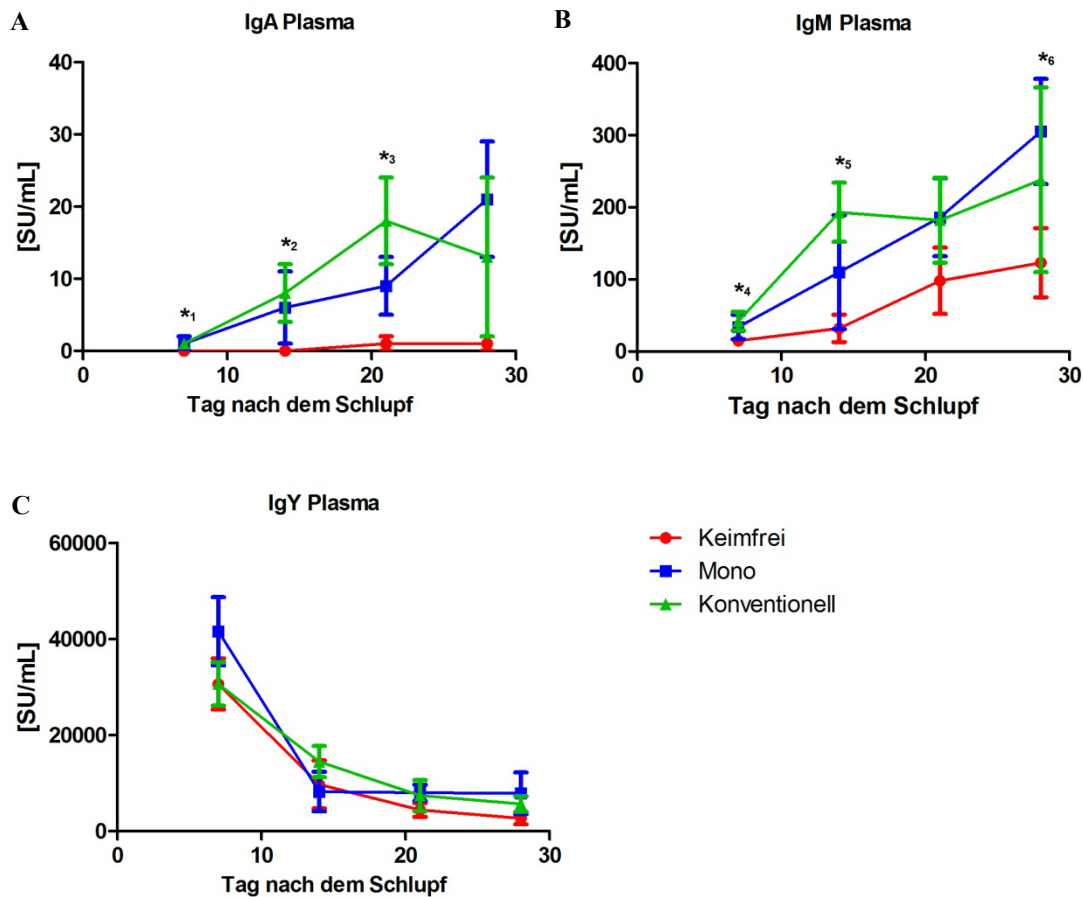


Abbildung 37: Immunglobulinbestimmung Tag 7 bis 28 nach dem Schlupf

An Tag 7, 14, 21 und 28 nach dem Schlupf wurden von keimfrei gehaltenen (Keimfrei), mono-rekonstituierten (Mono) und konventionell gehaltenen Hühnern (Konventionell) Plasmaproben gewonnen und mittels ELISA die Menge an IgA (A), IgM (B) und IgY (C) bestimmt. Keimfrei $n=5$, Mono $n=5$ (Tag 7 und 14) bzw. 4 (Tag 21 und 28), Konventionell $n=5$. Dargestellt sind die anhand eines internen Laborstandards errechneten Standardeinheiten (SU) pro ml.

*1: Keimfrei < Konventionell $P = 0,015$ und Keimfrei < Mono $P = 0,007$; *2: Keimfrei < Konventionell/Mono $P = 0,007$; *3: Keimfrei < Konventionell $P = 0,007$ und Keimfrei < Konventionell $P = 0,015$; *4: Keimfrei < Konventionell $P = 0,007$ und Keimfrei < Mono $P = 0,007$; *5: Keimfrei < Konventionell $P = 0,007$; *6: Keimfrei < Mono $P = 0,003$.

Um den Immunglobulingehalt des Plasmas an Tag 55 nach dem Schlupf zu bestimmen, wurden von keimfrei gehaltenen, tetra-rekonstituierten und konventionell gehaltenen Hühnern Plasmaproben gewonnen und die Immunglobulin-Titer mittels ELISA ermittelt (Abbildung 38).

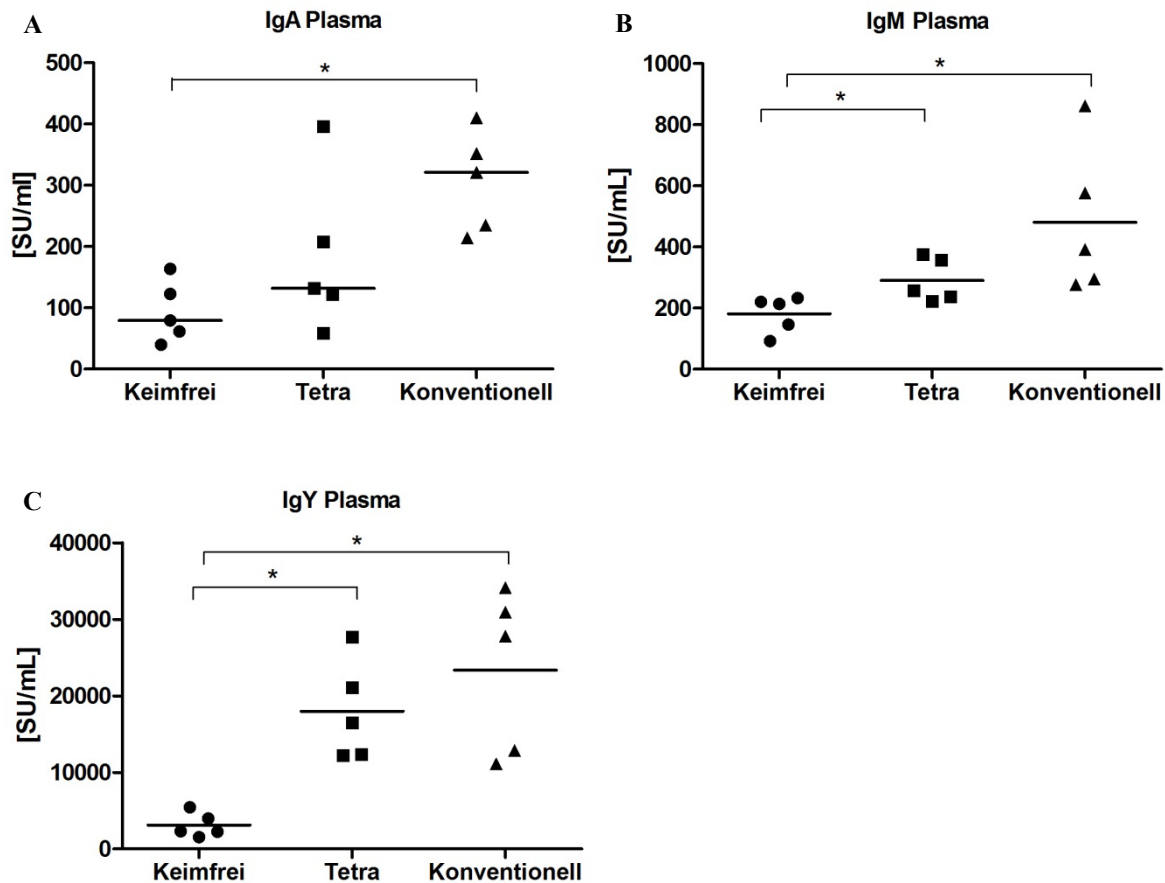


Abbildung 38: Immunglobulinbestimmung an Tag 55 nach dem Schlupf

An Tag 55 nach dem Schlupf wurden von keimfrei gehaltenen (Keimfrei), tetra-rekonstituierten (Tetra) und konventionell gehaltenen Hühnern (Konventionell) Plasmaproben gewonnen und mittels ELISA die Menge an IgA (A), IgM (B) und IgY (C) bestimmt. Dargestellt sind die mittels eines internen Laborstandards errechneten Standardeinheiten (SU) pro ml in den untersuchten Proben und der Median der jeweiligen Tiergruppe. $n = 5$, $*P < 0,02$

Am 55. Lebenstag konnte für IgA, IgM und IgY ein signifikant höherer Plasmaspiegel bei konventionell gehaltenen Hühnern als bei keimfrei gehaltenen Hühnern gemessen werden (Abbildung 38 A-C). Bei den tetra-rekonstituierten Tieren waren im Vergleich zu den keimfrei gehaltenen Tieren an Tag 55 nach dem Schlupf signifikant höhere IgM- und IgY-Spiegel im Plasma zu messen. Auf Grund der großen Streuung innerhalb der Tetra-Gruppe konnte für IgA in diesem Vergleich kein signifikantes Ergebnis berechnet werden (Abbildung 38 A).

Insgesamt fiel bei diesen Untersuchungen auf, dass insbesondere bei den mikrobiell kolonisierten Gruppen deutliche Unterschiede zwischen den Immunglobulin-Konzentrationen der Einzeltiere innerhalb einer Tiergruppe vorlagen.

5.4.3 Bestimmung von *E.coli* Nissle 1917 spezifischen Immunglobulinen

Um herauszufinden, ob bei den rekonstituierten Tieren eine spezifische Immunantwort gegen die verabreichten Bakterien stattgefunden hat, wurden das Plasma, die Gallenflüssigkeit und Inhalt des Caecums von allen Tiergruppen mittels ELISA auf *E.coli* Nissle 1917 (EcN) spezifische Immunglobuline überprüft. Zunächst sollten diesbezüglich die keimfrei gehaltenen und die mono-rekonstituierten Tiere im Verlauf der ersten Wochen anhand der IgA-Plasmaspiegel miteinander verglichen werden.

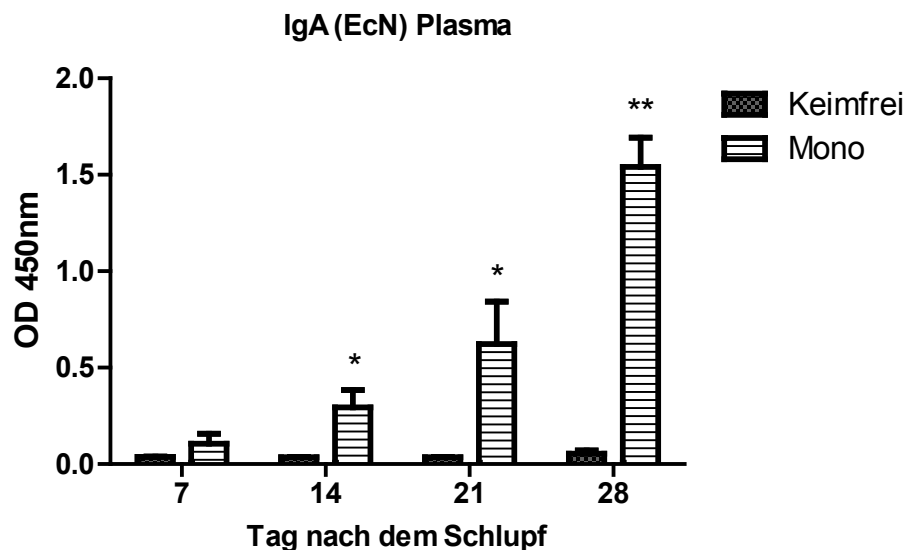


Abbildung 40: *E.coli* Nissle 1917 spezifisches Immunglobulin A im Plasma

Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden *E.coli* Nissle 1917 spezifische IgA-Plasmaspiegel von keimfrei gehaltenen (Keimfrei) und mono-rekonstituierten (Mono) Hühnern mittels ELISA bestimmt. Dargestellt ist die optische Dichte (OD) bei 450nm. Keimfrei n = 5, Mono n = 5 (Tag 7 und 14) bzw. 4 (Tag 21 und 28). * P < 0,05; ** P < 0,01

Aus Abbildung 40 wird deutlich, dass die Mono-Rekonstitution mit EcN eine spezifische Immunantwort ausgelöst hat. So konnte bei der Mono-Gruppe ab dem 14. Lebenstag signifikant erhöhte Plasmaspiegel von EcN spezifischem IgA festgestellt werden. Die Plasmaspiegel von EcN spezifischem IgA bei keimfrei gehaltenen Hühnern blieben über die ersten 4 Lebenswochen auf basalem Niveau, wohingegen es bei den mono-rekonstituierten Tieren zu einem stetigen Anstieg kam.

Als nächstes sollte die Menge an EcN spezifischem IgA und IgY im Plasma, der Gallenflüssigkeit und im Inhalt des Caecums zwischen den untersuchten Tiergruppen verglichen werden (Abbildung 41). Dabei ergaben sich für IgA und IgY vergleichbare Ergebnisse. Die Mono-Rekonstitution mit EcN führte zu den höchsten

Immunglobulinspiegeln im Plasma, mit signifikant höheren Immunglobulin-Konzentrationen als bei keimfrei und konventionell gehaltenen Hühnern an Tag 28 nach dem Schlupf (Abbildung 41 A und C). Die Tetra-Rekonstitution löste ebenfalls die Bildung von EcN spezifischen Immunglobulinen aus, wenn auch in geringerer Konzentration als die Mono-Rekonstitution. Hier ergaben sich am 55. Lebenstag signifikante Unterschiede zu der Keimfrei-Gruppe. In der konventionellen Gruppe konnten erst an Tag 55 nach dem Schlupf geringe Mengen an EcN spezifischen Immunglobulinen festgestellt werden (Abbildung 41 B und D).

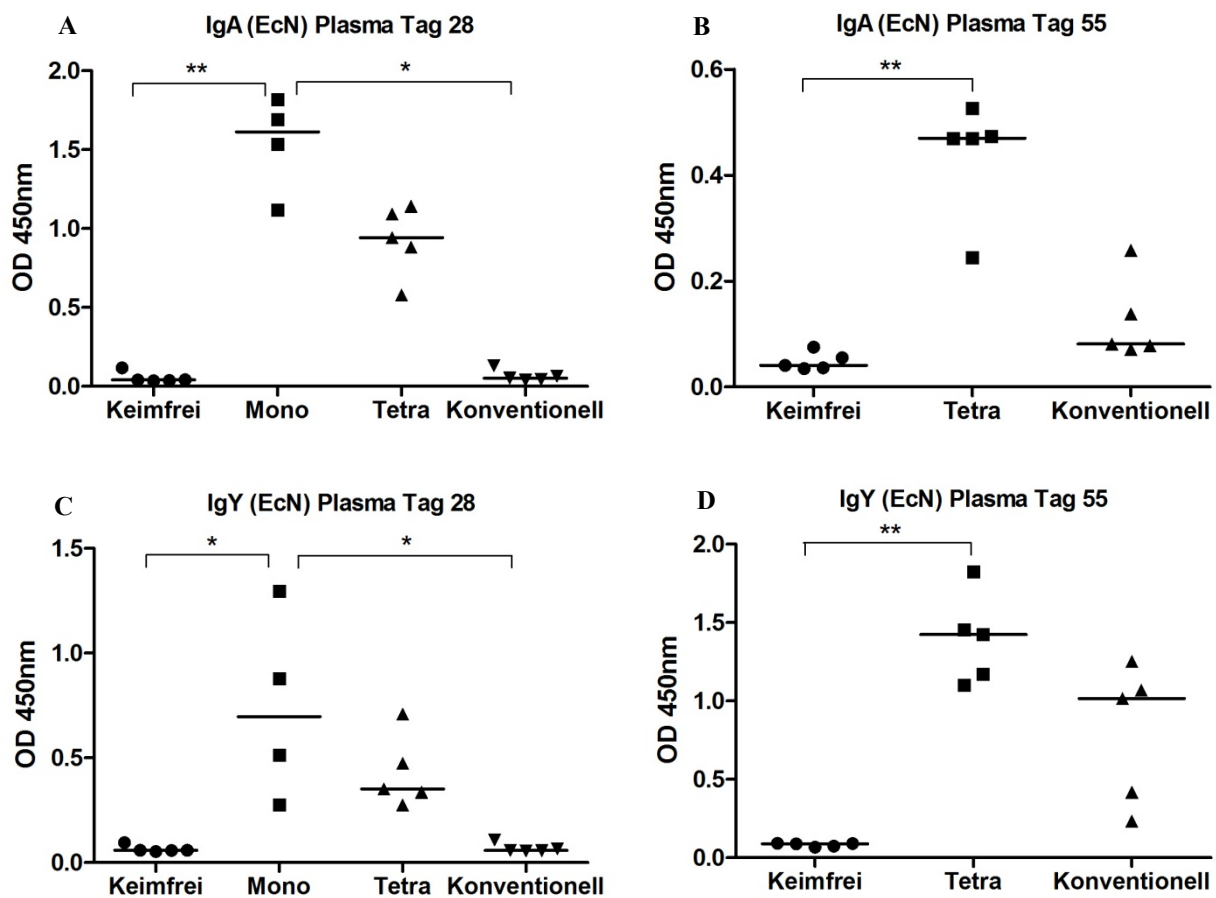


Abbildung 41: *E.coli* Nissle 1917 spezifische Immunglobuline im Plasma

Zu den angegebenen Zeitpunkten nach dem Schlupf wurden *E.coli* Nissle 1917 spezifische IgA- und IgY-Plasmaspiegel von keimfrei gehaltenen (Keimfrei), tetra-rekonstituierten (Tetra) und mono-rekonstituierten (Mono) Hühnern mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind die optische Dichte (OD) der untersuchten Proben bei 450nm und der Median der jeweiligen Tiergruppe. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$

Des Weiteren sollten die EcN spezifischen IgA-Spiegel in der Gallenflüssigkeit und dem Inhalt des Caecums bestimmt werden (Abbildung 42). Diese verhielten sich analog zu den Ergebnissen des Plasmas. Ein signifikanter Unterschied zwischen der Mono-Gruppe und der

konventionellen Gruppe konnte vermutlich auf Grund der geringen Anzahl an Stichproben (vier Tiere/Gruppe) nicht berechnet werden. Wie schon bei den Gesamt-Immunglobulinmessungen gesehen, war im Caecuminhalt deutlich weniger EcN spezifisches IgA als in der Galle vorhanden.

Insgesamt ergab sich bei dieser Untersuchung erneut eine deutliche Streuung der Einzeltielergebnisse innerhalb der mikrobiell kolonisierten Gruppen.

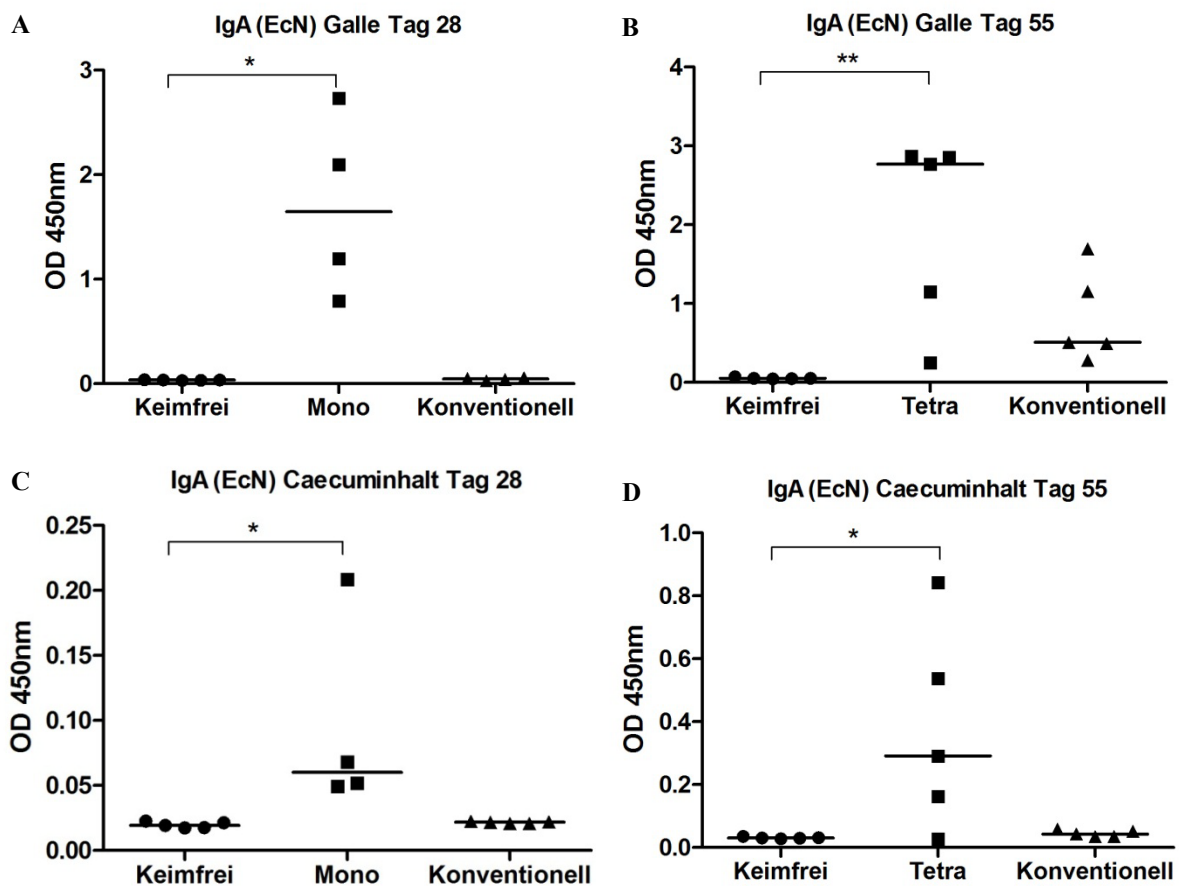


Abbildung 42: *E.coli* Nissle 1917 spezifische Immunglobuline in Galle und Caecuminhalt

Zu den angegebenen Zeitpunkten nach dem Schlupf wurden *E.coli* Nissle 1917 spezifische IgA- und IgY-Spiegel in der Gallenflüssigkeit und dem Inhalt des Caecums von keimfrei gehaltenen (Keimfrei), mono-rekonstituierten (Mono), tetra-rekonstituierten (Tetra) und konventionell gehaltenen (Konventionell) Hühnern mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind die optische Dichte (OD) der untersuchten Proben bei 450nm und der Median der jeweiligen Tiergruppe. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$

5.4.4 Bestimmung von *Enterococcus faecium* spezifischen Immunglobulinen

Um die Immunogenität des bei der Tetra-Rekonstitution verwendeten *Enterococcus faecium* DSM 7134 Stammes zu untersuchen, sollten auch für diesen Bakterienstamm spezifische Immunglobuline im Plasma, der Gallenflüssigkeit und dem Inhalt des Caecums der untersuchten Tiere mittels ELISA gemessen werden.

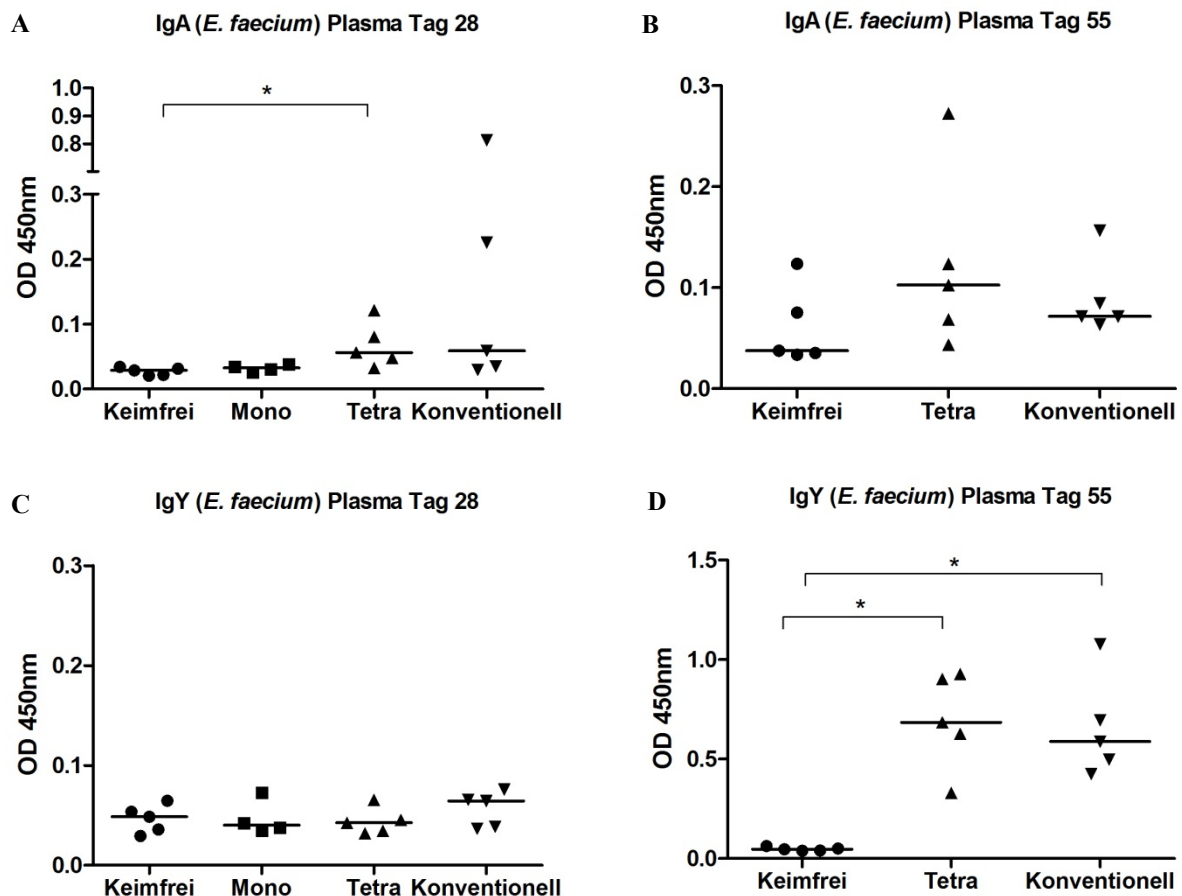


Abbildung 43: *Enterococcus faecium* spezifische Immunglobuline im Plasma

Zu den angegebenen Zeitpunkten nach dem Schlupf wurden *Enterococcus faecium* DSM 7134 spezifische IgA- und IgY-Plasmaspiegel von keimfrei gehaltenen (Keimfrei), mono-rekonstituierten (Mono), tetra-rekonstituierten (Tetra) und konventionell gehaltenen (Konventionell) Hühnern mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind die optische Dichte (OD) der untersuchten Proben bei 450nm und der Median der jeweiligen Tiergruppe. * $P < 0,05$

Wie in Abbildung 43 zu erkennen ist, haben die tetra-rekonstituierten Hühner am 28. Lebenstag eine signifikant höhere Menge an gegen *Enterococcus faecium* gerichtetem IgA im Plasma als gleichaltrige keimfrei gehaltene Hühner. In der konventionellen Gruppe fielen

zwei Tiere auf, die zu diesem Zeitpunkt deutlich mehr *Enterococcus faecium* spezifisches IgA im Plasma aufwiesen als die restlichen Tiere innerhalb der Gruppe (Abbildung 43 A). Für IgY konnten im Plasma an Tag 28 nach dem Schlupf keine Unterschiede zwischen den Tiergruppen festgestellt werden. Alle Werte blieben hier auf einem sehr niedrigen Niveau (Abbildung 43 C).

An Tag 55 nach dem Schlupf ergab die Messung von *Enterococcus faecium* spezifischem IgA keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen, obwohl die Werte für die Tetra-Gruppe im Durchschnitt höher waren als in den anderen beiden Gruppen. Innerhalb der untersuchten Gruppen gab es deutliche Unterschiede zwischen Messwerten der Einzeltiere (Abbildung 43 B). An Tag 55 haben jedoch sowohl die tetra-rekonstituierten als auch die konventionell gehaltenen Tiere eine signifikant höhere Menge an *Enterococcus faecium* spezifischem IgY produziert als die keimfrei gehaltenen Tiere (Abbildung 43 D).

In Abbildung 44 sind die *Enterococcus faecium* spezifischen IgA-Spiegel in der Gallenflüssigkeit und dem Inhalt des Caecums dargestellt. An Tag 28 nach dem Schlupf wies die Galle und der Caecuminhalt, mit Ausnahme eines konventionell gehaltenen Tieres, basale Werte an IgA und IgY auf (Abbildung 44 A und C). Bei 55 Tage alten Tieren lagen für Galle und Caecuminhalt erneut große Streuungen in der Tetra-Gruppe und der konventionellen Gruppe vor, während die Werte der keimfrei gehaltenen Tiere einheitlich niedrig waren. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen konnte nicht berechnet werden, obwohl der Median der Tetra-Gruppe deutlich über dem der Keimfrei-Gruppe und der konventionellen Gruppe lag (Abbildung 44 B und D).

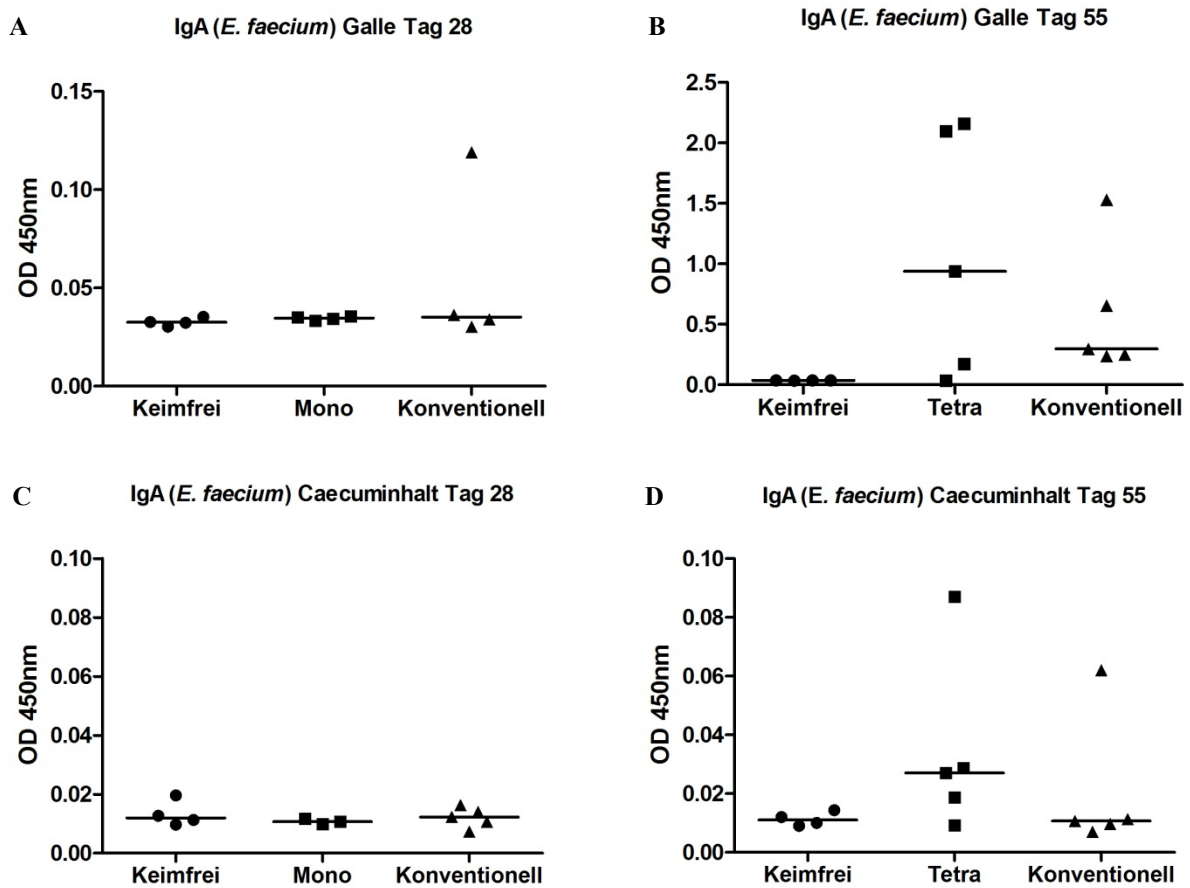


Abbildung 44: *Enterococcus faecium* spezifische Immunglobuline in Galle und Caecuminhalt

Zu den angegebenen Zeitpunkten nach dem Schlupf wurden *Enterococcus faecium* DSM 7134 spezifische IgA- und IgY-Spiegel in der Gallenflüssigkeit und dem Inhalt des Caecums von keimfrei gehaltenen (Keimfrei), tetra-rekonstituierten (Tetra) und mono-rekonstituierten (Mono) Hühnern mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind die gemessene optische Dichte (OD) der untersuchten Proben bei 450nm und der Median der jeweiligen Tiergruppe.

6. DISKUSSION

Die Verwendung von Antibiotika in der Geflügelhaltung und die Forderung diese durch geeignete Maßnahmen zu reduzieren wird derzeit intensiv diskutiert [225-227]. Für die Gesunderhaltung der Nutztierpopulationen spielt das Darmimmunsystem eine kritische Rolle. Seine Entwicklung wird, wie aus zahlreichen Untersuchungen an Mausmodellen bekannt, maßgeblich von der Darmflora beeinflusst [2, 228, 229]. Ob dies auch für unsere Nutztiere, insbesondere das Huhn gilt und welche Rolle dabei einzelne Mikroorganismen spielen ist noch weitgehend unklar. Die Beantwortung dieser Frage kann aber weitreichende Konsequenzen haben, da eine beeinträchtigte Darmflora bei Küken eine verzögerte bzw. inadäquate Entwicklung des Abwehrsystems, damit eine erhöhte Anfälligkeit für Infektionen und als Konsequenz einen erhöhten Verbrauch an Antibiotika nach sich ziehen würde.

Für das Huhn als eines der wichtigsten lebensmittelliefernden Tiere weltweit ist diese Fragestellung besonders relevant, da der Nachwuchs in der Geflügelproduktion bereits vor dem Schlupf vom Muttertier getrennt wird und so die natürliche mikrobielle Besiedlung des Kükens, welche normalerweise durch den engen Kontakt zum Muttertier geprägt ist, unterbunden wird.

Erste vergleichende Analysen von keimfreien und mikrobiell kolonisierten Hühnern liegen zwar bereits 60 Jahre zurück [5, 8], jedoch haben sich in der Zwischenzeit die Untersuchungsmethoden weiterentwickelt und die in den letzten Jahrzehnten gewonnenen Erkenntnisse verhelfen zu einer besseren Interpretation der heutigen Ergebnisse. Auch Untersuchungen von keimfrei gehaltenen Mäusen wurden bereits vor 50 Jahren durchgeführt [230]. Im letzten Jahrzehnt wurde die Keimfreihaltung als methodischer Ansatz in gewisser Weise wiederentdeckt, da bekannt wurde was für eine große Bedeutung das Mikrobiom für die Gesundheit von Mensch und Tier hat.

Zur Beantwortung der oben genannten Fragestellung sollten in dieser Arbeit anhand von keimfrei gehaltenen und gnotobiotischen Hühnern zum einen der Einfluss der gesamten Darmflora, zum anderen gezielt der Einfluss einzelner ausgewählter Mikroorganismen auf die Entwicklung des darmassoziierten lymphatischen Gewebes des Huhns untersucht werden. Der Vergleich von keimfrei gehaltenen und konventionell gehaltenen Tieren ist ein relativ einfacher und häufig gewählter Ansatz [5, 8, 10, 150, 231]. Die Rolle einzelner Vertreter der Mikrobiota vollständig zu untersuchen gestaltet sich in Anbetracht der Zahl der Bakterienspezies als fast unmöglich. Daher wurden in dieser Arbeit vier Bakterienstämme ausgewählt, die näher betrachtet werden und damit gemeinsam mit weiteren Untersuchungen

zu einem besseren Verständnis der Wirt-Mikrobiota Interaktion führen sollten. Diese vier Mikroorganismen (*E. coli* Nissle 1917, *Enterococcus faecium* DSM 7134, *Lactobacillus rhamnosus* DSM 7133, *Clostridium butyricum* DSM 10702) wurden ausgewählt, da sie als probiotische Bakterien bereits verwendet wurden und daher als unbedenklich für den Wirt gelten [135, 184, 195]. Des Weiteren sind diese Keime in der Lage einen sterilen Darm effektiv zu kolonisieren [163, 185, 232-234], was nicht für alle Vertreter der Mikrobiota zutrifft. Viele dieser Mikroorganismen benötigen eine Begleitflora zur Wegbereitung, um sich im Darm ansiedeln zu können.

Um beurteilen zu können welchen Einfluss die verschiedenen mikrobiellen Kolonisierungsformen (Keimfrei, Konventionell, mono-rekonstituiert mit *E. coli* Nissle, tetra-rekonstituiert mit vier Bakterien) auf die Entwicklung des Darmimmunsystems des Huhns haben, wurden folgende analytische Ansätze ausgewählt: 1. die morphologische Analyse des darmassoziierten lymphatischen Gewebes durch immunhistologische Untersuchungen verschiedener Darmabschnitte. 2. Genexpressionsanalysen, welche zunächst holistisch (Microarrays) und in der Folge hypothesengetrieben (qRT-PCR) durchgeführt wurden. Und 3. die Quantifizierung funktioneller Immunparameter, anhand der Immunglobulinbildung.

6.1 MORPHOLOGISCHE ANALYSE

Über die letzten 30 Jahre sind viele monoklonale Antikörper (mAK) entwickelt worden, die für verschiedene Zellen des Huhns spezifisch sind [202-209]. Im Rahmen dieser Arbeit ist von den wichtigsten mAK gegen Immunzellen Gebrauch gemacht worden, um die Zellverteilung im Darm der verschiedenen Tiergruppen zu untersuchen. Dazu sind Kryoschnitte des Jejunums, des Caecums, der Caecaltonsille und des Colons immunhistologisch angefärbt worden. Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigten deutliche Unterschiede zwischen den keimfrei gehaltenen und den mikrobiell kolonisierten Tieren, wobei der Phänotyp der mono-rekonstituierten Tiere dem der keimfrei gehaltenen und die Zellverteilung der tetra-rekonstituierten Tiere der der konventionell gehaltenen Tiere ähnelte. Die prägnantesten Unterschiede waren in der CT und im Caecum zu finden. Ursache hierfür ist vermutlich unter anderem die etwa doppelt so hohe Bakteriendichte im Dickdarm im Vergleich zum Jejunum [33]. Des Weiteren konnten im Caecum sichtbar mehr isolierte lymphatische Follikel (ILFs), deren Anzahl ein Maß für die GALT-Entwicklung darstellt, gefunden werden. In der CT als bedeutendes lymphatisches Organ lassen sich Unterschiede in der Entwicklung des GALT am besten visualisieren. Das Colon ist beim Huhn ein vergleichsweise kurzer Darmabschnitt [42]. Es wies in der Verteilung der Immunzellen nur

leichte Unterschiede zwischen kolonisierten und keimfreien Hühnern auf, da vermutlich das Caecum beim Huhn als Hauptfermentationsort auch bezüglich der Immunfunktion einen höheren Stellenwert einnimmt.

Die Zellen des angeborenen Immunsystems, die in dieser Arbeit immunhistologisch untersucht werden konnten, zeigten in ihrer Zahl und Verteilung im Darm keine Unterschiede zwischen den Tiergruppen, was darauf hinweist dass für die Entwicklung der unspezifischen Immunabwehr im Darm kein mikrobieller Stimulus benötigt wird, sondern diese vielmehr einem genetischen Programm unterliegt. Dieser Ansatz würde biologisch durchaus Sinn machen, da Makrophagen und $\gamma\delta$ T-Lymphozyten maßgeblich an der ersten Verteidigungslinie des Darmes gegen Eindringlinge beteiligt sind und darüber hinaus eine wichtige Funktion bezüglich der Gewebemöostase innehaben. Makrophagen beispielsweise sind essentiell für die Embryonalentwicklung und den Abtransport von apoptotischen Zellen und $\gamma\delta$ T-Lymphozyten haben Einfluss auf die Aufrechterhaltung der Integrität epithelialer Strukturen, so dass eine Abhängigkeit von der Mikroflora von Nachteil wäre [235, 236].

Ein deutlicher Effekt der Mikroflora konnte jedoch auf die lymphoiden Zellen im Darm festgestellt werden, wobei die B-Lymphozyten am stärksten betroffen waren. An dieser Stelle sei erwähnt, dass sich die morphologische Quantifizierung von Zellen innerhalb eines Gewebes allgemein als sehr aufwendig gestaltet und nicht immer verlässliche Daten generiert. Hinzu kommt, dass es sich bei der immunhistologischen Untersuchung stets um lokale Schnittbilder handelt, die stark von den jeweils angeschnittenen Strukturen abhängen. Daher wurde in dieser Arbeit auf die morphologische Quantifizierung verzichtet und die immunhistologische Untersuchung genutzt um zunächst einen ersten Eindruck der allgemeinen Entwicklung des Darmimmunsystems der einzelnen Tiergruppen zu gewinnen. Deshalb können leichte Unterschiede in der Zellzahl, wie es beispielsweise bei den T-Lymphozyten der Fall war, nur als Hinweis auf einen Einfluss der Mikrobiota gewertet werden. Die Verteilung der B-Lymphozyten jedoch wies solch drastische Unterschiede zwischen den Gruppen auf, dass hier von einem Effekt der Mikroorganismen ausgegangen werden kann.

Die Anzahl der B-Lymphozyten im Darm der keimfrei gehaltenen Tiere war in der immunhistologischen Untersuchung im Vergleich mit den konventionell gehaltenen Hühnern hochgradig reduziert. Des Weiteren konnten keinerlei GCs und keine ILFs bei den keimfrei gehaltenen Tieren nachgewiesen werden, was für eine Unterentwicklung des GALT spricht. Das Ausmaß des lymphatischen Gewebes der CT war außerdem sehr viel geringer bei keimfrei gehaltenen als bei den konventionellen Tieren. Am auffälligsten war jedoch die

differentielle IgA Produktion. So konnte bei den keimfrei gehaltenen Tieren bis zum 28. Lebenstag kein IgA im Darm nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse decken sich mit den Erkenntnissen aus Mausmodellen [2, 4, 85, 103] und den Ergebnissen der Keimfrei Studien an Hühnern [10, 150], in denen eine deutlich beeinträchtigte Entwicklung des Darmimmunsystems bei fehlender mikrobieller Stimulation festgestellt wurde.

Die einzelnen IgA⁺ Zellen, welche in der CT bei einigen Tieren der Keimfrei-Gruppe am 55. Lebenstag nachgewiesen werden konnten, sind möglicherweise als Reaktion auf Futterantigene oder abgetötete Mikroorganismen, welche mit dem Futter aufgenommen wurden, induziert worden. Wagner *et al.* konnten in ihren Keimfrei-Versuchen ebenfalls feststellen, dass antigene Strukturen der durch Autoklavierung des Futters inaktivierten Bakterien nach längerfristiger Applikation auch bei den keimfrei gehaltenen Tieren zu einer geringen Antikörperproduktion führten. Diese Annahme konnte durch die Zugabe von großen Mengen abgetöteter Bakterien in das Futter bestätigt werden, da in der Folge eine vermehrte Antikörperproduktion festgestellt werden konnte [5].

Die Mono-Rekonstitution mit EcN führte zu einem intermediären Phänotyp. In der CT der mono-rekonstituierten Tiere konnten GCs nachgewiesen werden und auch die IgA Produktion wurde induziert. Allerdings erschienen die GCs der mono-rekonstituierten Tiere kleiner und traten in geringerer Anzahl auf als bei den konventionellen Tieren. Auch die Anzahl der ILFs und der B-Lymphozyten allgemein waren bei den mono-rekonstituierten Hühnern deutlich geringer als in der konventionellen Gruppe. Gleiches galt für IgA⁺ Zellen. Dies lässt darauf schließen, dass die Stimulation durch einen einzelnen Bakterienstamm nicht die gleiche Wirkung auf die GALT-Entwicklung hat, wie eine komplexe Darmflora.

Der durch die Tetra-Rekonstitution entstandene Phänotyp kommt dem der konventionell gehaltenen Tiere am nächsten. In dieser Gruppe traten regelmäßig ILFs im Caecum auf und es waren zahlreiche GCs in der CT zu finden, welche allerdings etwas weniger gut entwickelt erschienen als bei der konventionellen Gruppe. Auch in der Menge an immunhistologisch nachweisbaren IgA waren sich die Tetra-Gruppe und die konventionelle Gruppe sehr ähnlich. Aus rein morphologischen Gesichtspunkten scheinen diese vier Bakterien dementsprechend einen größeren Effekt auf das Darmimmunsystem zu haben, als ein einzelner Keim.

Um erste Hinweise darauf zu gewinnen welche Mechanismen und Faktoren letztendlich diesem deutlichen Effekt zugrunde liegen und sich den erzielten Ergebnissen quantitativ zu nähern, wurden Untersuchungen auf transkriptioneller Ebene angeschlossen.

6.2 GENEXPRESSIONSANALYSEN

Durch semiquantitative, holistische Genexpressionsanalysen (Microarray Experimente) sollte zunächst ein Gesamteindruck des Transkriptoms der untersuchten Tiergruppen gewonnen werden, um anschließend hypothesengetriebene, quantitative Untersuchungen (qRT-PCR) durchzuführen, bei denen ausgewählte Gene gezielt analysiert werden konnten.

Mit Hilfe der Microarray Experimente konnten viele differentiell exprimierte Gene zwischen mikrobiell kolonisierten und keimfrei gehaltenen Hühnern identifiziert werden (siehe Kapitel 5.2.2). Die enorme Datenfülle verlangt sicherlich weitere detaillierte funktionelle Untersuchungen vieler dieser differentiell exprimierten Gene, welche jedoch den Rahmen dieser Arbeit sprengen würden. Daher wurden zunächst auffällige Gen-Gruppen ausfindig gemacht, welche erste Hinweise auf zugrunde liegende Mechanismen des mikrobiellen Einflusses auf das Darmimmunsystems liefern könnten. So war beispielsweise besonders auffällig, dass viele Gene, die für sog. SLC-Transporter (*solute carrier*) codieren bei keimfrei gehaltenen Tieren höher exprimiert waren. Dabei handelt es sich um Membranproteine, welche jeweils bestimmte Moleküle transportieren können und somit Stoffwechselvorgänge in Zellen ermöglichen [237]. Auffallend oft handelte es sich innerhalb dieser Gen-Gruppe um Transporter für Moleküle wie Glukose, Fruktose, Natrium, organische Anionen und Aminosäuren. Dies könnte zum einen darauf hinweisen, dass bei keimfrei gehaltenen Tieren eine Ungleichgewichts des Wasser- und Elektrolythaushaltes vorliegt, weshalb vermehrt Stoffwechselvorgänge betrieben werden müssen, um die Homöostase zu gewährleisten. Roediger *et al.* konnten anhand einer *ex vivo* Studie am Colon des Menschen zeigen, dass bakteriell produzierte kurzkettige Fettsäuren, insbesondere Butyrat die Effektivität der Natrium-Resorption erhöht [238]. Somit ist es möglich, dass ein Fehlen der Mikroflora zu einer reduzierten Natriumaufnahme führt und damit zu einem gestörten Elektrolythaushalt beiträgt. Zum anderen wird der Eindruck vermittelt, dass bei den keimfrei gehaltenen Tieren vermehrt Vorgänge zur Energieaufnahme angestoßen werden, was beispielsweise die deutlich erhöhte Expression von SLC2A5 verdeutlicht, welches für GLUT5, einem Glukosetransporter des Darms codiert [216]. In diese Richtung weist auch die Hochregulation anderer am Glukosestoffwechsel beteiligter Moleküle, wie *insulin-like growth factor binding protein 1* und *insulin receptor substrate 1*. Für diese Hypothese spricht außerdem, dass auch Moleküle, welche eine Rolle beim Fettstoffwechsel spielen in der Keimfrei-Gruppe höher exprimiert wurden. Dazu zählt beispielsweise ACOX1, das für das erste Enzym der β -Oxidations-Kaskade von Fettsäuren codiert [221]. Des Weiteren das für das Apolipoprotein B codierende Gen, welches als Bestandteil der Chylomikronen für die Fettresorption im Darm von

Bedeutung ist und beim Transport von Fetten in Lymphe und Blut eine Rolle spielt [239] und FABP6 (*fatty acid binding protein 6, ileal (gastrotropin)*), welches für den intrazellulären Transport von Fettsäuren von Bedeutung ist [240]. Keimfrei gehaltene Mäuse haben im Vergleich zu mikrobiell kolonisierten Mäusen einen erhöhten Energiebedarf, einen geringeren Körperfettanteil und müssen größere Mengen an Energie aufnehmen, um das bei konventionell gehaltenen Mäusen übliche Körpergewicht zu halten [241]. Dies ist vermutlich bedingt durch die fehlende mikrobielle Fermentation von Strukturkohlenhydraten. Der Einfluss der Mikroflora auf den Energiehaushalt des Huhns wird kontrovers diskutiert. Hedge *et al.* konnten eine signifikant erhöhte Menge an verstoffwechselbarer Energie bei mikrobieller Besiedlung des Darms feststellen [242]. Muramatsu *et al.* konnten zeigen, dass nur Hühner, welche kohlenhydratreiches Futter verabreicht bekamen, von der durch Mikroorganismen zusätzlich bereitgestellten Energie einen positiven Nutzen ziehen konnten. Dies war insbesondere der Fall, wenn ein allgemeines Energiedefizit bestand [243]. Aus einer weiteren Untersuchung wurde von den Autoren letztendlich geschlossen, dass bei ausreichend zu Verfügung stehender verstoffwechselbarer Energie, die Effizienz des Energiehaushaltes durch das Vorhandensein der Mikrobiota verringert werde, unter katabolen Bedingungen die Darmflora für den Energiehaushalt jedoch von Vorteil sei [244].

Die Fähigkeit pflanzliche Polysaccharide effektiv zu verstoffwechseln variiert außerdem stark zwischen den unterschiedlichen Vertretern der Mikrobiota [245], was dazu führt dass die individuelle Zusammensetzung der Darmflora mitverantwortlich für eine Adipositas des Wirtes sein können [4]. Diese Erkenntnis könnte im Zusammenhang mit der Beobachtung stehen, dass im Vergleich mit einzelnen der drei mikrobiell kolonisierten Tiergruppen (Konventionell, Mono, Tetra), bei den keimfrei gehaltenen Tieren unterschiedliche Moleküle des Energiestoffwechsels reguliert wurden. So waren beispielsweise die Gene der Aldehyd Oxidase und der Glytanyl Aminopeptidase, welche beide am Proteinstoffwechsel beteiligt sind, nur im Vergleich mit der konventionellen Gruppe bei den keimfrei gehaltenen Tieren höher exprimiert und zwei für Natrium/Glukose-Cotransporter codierende Gene (SLC5A1 und SLC5A11) nur im Vergleich mit der konventionellen und der Tetra-Gruppe hochreguliert. Allerdings soll hier nochmals darauf hingewiesen werden, dass diese Daten stets einen relativen Vergleich darstellen. Gene die in den keimfrei gehaltenen Tieren schwächer exprimiert waren, wurden in der Vergleichsgruppe demnach relativ stärker exprimiert. Dennoch können so Hinweise darauf abgeleitet werden, welche Mechanismen sich im jeweiligen Vergleich unterscheiden und damit von besonderer Bedeutung sind.

Die Bedeutsamkeit von Stoffwechselvorgängen bei der Keimfrei-Gruppe zeigt sich zudem

auch bei der Klassifizierung der differentiell exprimierten Gene in funktionelle Gruppen mittels Panther Gene List Analysis (Kapitel 5.2.4), bei der eine Vielzahl der bei keimfrei gehaltenen Tieren hochregulierten Gene den Gruppen „Transporter activity“ und „Metabolic Process“ zugeordnet werden konnten.

Betrachtet man die bei keimfrei gehaltenen Tieren schwächer exprimierten Gene, so fällt auf, dass hier insgesamt größere Expressionsunterschiede vorliegen, als bei den höher exprimierten Genen. Dies könnte darauf hindeuten, dass die in den Vergleichsgruppen höher exprimierten Gene beim Vergleich mit der Keimfrei-Gruppe einen höheren Stellenwert einnehmen als jene Gene, die in der Keimfrei-Gruppe hochreguliert wurden. Hinzu kommt, dass in der CT mehr als vier Mal so viele Gene in allen drei mikrobiell kolonisierten Gruppen höher exprimiert (53) waren, als Gene, die in allen Vergleichsgruppen schwächer exprimiert waren (12) (siehe 5.2.3, Abbildung 20), was ebenfalls die Gewichtung der bei den mikrobiell kolonisierten Tieren hochregulierten Gene verdeutlicht. Viele dieser Gene codieren für essentielle Moleküle des Immunsystems, was auch anhand des überwiegenden Anteils an immunrelevanten Signalwegen an der Gesamtheit der biologisch relevanten Signalwege verdeutlicht wird (Tabelle 16). Innerhalb dieser immunrelevanten Gene waren zudem Gene des B-Lymphozyten Systems überrepräsentiert. So konnte beispielsweise in allen mikrobiell kolonisierten Gruppen sowohl im Caecum als auch in der CT deutlich mehr mRNA für die Immunglobulin-Gene IgY, IgJ und IgI gefunden werden. Des Weiteren war CD72, dessen Protein von B-Lymphozyten exprimiert wird und ein Molekül für die Interaktion mit T-Lymphozyten darstellt [246] in der CT der mikrobiell kolonisierten Tiere hochreguliert, sowie TACI, das für den gleichnamigen Rezeptor auf B-Lymphozyten codiert, welcher das für die Differenzierung von B-Lymphozyten essentielle Zytokin BAFF bindet [247]. CXCL13, welches als B-Lymphozyten Chemokin eine wichtige Rolle bei der Germinalen-Zentrumsreaktion spielt [3] gehörte ebenfalls zu den bei mikrobiell kolonisierten Hühnern höher exprimierten Genen. Ein weiteres essentielles Gen des B-Lymphozyten Systems, welches in allen mikrobiell kolonisierten Gruppen hochreguliert war, codiert für die AID. Bei den konventionell gehaltenen Tieren war zudem *early B-cell factor 1* und CD79b, das für einen Teil des BCRs codiert im Vergleich mit der Keimfrei-Gruppe hochreguliert. Dies sind nur einige Beispiele an signifikant differentiell exprimierten Genen des Immunsystems, welche offenbar durch die mikrobielle Besiedlung der Hühner induziert werden. Damit können auf Genebene, die bereits bei der morphologischen Analyse gewonnenen Eindrücke zur Relevanz der Beeinträchtigung, insbesondere des B-Lymphozyten Systems bestätigt werden.

Wie ausgehend von den bisherigen Ergebnissen zu erwarten war, wurden viele der bei mikrobiell kolonisierten Tiere höher exprimierten Gene von Panther Gene List Analysis den funktionellen Gruppen „Response to stimulus“ und „Immune system process“ zugeordnet. Des Weiteren fiel „Receptor activity“ bei diesen Tieren ins Gewicht, was durch die Hochregulation vieler Chemokin- und Zytokinrezeptoren, wie beispielsweise IL21R, IL13Ra2, TNFRSF1B (CD120b, *tumor necrosis factor receptor superfamily member 1B*), CXCR4, aber auch Gene für costimulatorische Moleküle wie CD86 und die erhöhte mRNA Abundanz von CD79b zu Stande kam.

Es stellte sich die Frage, in wie fern sich die Genexpressionsmuster, die durch einen einzelnen Keim (EcN) und durch vier Bakterienstämme (EcN, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Clostridium butyricum*) induziert werden von denen der konventionellen und der keimfrei gehaltenen Tiere unterscheiden. Wie oben bereits erwähnt, gab es einige immunrelevante Gene, welche sowohl in den konventionellen Hühnern, als auch in den beiden rekonstituierten Gruppen eine höhere mRNA Abundanz zeigten als in den keimfrei gehaltenen Tieren. Dies weist darauf hin, dass bereits ein Keim oder wenige Keime die Induktion von immunrelevanten Genen stimulieren können. Bereits bei der Betrachtung der Zahl an differentiell exprimierten Genen (Tabelle 13) wird jedoch deutlich, dass in der Tetra-Gruppe sowohl in der CT als auch im Caecum deutlich mehr Gene signifikant differentiell reguliert sind als in der konventionellen Gruppe. In der Mono-Gruppe wurden in der CT vergleichsweise wenig signifikant differentiell regulierte Gene gefunden, im Caecum wiesen die mono-rekonstituierten Tiere dagegen die höchste Anzahl an differentiell regulierten Genen auf. Die Daten deuten an, dass die durch die Rekonstitution ausgelöste Immunreaktion möglicherweise nicht der gewünschten Homöostase unterliegt, sondern dass hier eine Dysregulation vorliegt. Dies macht insbesondere für die tetra-rekonstituierten Tiere den Anschein. Gene die ausschließlich in der Tetra-Gruppe im Vergleich zur Keimfrei-Gruppe hochreguliert waren, sind beispielsweise IL6, IL22 und IFNG (*interferon gamma*), welche für proinflammatorische Zytokine codierenden und CCL17, dessen Produkt Chemotaxis von T-Lymphozyten auslöst [248]. Des Weiteren waren bei den tetra-rekonstituierten Tieren Gene, die für Zytokin- und Chemokinrezeptoren codieren (IL-2RG, CXCR4) und solche die Signaltransduktion von Zytokinen herunter regulieren (SOCS1, SOCS2, SOCS3) induziert [249]. Die Induktion von proinflammatorischen Zytokinen und die möglicherweise kompensatorische Expression von SOCS könnte ein Hinweis auf eine inflammatorische Immunreaktion der tetra-rekonstituierten Tiere darstellen. Allerdings zeigte keines der tetra-rekonstituierten Tiere Krankheitssymptome und bei der Probenentnahme konnten

makroskopisch keine Anzeichen von entzündlichen Prozessen im Darm festgestellt werden, welche bei einer Entzündungsreaktion zu erwarten wären. Auch die histologische Untersuchung ergab nicht den Eindruck eines inflammatorischen Geschehens, bei dem eine vermehrte Infiltration des Gewebes mit Immunzellen zu erwarten wäre [1]. Denkbar wäre trotzdem, dass das Immunsystem durch die Tetra-Rekonstitution in eine Alarmbereitschaft gebracht wurde, welche im Falle einer Infektion zu einer überschießenden Immunreaktion führen könnte. Diese Möglichkeit muss durch weitere Analysen ausgeschlossen werden, um die Wirkung der vier Bakterienstämme auf das Darmimmunsystem als eindeutig positiv einzuordnen.

Besonders auffällig ist der große Unterschied der Genexpressionsprofile zwischen CT und Caecum der mono-rekonstituierten Hühner. In der CT der Mono-Gruppe waren insgesamt nur wenig Gene differentiell exprimiert. Die mono-rekonstituierten Tiere zeigten hinsichtlich ihres Genexpressionsprofils Überschneidungen sowohl mit der Keimfrei-Gruppe, als auch mit der konventionellen Gruppe. Dies bestätigt wiederum den in der Immunhistologie beschriebenen intermediären Phänotyp der Mono-Gruppe. Die Diskrepanz zum Genexpressionsprofil des Caecums hingegen, bei dessen Analyse in der Mono-Gruppe doppelt so viele differentiell exprimierte Gene wie in der Tetra-Gruppe und fast dreimal so viele wie in der konventionellen Gruppe identifiziert werden konnten ist jedoch funktionell schwierig zu interpretieren. Zu den im Caecum der mono-rekonstituierten Tiere im Vergleich mit der Keimfrei-Gruppe am stärksten hochregulierten Genen zählen beispielsweise *beta-1,3-glucuronyltransferase 2*, *chloride channel* Kb, zwei Natrium Kanäle und *glutamate decarboxylase 1*. Hier überwiegen also wie schon in der Keimfrei-Gruppe Gene für Ionenkanäle und Enzyme und weniger immunrelevante Gene. Dies könnte damit zusammenhängen, dass in der CT als lymphatisches Organ primär immunologische Prozesse stattfinden, wogegen sich im Caecum Transportmechanismen, endokrine Funktionen und Stoffwechselvorgänge wie beispielsweise der Wasser- und Elektrolythaushalt mit den Immunfunktionen die Waage halten. Um herauszufinden inwiefern sich die mono-rekonstituierten Tiere im Caecum von den anderen Tiergruppen unterscheiden, müssen sich weitere Analysen anschließen, von denen aber im Rahmen dieser Arbeit abgesehen wurden, da der Fokus auf das Immunsystem gerichtet wurde. Es sei auch erwähnt dass mit den Datensätzen der Microarray Analysen eine Fülle an Informationen vorliegt, welche bisher nur in Grundzügen ausgewertet werden konnten und als Ansatzpunkt für weitere funktionell relevante Fragestellungen verwendet werden können.

Bis zu diesem Punkt konnte sowohl in den morphologischen Analysen als auch in den

holistischen Genexpressionsanalysen unabhängig voneinander beobachtet werden, dass der deutlichste Effekt der intestinalen Mikroflora in Bezug auf die Entwicklung des Darmimmunsystems, der Einfluss auf das B-Lymphozyten System zu sein scheint. Aus diesem Grund sollten im nächsten Schritt einzelne Faktoren insbesondere des B-Zellsystems mittels qRT-PCR vergleichend quantifiziert werden, um die semiquantitativen Ergebnisse der Microarray Analysen zu verifizieren und auf dem Array fehlende Gene (IgA, TGF β , IL21) zu untersuchen.

Einzelne Faktoren des T-Lymphozyten Systems (CD4, CD8), für welche histologisch keine deutlichen quantitativen Unterschiede gezeigt werden konnten, sollten ebenfalls mittels qRT-PCR quantifiziert werden. Dabei ergaben sich mit der Immunhistologie übereinstimmende Daten, die eine tendenziell höhere Expression von CD4 und CD8 bei mikrobiell kolonisierten Tieren zeigten, welche allerdings nur bei der Tetra-Gruppe Signifikanzen aufwiesen (Abbildung 36). Diese insgesamt höhere Menge an mRNA von CD4 und CD8 bei den tetra-rekonstituierten Tieren kann wiederum als weiterer Hinweis für eine möglicherweise durch die vier Bakterien ausgelöste dysregulatorische Immunreaktion gewertet werden. Unterstützt wird diese Hypothese außerdem von der massiven Hochregulation der beiden proinflammatorischen Zytokine IL1 β und IL6 in der Tetra-Gruppe (Abbildung 34), was zudem die bereits im Microarray gewonnenen Ergebnisse bestätigt.

Die Daten zeigen, dass die Expression von PIGR im Caecum ebenfalls durch die Mikrobiota stimuliert wird. Dass keine signifikant differentielle Expression von PIGR in der CT nachweisbar war, macht funktionell Sinn, da davon ausgegangen werden kann, dass Immunglobuline weniger in der CT, sondern vorzugsweise im Caecum und den anderen Darmabschnitten mit großer luminaler Oberfläche sezerniert werden. Aus der Literatur ist bekannt, dass beim Säuger die Expression von PIGR einerseits durch die Bindung von Mikroorganismen oder bakterielle Produkte, wie beispielsweise LPS an TLRs auf Enterozyten induziert werden kann und andererseits durch Zytokine wie zum Beispiel IFN- γ , TNF α , IL-4 und IL-1 stimuliert wird [250]. Ein Zusammenspiel dieser beiden Mechanismen ist beim Huhn ebenfalls anzunehmen und erklärt, warum die konventionell gehaltenen Tiere eine mehr als doppelt so hohe mRNA Abundanz für PIGR aufweisen, als die anderen beiden mikrobiell kolonisierten Gruppen, bei denen die Keimlast im Darm deutlich geringer ist.

Viele der hier untersuchten löslichen und membranständigen Faktoren der B-Lymphozyten-abhängigen Immunantwort waren insbesondere in der CT von konventionellen und tetra-rekonstituierten Hühnern hochreguliert. Dazu zählen CXCR5, CD40L und BAFF. Dies war zu erwarten, da vor allem in der CT Germinale Zentrumsreaktionen ablaufen und hier

vermehrt B-Lymphozyten angesiedelt sind. Des Weiteren ist in den zuvor besprochenen Untersuchungen der Eindruck entstanden, dass bezüglich des Entwicklungsstands des Darmimmunsystems, die Tetra-Gruppe der konventionellen Gruppe ähnlicher ist als die Mono-Gruppe. AICDA (AID), welches einen essentiellen Faktor für den Immunglobulin-Klassenwechsel darstellt [251] und das für das pleiotrope Zytokin IL-21 codierende Gen, waren auch bei den mono-rekonstituierten Tieren hochreguliert, was zeigt dass bereits durch die Mono-Rekonstitution das B-Lymphozyten System angestoßen wird.

Die Erfassung der mRNA Abundanz der Immunglobuline lieferte besonders interessante Ergebnisse. Im Vergleich „Keimfrei-Konventionell“ ergaben sich im Zuge der ersten Lebenswochen für IgA, IgY und IgJ sehr ähnliche Expressionsmuster (Abbildung 24 bis 26). Bis zum 14. Lebenstag stieg die mRNA Abundanz der Immunglobuline bei keimfrei gehaltenen und konventionellen Tieren kontinuierlich an, wobei hier bereits eine tendenziell erhöhte Menge bei den konventionellen Tieren festgestellt werden konnte. Bei den keimfrei gehaltenen Tieren stagnierte am Tag 21 nach dem Schlupf der Anstieg, woraufhin das mRNA Niveau am 28. Lebenstag wieder abfiel. Bei den konventionellen Hühnern hingegen kam es an Tag 28. nach dem Schlupf zu einem weiteren deutlichen Anstieg der mRNA Abundanz. Dieses Genexpressionsmuster könnte darauf hinweisen, dass die Synthese von Immunglobulin Genen in den ersten zwei Lebenswochen zunächst einem genetischen Programm unterliegt, im weiteren Verlauf jedoch eine antigene Stimulation benötigt wird, um vollständig angestoßen zu werden. Aus den Daten der Immunhistologie geht hervor, dass bei keimfrei gehaltenen Tieren zu keinem Zeitpunkt IgA und IgY im Caecum nachweisbar war, was verdeutlicht, dass die bei keimfrei gehaltenen Tieren gemessene mRNA der Immunglobuline entweder in zu geringer Menge vorhanden war, damit nachweisbar Protein synthetisiert werden kann, oder aber degradiert wurde, bevor eine Translation stattfinden konnte. Die bis zu 260fache Hochregulation der entsprechenden Gene bei konventionellen Tieren zeigt, dass der mikrobielle Stimulus einen essentiellen Faktor für die Expression der die Immunglobuline codierenden Gene darstellt.

Der Vergleich der Immunglobulin-Expression in der CT und dem Caecum der vier Tiergruppen am 28. Lebenstag (Abbildung 29 und 30) ergibt ein ähnliches Muster. Alle drei mikrobiell kolonisierten Gruppen weisen eine signifikant höhere mRNA Abundanz der Immunglobulin-Gene auf, als die keimfrei gehaltenen Hühner. Dabei liegen in der CT die höchsten Werte jeweils in der Tetra-Gruppe, wobei dies im Caecum für die Mono-Gruppe der Fall ist. Diese Beobachtung ist bemerkenswert, die Ursache und die zugrunde liegenden Mechanismen sind jedoch weitgehend unklar. Da in den vorangegangenen Analysen bereits

der Eindruck entstanden ist, dass bei den rekonstituierten Tieren eine Dysregulation der Immunantwort vorliegen könnte, wäre eine Hypothese, dass durch die Mono- und die Tetra-Rekonstitution zwar das Immunglobulin System angestoßen wurde, regulatorische Mechanismen jedoch nicht richtig aktiviert wurden, was dazu führte dass die Immunglobuline nicht in adäquater Menge produziert wurden. Aus der Literatur ist bekannt, dass manche Vertreter der Mikrobiota, wie beispielsweise *Faecalibacterium prausnitzii*, vermehrt regulatorische Mechanismen aktivieren [252]. Welche und warum nur einige Bakterien dazu fähig sind, gilt es jedoch noch zu klären. Eine Alternativhypothese wäre, dass die Reaktion auf einen oder wenige Keime, eine mono- bzw. oligoklonale Expansion der antikörperproduzierenden B-Lymphozyten zur Folge hat, welche im Vergleich zu einer polyklonalen Expansion, die bei Auseinandersetzung des Organismus mit einer diversen Keimflora angestoßen werden würde, effektiver abläuft. Um eine dieser beiden Hypothese zu untermauern oder einen anderen Erklärungsansatz zu entwickeln, müssten weitere umfangreiche molekularbiologische Analysen, wie beispielsweise die Untersuchung der Klonalität von B- und T-Lymphozyten, folgen.

6.3 FUNKTIONELLE ANALYSEN

Nachdem die morphologischen Beobachtungen auf Transkriptionsebene quantifiziert und bestätigt werden konnten, stellte sich die Frage, ob sich diese Eindrücke auch in funktioneller Hinsicht erfassen lassen. Dies sollte anhand der Immunglobuline analysiert werden, da diese sowohl in der Histologie, als auch auf Genebene deutliche Unterschiede zwischen den Tiergruppen aufwiesen.

Es wurde zum einen der Immunglobulin-Plasmaspiegel und zum anderen die Konzentration an IgA in der Gallenflüssigkeit und im Inhalt des Caecums bestimmt. Die IgA-Konzentration in der Gallenflüssigkeit wurde gemessen, da Hühner wie Ratten, im Gegensatz zu Mensch und Maus IgA vermehrt über die Galle ausscheiden [3] und es hier durch den physiologischen Eindickungsprozess der Galle, zu einer im Vergleich zum Plasma erhöhten Immunglobulin-Konzentration kommt und Unterschiede somit besser zu erfassen sind. Im Inhalt des Caecums sollte das sekretorische IgA quantifiziert werden.

Die Immunglobulinquantifizierung lieferte eindeutige Daten. Keimfrei gehaltene Tiere haben bis zum 28. Lebenstag keinerlei IgA, und IgM nur in signifikant reduzierter Konzentration, gebildet. Dagegen reichte die Mono-Rekonstitution mit *E.coli* Nissle aus, um annähernd normale IgA- und IgM-Plasmakonzentrationen zu induzieren (Abbildung 37). Dies bestätigt erneut alle bisherigen Untersuchungen und deckt sich mit Literaturangaben. Die

Differenzierung von B-Zellen in IgA produzierende Plasmazellen wird bei Mäusen durch die Aktivierung von TLR5 durch Mikrobiota assoziiertes Flagellin induziert [116]. In der Folge kommt es zur Sekretion von löslichen Faktoren (BAFF), welche die Bildung von IgA⁺ Plasmazellen fördern. Gleichzeitig kommt es durch die Assoziation der Mikrobiota mit den Epithelzellen zur Aktivierung von Dendritischen Zellen, welche zusätzlich weitere Faktoren synthetisieren, wie zum Beispiel induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (*inducible nitric oxid synthase*, iNOS), Retinolsäure und Tumornekrosefaktor α (TNF α). Diese Faktoren fördern die Expression der AID und den Klassenwechsel von B-Lymphozyten zu IgA⁺ Plasmazellen [117-119]. Vergleichbare Mechanismen sind auch beim Huhn denkbar. Fehlt dementsprechend der bakterielle Stimulus, so bleibt die IgA-Produktion aus. Für *E. coli* Nissle konnten viele Fitnessfaktoren, welche den Stamm zur nachhaltigen Kolonisierung und damit zur Assoziation mit den Epithelzellen des Darms befähigen, nachgewiesen werden [253], welche vermutlich bei den mono-rekonstituierten Tieren zur effektiven Induktion der IgA-Produktion beigetragen haben.

Für IgY fanden sich aufgrund der hohen Konzentration an maternalen Antikörpern in den ersten vier Lebenswochen keine Unterschiede zwischen den Tiergruppen, weshalb im nächsten Versuch die Untersuchung erst am 55. Lebenstag durchgeführt wurde. Da die Anzahl an Isolatoren limitiert war, konnte neben der geplanten Tetra-Rekonstitution keine erneute Mono-Rekonstitution erfolgen, weshalb für die Mono-Gruppe keine Daten am 55. Lebenstag erfasst werden konnten. Zu diesem Zeitpunkt haben tetra-rekonstituierte und konventionell gehaltene Tiere signifikant höhere Plasmaspiegel an IgM und IgY produziert als keimfrei gehaltene Tiere (Abbildung 38). Dies deutet daraufhin, dass auch das systemische Immunsystem von der intestinalen Keimflora beeinflusst wird. Zumindest muss Antigen der Mikrobiota so präsentiert worden sein, dass die Entwicklung von IgM und IgY produzierenden Plasmazellen induziert werden konnte. Der Median der IgA-Konzentration im Plasma der Tetra-Gruppe war zwar tendenziell höher als in der Keimfrei-Gruppe, fiel jedoch deutlich geringer aus als in der konventionellen Gruppe. Die diverse Mikroflora der konventionellen Tiere konnte demnach das IgA-System längerfristig effizienter stimulieren als die Kolonisierung mit nur vier Bakterienstämmen, wobei kurzfristig (bis Tag 28) selbst die Mono-Kolonisierung für eine mengenmäßig gleichwertige humorale Immunantwort ausreichte.

Analog zur immunhistologischen Untersuchung konnten an Tag 55 nach dem Schlupf sehr geringe Immunglobulin-Konzentrationen auch im Plasma der keimfrei gehaltenen Tieren nachgewiesen werden. Wie bereits erwähnt ist dieses Phänomen von Wagner *et al.* bereits im

Zuge der ersten Keimfrei-Versuche mit Hühnern beschrieben worden [5] und wurde auf antigene Strukturen der durch die Autoklavierung des Futters inaktivierten Bakterien zurückgeführt [5]. Denkbar wäre, dass auch Nahrungsbestandteile in geringem Umfang an dieser Immunglobulinproduktion beteiligt sind.

Bei der Untersuchung des sekretorischen IgAs im Inhalt des Caecums fiel auf, dass hier eine deutlich geringere IgA-Konzentration zu finden war, als im Plasma und der Gallenflüssigkeit. Da das in das Darmlumen sezernierte IgA an die dort ansässigen Mikroorganismen bindet, um den Mutualismus zwischen Wirt und Mikrobiota zu erhalten [120], wäre eine Erklärung, dass die geringen IgA-Konzentration durch die Präparationstechnik der Proben bedingt ist. Zur Entfernung der korpuskulären Bestandteile wurden diese zentrifugiert und nur der Überstand wurde mittels ELISA untersucht. Daher ist es möglich, dass ein Großteil des sekretorischen IgAs an Bakterien gebunden war und somit abzentrifugiert und aus dem Überstand entfernt wurde.

Um zu zeigen, dass das sekretorische IgA an die Bakterien im Lumen bindet, wurden ELISAs zum Nachweis von Immunglobulinen, die für *E. coli* Nissle (EcN) und *Enterococcus faecium* spezifisch waren angeschlossen. Dabei ergaben sich für EcN eindeutige Ergebnisse. In der Keimfrei-Gruppe konnten keine für EcN spezifischen Immunglobuline nachgewiesen werden, was zu erwarten war, da bei diesen Tieren bereits die Messung der Gesamt-Immunglobuline negativ ausgefallen ist. Die Mono-Rekonstitution führte jedoch zu einer kräftigen spezifischen Immunreaktion auf EcN. EcN scheint also einen potenten Stimulus der adaptiven Immunantwort darzustellen, so dass am 28. Lebenstag in der Mono-Gruppe signifikant höhere Immunglobulinspiegel gegen EcN als in der Keimfrei-Gruppe und der konventionellen Gruppe gemessen werden konnten (Abbildung 41). Deutlich wird jedoch auch, dass die IgA-Produktion erst ab dem 14. Lebenstag messbar abläuft, so dass die Hühner vor diesem Zeitpunkt vermutlich gar nicht in der Lage sind spezifisch auf ein Antigen zu reagieren (Abbildung 40). Bar-Shira *et al.* haben ähnliche Ergebnisse erzielt, wobei eine spezifische Immunantwort durch orale Immunisierung von Hühnern vor dem 10. Lebenstag ausblieb [53]. Auch wenn Mast und Godderis durch subkutane Immunisierung von Broilern bereits ab dem 7. Lebenstag spezifische Antikörper induzieren konnten [254], so kann diese Beobachtung doch von großer Bedeutung sein, wenn man bedenkt dass in der Geflügelindustrie die Küken bereits innerhalb der ersten Lebensstage geimpft werden. Auch die Tetra-Rekonstitution führte am Tag 55 nach dem Schlupf zu signifikant erhöhten EcN spezifischen Immunglobulin-Konzentrationen. Zu diesem Zeitpunkt war auch eine leichte Reaktion bei der konventionellen Gruppe nachweisbar, was möglicherweise durch Kontakt der konventionellen Tiere mit

anderen *E. coli* Stämmen zu Stande kam, wodurch eine Kreuzreaktivität ausgelöst wurde.

Weitere Untersuchungen wiesen darauf hin, dass der *Enterococcus faecium* Stamm weniger immunogen zu sein scheint, als EcN. Die *Enterococcus faecium* spezifische IgA-Konzentration war an Tag 28 nach dem Schlupf in der Tetra-Gruppe nur geringgradig erhöht, wobei am 55. Lebenstag kein signifikanter Unterschied in der *Enterococcus faecium* spezifischen IgA-Konzentration zwischen den Gruppen festgestellt werden konnte. Die *Enterococcus faecium* spezifische IgY-Konzentration zeigt am 28. Lebenstag in allen Gruppen basale Werte, wobei am an Tag 55 nach dem Schlupf sowohl die Tetra-Gruppe, als auch die konventionelle Gruppe erhöhte IgY-Konzentrationen aufwiesen. Es ergibt sich also ein weniger eindeutiges Ergebnis, als bei der EcN spezifischen Immunglobulinkonzentration. Die immunmodulatorische Wirkung von EcN (siehe Kapitel 2.3.1) ist intensiv untersucht worden und konnte in zahlreichen Studien belegt werden [135, 163-165, 167, 172, 173], wohingegen die probiotische Wirkung von *Enterococcus faecium* betreffend weniger Informationen vorliegen, welche zudem widersprüchliche Aussagen beinhalten (siehe Kapitel 2.3.2). Daher ist es denkbar, dass EcN intensiver mit dem Immunsystem interagiert und damit einen potenteren Stimulus zur Induktion der humoralen Immunantwort darstellt, als *Enterococcus faecium*. Allerdings muss bei dieser Überlegung bedacht werden, dass nicht bekannt ist wie sich eine Mono-Rekonstitution mit *Enterococcus faecium* auf die Immunglobulinquantifizierung auswirken würde. Da EcN bei Mono-Rekonstitution eine höhere Immunglobulin-Konzentration bewirkte, als in Kombination mit den anderen drei Bakterienstämmen (Tetra-Rekonstitution), ist es möglich dass dies auch bei *Enterococcus faecium* der Fall wäre.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, wie wichtig eine frühe Kolonisierung des Darms mit der richtigen Flora für die Entwicklung des Darmimmunsystems des Huhns ist. Die gewonnenen Erkenntnisse liefern jedoch nur einen ersten Eindruck, da es zum einen wünschenswert wäre aus der Phyla der Mikrobiota viele weitere Gruppen an Bakterien zu analysieren um so einen umfassenden Eindruck des Einflusses der Mikrobiota auf das Immunsystem zu erhalten. Zum anderen konnte in funktioneller Hinsicht der Einfluss bisher nur ansatzweise, hinsichtlich der Antikörperproduktion von B-Lymphozyten untersucht werden. Dennoch können die vorliegenden Daten als Übersicht für weitere Analysen dienen, welche im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht umsetzbar waren, da die Technik der Keimfreihaltung und der Rekonstitution technisch und finanziell sehr aufwendig ist. Außerdem vermittelt diese Arbeit die bisher umfassendste Analyse des Einflusses der Mikrobiota auf die Entwicklung des Immunsystems des Huhns.

6.4 AUSBLICK

Die bisherigen Untersuchungen zeigen, dass die Entwicklung des Darmimmunsystems beim Huhn von der den Darm besiedelnden Mikroflora abhängt. Vermutlich liegen diesem Effekt zur Maus analoge Mechanismen zugrunde.

Aus dieser Beobachtung ergeben sich weitere relevante Fragestellungen. Zum einen wäre es sinnvoll den Einfluss weiterer Gruppen und Vertreter der Mikrobiota auf das Immunsystem zu untersuchen, da davon auszugehen ist, dass sich diese in ihrer immunmodulatorischen Eigenschaft unterscheiden. Zum anderen sollten die Bakterienstämme, die in dieser Arbeit in Kombination mit *E. coli* Nissle zur Tetra-Rekonstitution verwendet wurden, auf ihren Einfluss bei Mono-Rekonstitution untersucht werden und gleichzeitig sollte ein potentieller pro-inflammatorischer Effekt dieser Stämme ausgeschlossen werden, um ihre probiotische Wirkung beim Huhn zu bestätigen.

Ganz entscheidend ist außerdem die Frage, ob die keimfrei gehaltenen Tiere, trotz des unterentwickelten Darmimmunsystems in der Lage sind eine adäquate Immunreaktion zu bewerkstelligen, oder in welcher Hinsicht die Mikrobiota oder deren einzelne Vertreter Einfluss darauf haben, dass eine Infektion besser bekämpft wird bzw. eine Impfung eine bessere Protektion vermittelt. Um dies zu beantworten, müsste man Infektions- und Vakzinierungsexperimente mit den entsprechenden Tiergruppen durchführen. Wagner *et al.* haben in ihren Untersuchungen keinen Unterschied zwischen den Antikörper-Titern von keimfrei gehaltenen und konventionellen Hühnern nach Immunisierung mit *Salmonella Pullorum* Antigen und Rinderserum festgestellt [5]. Thorbecke *et al.* hingegen konnten nach Immunisierung mit drei verschiedenen Antigenen deutlich reduzierte Konzentration an γ -Globulinen im Serum von keimfrei gehaltenen Tieren nachweisen [8]. Auch für die Maus existieren zu diesem Thema widersprüchliche Literaturangaben [255-257]. Aufgrund der großen klinischen Relevanz dieser Fragestellung, sollte in künftigen Studien gezielt der Einfluss der Mikrobiota auf den funktionellen Aspekt der Immunantwort untersucht werden. Dabei müssen sowohl die humoralen, als auch die zellulären Komponenten miteinbezogen werden, weshalb die Auswahl des bei der Immunisierung verwendeten Antigens und die Immunisierungszeitpunkte gut zu überdenken sind. Auch wenn in dieser Arbeit morphologisch kein Einfluss der Mikrobiota auf die Zellen des angeborenen Immunsystems nachweisbar war, so konnten für lösliche Faktoren (Zytokine und Chemokine) auf transkriptioneller Ebene Unterschiede zwischen den Tiergruppen festgestellt werden. Es bleibt also zu untersuchen, ob die aus der Literatur bekannte verbesserte Infektionsabwehr

von mikrobiell kolonisierten Tieren verglichen mit keimfrei gehaltenen Tieren [135, 258] durch eine verbesserte adaptive Immunantwort (T- und/oder B-Lymphozyten abhängig), eine Stimulation der unspezifische Immunabwehr (vermehrte Zytokinproduktion) oder durch das Konkurrenzausschlussprinzip zustande kommt. Zu erwarten wäre wohl ein Zusammenspiel aller Mechanismen.

Ein weiterer wichtiger Ansatz ist, zu überprüfen, ob die Daten der in dieser Arbeit beschriebenen konventionellen Gruppe aus SPF-Haltung, denen von Tieren unter Feldbedingungen der herkömmlichen Geflügelproduktion entsprechen und somit auf die Praxis übertragen werden können. Von besonderer klinischer Relevanz ist außerdem die Frage, ob *E. coli* Nissle auch bei konventionell gehaltenen Hühnern einen immunmodulatorischen Effekt ausübt.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse können außerdem wichtige Hinweise für die Entwicklung einer probiotischen Flora liefern, welche an Eintagsküken verabreicht, eine schnelle und korrekte Entwicklung des Immunsystems gewährleisten kann und als effektive und unbedenkliche Möglichkeit zu Verbesserung der Tiergesundheit längerfristig einen Beitrag zur Reduktion des Antibiotikaverbrauchs in der Geflügelindustrie leisten würde.

7. ZUSAMMENFASSUNG

Ein voll entwickeltes Immunsystem ist für die Tiergesundheit und damit auch für das Tierwohl von entscheidender Bedeutung. Dies gilt insbesondere in der intensiven Geflügelhaltung, in der das häufige Auftreten von Infektionserkrankungen durch präventive Impfmaßnahmen oder den Einsatz von Antibiotika kontrolliert wird. Letzterer steht derzeit stark in der Kritik und hat zur intensiven Suche nach Alternativen geführt.

Arbeiten der letzten Jahre haben gezeigt, dass die strukturelle und funktionelle Entwicklung des Immunsystems von Mäusen entscheidend von der intestinalen Mikroflora beeinflusst wird. Für landwirtschaftliche Nutztiere und insbesondere für das Geflügel gibt es hierzu nur wenige, überwiegend sehr alte Untersuchungen. Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher die Bedeutung einer mikrobiellen Besiedelung des Darms nach dem Schlupf für die Entwicklung des Immunsystems und insbesondere des Darmimmunsystems von Hühnern untersucht werden. Als methodischer Ansatz wurde der Vergleich von keimfrei gehaltenen und konventionell gehaltenen Hühnern gewählt. In die Studie miteinbezogen wurden zwei weitere Tiergruppen, welche mit probiotischen Bakterien rekonstituiert wurden. Eine dieser Gruppen wurde mit dem *Escherichia coli* Nissle 1917 Stamm mono-rekonstituiert (Mono-Gruppe), die zweite Gruppe erhielt eine Mischung aus den vier Bakterienstämmen *Escherichia coli* Nissle, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus rhamnosus* und *Clostridium butyricum* (Tetra-Gruppe). Die Untersuchung des Darms der Tiere erfolgte auf morphologischer (Immunhistologie), transkriptioneller (Genexpressionsanalysen) und funktioneller (Immunglobulinquantifizierung) Ebene. Dabei konnte bei keimfrei gehaltenen Hühnern morphologisch eine massiv reduzierte Anzahl an B-Lymphozyten und das Fehlen von Germinalen Zentren, isolierten lymphatischen Follikeln und der IgA- und IgY-Produktion im Darm festgestellt werden. Dagegen war der Effekt einer fehlenden mikrobiellen Besiedelung auf die T-Lymphozyten im Darm vergleichsweise gering. Für die Zellen des angeborenen Immunsystems konnten morphologisch keinerlei Unterschiede zwischen den untersuchten Tiergruppen festgestellt werden. Der Phänotyp der mono-rekonstituierten Hühner lag hinsichtlich des histologisch erfassten Entwicklungsstandes zwischen der Keimfrei- und der Tetra-Gruppe, die Tetra-Gruppe kam der konventionellen Gruppe am nächsten.

Die auf morphologischer Ebene beobachtete Unterentwicklung des Darmimmunsystems der Keimfrei-Gruppe konnte auch auf transkriptioneller Ebene bestätigt werden. Bei den mikrobiell kolonisierten Tiergruppen (konventionell, mono-rekonstituiert, tetra-rekonstituiert) waren zahlreiche immunrelevante Gene signifikant höher exprimiert als bei den keimfrei

gehaltenen Tieren. Analog zur Morphologie, waren Gene des B-Lymphozyten Systems bei den höher exprimierten Genen überrepräsentiert. Die bei keimfrei gehaltenen Tieren stärker exprimierten Gene wiesen darauf hin, dass bei diesen Transportprozesse, insbesondere des Energiestoffwechsels und des Wasser- und Elektrolythaushalts, eine Rolle zu spielen scheinen. Es fanden sich außerdem Hinweise auf eine Dysregulation der Immunantwort bei den rekonstituierten, insbesondere den tetra-rekonstituierten Tieren, da es in der Tetra-Gruppe zu einer erhöhten Expression von Genen für proinflammatorische Zytokine und Effektorzellen ($CD4^+$, $CD8^+$) kam. Die makroskopische und histologische Untersuchung der tetra-rekonstituierten Tiere lieferte jedoch keinen Hinweis auf ein inflammatorisches Geschehen in dieser Tiergruppe.

Die Immunglobulinproduktion wurde ebenfalls signifikant durch die Mikrobiota beeinflusst. Bis zum 28. Lebenstag konnte im Plasma der keimfrei gehaltenen Tiere keinerlei IgA und lediglich deutlich reduzierte Mengen an IgM nachgewiesen werden, wobei die Mono-Rekonstitution mit *E.coli* Nissle ausreichte, um annähernd normale IgA- und IgM-Plasmakonzentrationen zu induzieren. Am 55. Lebenstag war die Immunglobulin-Konzentration im Plasma der tetra-rekonstituierten Tiere zwar signifikant höher als in der Keimfrei-Gruppe, fiel jedoch geringer aus als in der konventionellen Gruppe. Die diverse Mikroflora der konventionellen Tiere konnte demnach die humorale Immunantwort längerfristig effizienter stimulieren als die Kolonisierung mit nur vier Bakterienstämmen. Des Weiteren konnte für den probiotischen *E.coli* Nissle Stamm eine effektive spezifische humorale Immunantwort nachgewiesen werden, wogegen der *Enterococcus faecium* Stamm weniger immunogen erschien.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass eine frühe Kolonisierung des Darms mit der richtigen Flora entscheidend für die Entwicklung des Darmimmunsystems des Huhns ist. Die gewonnenen Erkenntnisse liefern wichtige Hinweise für die Entwicklung einer probiotischen Flora, welche an Eintagsküken verabreicht, eine schnelle und korrekte Entwicklung des Immunsystems gewährleistet. Als effektive und unbedenkliche Möglichkeit zur Verbesserung der Tiergesundheit, würde sie längerfristig auch einen Beitrag zur Reduktion des Antibiotikaverbrauchs in der Geflügelindustrie leisten.

8. SUMMARY

A fully developed mucosal immune system is essential for animal health and welfare. Intensive livestock farming of poultry is promoting the occurrence of infectious diseases and often leads to increasing use of antibiotics, which is a major concern in public health. Thus, there has been a focus on finding alternative ways to promote intestinal health. While the role of microbial colonization of the gut has been studied intensively in mice, little is known about its relevance for the development of the mucosal immune system in birds. In order to address this question, we raised germ free chickens and reconstituted them with an *E.coli* strain Nissle alone (mono-group) or in combination with an *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus rhamnosus* and *Clostridium butyricum* strain (tetra-group). The intestinal immune system of germ free, conventional, mono-reconstituted and tetra-reconstituted animals was analyzed by immunohistology, gene expression analyses and immunoglobulin quantification. Morphologically, germ free chickens showed a massive reduction of B cells, the complete lack of germinal centers and isolated lymphoid follicles and no IgA and IgY production in the gut. The impact of microbial absence on T cells in the gut was less obvious and no differences in numbers and distribution of innate immune cells between the groups could be detected. Overall, the mono-reconstituted birds showed an intermediate state of development, whereas the development of the intestinal immune system of tetra-reconstituted chickens was similar to conventional birds.

The results of the morphological studies could be confirmed by gene expression analyses. Many genes, which were significantly higher expressed in the chickens with microbial colonization, could be related to the immune system, in particular to the B cell system. In contrast, numerous genes, which were higher expressed in germ free birds, were associated with transporter activity, energy intake and metabolism and water and electrolyte homeostasis. Furthermore, there were indications of a dysregulation in the immune response of the reconstituted groups, in particular in the tetra-reconstituted animals, as there was an up regulation of genes encoding for proinflammatory cytokines and effector cells (CD4⁺, CD8⁺). Yet, there was no evidence for inflammation found during necropsy or in histology.

The microbiota also had a significant impact on the production of immunoglobulins. At day 28 after hatch, there were no IgA and only significantly decreased levels of IgM detectable in plasma of germ free chickens, whereas the mono-reconstitution with *E. coli* Nissle led to almost normal IgA and IgM concentrations. After 55 days of life, the plasma immunoglobulin levels of tetra-reconstituted birds were significantly higher than in germ free birds, but were

still lower than in conventionally raised chickens. Thus, the diverse microbiota of conventional chickens was more efficient in inducing a humoral immune response, than just four bacteria in the long term. Additionally, the bacterial strain specific humoral immune response induced by probiotic *E. coli* Nissle, seemed to be stronger than the response caused by *Enterococcus faecium*.

This study illustrates the importance of early gut colonization with an adequate microflora for the development of the intestinal immune system in chickens. The achieved knowledge can help to identify a set of natural microorganisms, which could be applied to hatchlings under production conditions to support timely development of a fully functional immune system. This would represent a safe and effective method, as an alternative to antibiotic treatments, to contribute to the improvement of animal and public health in the long run.

9. LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Schat K.A., Kaspers B., Kaiser P., Avian Immunology, Elsevier, 2014.
- [2] Kamada N., Seo S.U., Chen G.Y., Nunez G., Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease, Nature reviews. Immunology. (2013) 13:321-335.
- [3] Murphy K., Travers P., Walport M., Janeway Immunologie, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, 2007.
- [4] Sommer F., Backhed F., The gut microbiota - masters of host development and physiology, Nature reviews. Microbiology. (2013) 11:227-238.
- [5] Wagner M., Germfree research: a basic study in host-contaminant relationship. II. Serologic observations in germfree animals, Bulletin of the New York Academy of Medicine. (1955) 31:236-239.
- [6] Levast B., Berri M., Wilson H.L., Meurens F., Salmon H., Development of gut immunoglobulin A production in piglet in response to innate and environmental factors, Developmental and comparative immunology. (2013) 44:235-244.
- [7] Liu S., The germ-free guinea-pig as an animal model of pigment gallstone, Zhongguo yi xue ke xue yuan xue bao. Acta Academiae Medicinae Sinicae. (1991) 13:185-188.
- [8] Thorbecke G.J., Gordon H.A., Wostman B., Wagner M., Reyniers J.A., Lymphoid Tissue and Serum Gamma Globulin in Young Germfree Chickens, The Journal of Infectious Diseases. (1957) 101:237-251.
- [9] Phillips A.W., Newcomb H.R., Lachapelle R., Balish E., Rearing of germfree and monocontaminated chicks in rigid plastic isolators, Applied microbiology. (1962) 10:224-230.
- [10] Honjo K., Hagiwara T., Itoh K., Takahashi E., Hirota Y., Immunohistochemical analysis of tissue distribution of B and T cells in germfree and conventional chickens, The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science. (1993) 55:1031-1034.
- [11] Pabst O., Herbrand H., Worbs T., Friedrichsen M., Yan S., Hoffmann M.W., Korner H., Bernhardt G., Pabst R., Forster R., Cryptopatches and isolated lymphoid follicles: dynamic lymphoid tissues dispensable for the generation of intraepithelial lymphocytes, European journal of immunology. (2005) 35:98-107.
- [12] Lillehoj H.S., Trout J.M., Avian gut-associated lymphoid tissues and intestinal immune responses to Eimeria parasites, Clinical microbiology reviews. (1996) 9:349-360.
- [13] Van Immerseel F., De Buck J., De Smet I., Mast J., Haesebrouck F., Ducatelle R., Dynamics of immune cell infiltration in the caecal lamina propria of chickens after neonatal infection with a Salmonella enteritidis strain, Developmental and comparative immunology.

(2002) 26:355-364.

[14] Ratcliffe M.J., Antibodies, immunoglobulin genes and the bursa of Fabricius in chicken B cell development, *Developmental & Comparative Immunology*. (2006) 30:101-118.

[15] Jeurissen S.H.m., Vervelde L., Janse E.M., Jeurissen S.H.m., Vervelde L., Janse E.M., Structure and function of lymphoid tissues of the chicken, *Poultry Science Reviews*. (1994) 5:183-207.

[16] Hoshi H., Mori T., Identification of the bursa-dependent and thymus-dependent areas in the tonsilla caecalis of chickens, *The Tohoku journal of experimental medicine*. (1973) 111:309-322.

[17] Olah I., Glick B., Structure of the germinal centers in the chicken caecal tonsil: light and electron microscopic and autoradiographic studies, *Poultry science*. (1979) 58:195-210.

[18] Jeurissen S.H., Janse E.M., Germinal centers develop at predilicted sites in the chicken spleen, *Advances in experimental medicine and biology*. (1994) 355:237-241.

[19] Mast J., Goddeeris B.M., CD57, a marker for B-cell activation and splenic ellipsoid-associated reticular cells of the chicken, *Cell and tissue research*. (1998) 291:107-115.

[20] Jeurissen S.H., Janse E.M., Ekino S., Nieuwenhuis P., Koch G., De Boer G.F., Monoclonal antibodies as probes for defining cellular subsets in the bone marrow, thymus, bursa of fabricius, and spleen of the chicken, *Veterinary immunology and immunopathology*. (1988) 19:225-238.

[21] Yasuda M., Kajiwarra E., Ekino S., Taura Y., Hirota Y., Horiuchi H., Matsuda H., Furusawa S., Immunobiology of chicken germinal center: I. Changes in surface Ig class expression in the chicken splenic germinal center after antigenic stimulation, *Developmental and comparative immunology*. (2003) 27:159-166.

[22] Olah I., Glick B., Dendritic cells in the bursal follicles and germinal centers of the chicken's caecal tonsil express vimentin but not desmin, *The Anatomical record*. (1995) 243:384-389.

[23] Cihak J., Hoffmann-Fezer G., Ziegler-Heibroek H.W., Stein H., Kaspers B., Chen C.H., Cooper M.D., Losch U., T cells expressing the V beta 1 T-cell receptor are required for IgA production in the chicken, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. (1991) 88:10951-10955.

[24] Bucy R.P., Chen C.L., Cihak J., Losch U., Cooper M.D., Avian T cells expressing gamma delta receptors localize in the splenic sinusoids and the intestinal epithelium, *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. (1988) 141:2200-2205.

[25] Kogut M.H., Iqbal M., He H., Philbin V., Kaiser P., Smith A., Expression and function of Toll-like receptors in chicken heterophils, *Developmental and comparative immunology*. (2005) 29:791-807.

- [26] Kogut M.H., Dynamics of a protective avian inflammatory response: the role of an IL-8-like cytokine in the recruitment of heterophils to the site of organ invasion by *Salmonella enteritidis*, *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*. (2002) 25:159-172.
- [27] Back O., Studies on the lymphocytes in the intestinal epithelium of the chicken. 2. Kinetics, *Acta pathologica et microbiologica Scandinavica. Section A, Pathology*. (1972) 80:91-96.
- [28] Back O., Studies on the lymphocytes in the intestinal epithelium of the chicken. 1. Ontogeny, *Acta pathologica et microbiologica Scandinavica. Section A, Pathology*. (1972) 80:84-90.
- [29] Gobel T.W., Kaspers B., Stangassinger M., NK and T cells constitute two major, functionally distinct intestinal epithelial lymphocyte subsets in the chicken, *International immunology*. (2001) 13:757-762.
- [30] Vervelde L., Jeurissen S.H., Postnatal development of intra-epithelial leukocytes in the chicken digestive tract: phenotypical characterization in situ, *Cell and tissue research*. (1993) 274:295-301.
- [31] Back O., Studies on the lymphocytes in the intestinal epithelium of the chicken. IV. Effect of bursectomy, *International archives of allergy and applied immunology*. (1970) 39:342-351.
- [32] Porter E.M., Bevins C.L., Ghosh D., Ganz T., The multifaceted Paneth cell, *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. (2002) 59:156-170.
- [33] Brisbin J.T., Gong J., Sharif S., Interactions between commensal bacteria and the gut-associated immune system of the chicken, *Animal health research reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases*. (2008) 9:101-110.
- [34] Sugiarto H., Yu P.L., Avian antimicrobial peptides: the defense role of beta-defensins, *Biochemical and biophysical research communications*. (2004) 323:721-727.
- [35] Iqbal M., Philbin V.J., Smith A.L., Expression patterns of chicken Toll-like receptor mRNA in tissues, immune cell subsets and cell lines, *Veterinary immunology and immunopathology*. (2005) 104:117-127.
- [36] Harris G., KuoLee R., Chen W., Role of Toll-like receptors in health and diseases of gastrointestinal tract, *World journal of gastroenterology : WJG*. (2006) 12:2149-2160.
- [37] Ratcliffe M.J., The ontogeny and cloning of B cells in the bursa of Fabricius, *Immunology today*. (1985) 6:223-227.
- [38] Madej J.P., Chrzastek K., Piasecki T., Wieliczko A., New insight into the structure, development, functions and popular disorders of bursa Fabricii, *Anatomia, histologia, embryologia*. (2013) 42:321-331.

- [39] Olah I., Glick B., The number and size of the follicular epithelium (FE) and follicles in the bursa of Fabricius, Poultry science. (1978) 57:1445-1450.
- [40] Schaffner T., Mueller J., Hess M.W., Cottier H., Sordat B., Ropke C., The bursa of Fabricius: a central organ providing for contact between the lymphoid system and intestinal content, Cellular immunology. (1974) 13:304-312.
- [41] Ekino S., Nawa Y., Tanaka K., Matsuno K., Fujii H., Kotani M., Suppression of immune response by isolation of the bursa of Fabricius from environmental stimuli, The Australian journal of experimental biology and medical science. (1980) 58:289-296.
- [42] Casteleyn C., Doom M., Lambrechts E., Van den Broeck W., Simoens P., Cornillie P., Locations of gut-associated lymphoid tissue in the 3-month-old chicken: a review, Avian pathology : journal of the W.V.P.A. (2010) 39:143-150.
- [43] Burns R.B., Histology and immunology of Peyer's patches in the domestic fowl (*Gallus domesticus*), Research in veterinary science. (1982) 32:359-367.
- [44] Jeurissen S.H., Wagenaar F., Janse E.M., Further characterization of M cells in gut-associated lymphoid tissues of the chicken, Poultry science. (1999) 78:965-972.
- [45] Befus A.D., Johnston N., Leslie G.A., Bienenstock J., Gut-associated lymphoid tissue in the chicken. I. Morphology, ontogeny, and some functional characteristics of Peyer's patches, Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950). (1980) 125:2626-2632.
- [46] Kitagawa H., Imagawa T., Uehara M., The apical caecal diverticulum of the chicken identified as a lymphoid organ, Journal of anatomy. (1996) 189 (Pt 3):667-672.
- [47] Uni Z., Geyra A., Ben-Hur H., Sklan D., Small intestinal development in the young chick: crypt formation and enterocyte proliferation and migration, British poultry science. (2000) 41:544-551.
- [48] Friedman A., Bar-shira E., Sklan D., Ontogeny of gut associated immune competence in the chick, World's Poultry Science Journal. (2003) 59:209-219.
- [49] Gomez Del Moral M., Fonfria J., Varas A., Jimenez E., Moreno J., Zapata A.G., Appearance and development of lymphoid cells in the chicken (*Gallus gallus*) caecal tonsil, The Anatomical record. (1998) 250:182-189.
- [50] Yason C.V., Summers B.A., Schat K.A., Pathogenesis of rotavirus infection in various age groups of chickens and turkeys: pathology, American journal of veterinary research. (1987) 48:927-938.
- [51] Dunon D., Courtois D., Vainio O., Six A., Chen C.H., Cooper M.D., Dangy J.P., Imhof B.A., Ontogeny of the immune system: gamma/delta and alpha/beta T cells migrate from thymus to the periphery in alternating waves, The Journal of experimental medicine. (1997) 186:977-988.

- [52] Hemmingsson E.J., Linna T.J., Ontogenetic studies on lymphoid cell traffic in the chicken. I. Cell migration from the bursa of Fabricius, *International archives of allergy and applied immunology*. (1972) 42:693-710.
- [53] Bar-Shira E., Sklan D., Friedman A., Establishment of immune competence in the avian GALT during the immediate post-hatch period, *Developmental and comparative immunology*. (2003) 27:147-157.
- [54] Lillehoj H.S., Chung K.S., Postnatal development of T-lymphocyte subpopulations in the intestinal intraepithelium and lamina propria in chickens, *Veterinary immunology and immunopathology*. (1992) 31:347-360.
- [55] Härtle S., Etablierung funktionell genomischer Techniken zur Untersuchung von Entwicklung und Funktion des aviären Immunsystems mit besonderem Fokus auf dem B-Zellsystem des Huhnes, Habilitation, München, 2012.
- [56] Lebacqz-Verheyden A.M., Vaerman J.P., Heremans J.F., Quantification and distribution of chicken immunoglobulins IgA, IgM and IgG in serum and secretions, *Immunology*. (1974) 27:683-692.
- [57] Wieland W.H., Orzaez D., Lammers A., Parmentier H.K., Verstegen M.W., Schots A., A functional polymeric immunoglobulin receptor in chicken (*Gallus gallus*) indicates ancient role of secretory IgA in mucosal immunity, *The Biochemical journal*. (2004) 380:669-676.
- [58] Kasahara Y., Chen C.H., Cooper M.D., Growth requirements for avian gamma delta T cells include exogenous cytokines, receptor ligation and in vivo priming, *European journal of immunology*. (1993) 23:2230-2236.
- [59] Arstila T.P., Toivanen P., Lassila O., Helper activity of CD4+ alpha beta T cells is required for the avian gamma delta T cell response, *European journal of immunology*. (1993) 23:2034-2037.
- [60] Boismenu R., Havran W.L., Modulation of epithelial cell growth by intraepithelial gamma delta T cells, *Science (New York, N.Y.)*. (1994) 266:1253-1255.
- [61] Vu Manh T.P., Marty H., Sibille P., Le Vern Y., Kaspers B., Dalod M., Schwartz-Cornil I., Quere P., Existence of conventional dendritic cells in *Gallus gallus* revealed by comparative gene expression profiling, *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. (2014) 192:4510-4517.
- [62] Annamalai T., Selvaraj R.K., Chicken chemokine receptors in T cells isolated from lymphoid organs and in splenocytes cultured with concanavalin A, *Poultry science*. (2010) 89:2419-2425.
- [63] Haury M., Kasahara Y., Schaal S., Bucy R.P., Cooper M.D., Intestinal T lymphocytes in the chicken express an integrin-like antigen, *European journal of immunology*. (1993) 23:313-319.

- [64] Kato L.M., Kawamoto S., Maruya M., Fagarasan S., Gut TFH and IgA: key players for regulation of bacterial communities and immune homeostasis, *Immunology and cell biology*. (2014) 92:49-56.
- [65] Arakawa H., Furusawa S., Ekino S., Yamagishi H., Immunoglobulin gene hyperconversion ongoing in chicken splenic germinal centers, *The EMBO journal*. (1996) 15:2540-2546.
- [66] Leslie G.A., Clem L.W., Phylogen of immunoglobulin structure and function. 3. Immunoglobulins of the chicken, *The Journal of experimental medicine*. (1969) 130:1337-1352.
- [67] Neuberger M.S., Ehrenstein M.R., Klix N., Jolly C.J., Yelamos J., Rada C., Milstein C., Monitoring and interpreting the intrinsic features of somatic hypermutation, *Immunol Rev*. (1998) 162:107-116.
- [68] Reynaud C.A., Anquez V., Grimal H., Weill J.C., A hyperconversion mechanism generates the chicken light chain preimmune repertoire, *Cell*. (1987) 48:379-388.
- [69] Arakawa H., Hauschild J., Buerstedde J.M., Requirement of the activation-induced deaminase (AID) gene for immunoglobulin gene conversion, *Science (New York, N.Y.)*. (2002) 295:1301-1306.
- [70] Suzuki K., Grigorova I., Phan T.G., Kelly L.M., Cyster J.G., Visualizing B cell capture of cognate antigen from follicular dendritic cells, *The Journal of experimental medicine*. (2009) 206:1485-1493.
- [71] Arakawa H., Kuma K., Yasuda M., Furusawa S., Ekino S., Yamagishi H., Oligoclonal development of B cells bearing discrete Ig chains in chicken single germinal centers, *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. (1998) 160:4232-4241.
- [72] Chen C.H., Gobel T.W., Kubota T., Cooper M.D., T cell development in the chicken, *Poultry science*. (1994) 73:1012-1018.
- [73] Erf G.F., Bottje W.G., Bersi T.K., CD4, CD8 and TCR defined T-cell subsets in thymus and spleen of 2- and 7-week old commercial broiler chickens, *Veterinary immunology and immunopathology*. (1998) 62:339-348.
- [74] Degen W.G., Daal N.v., Rothwell L., Kaiser P., Schijns V.E., Th1/Th2 polarization by viral and helminth infection in birds, *Veterinary microbiology*. (2005) 105:163-167.
- [75] St Paul M., Paolucci S., Sharif S., Treatment with ligands for toll-like receptors 2 and 5 induces a mixed T-helper 1- and 2-like response in chicken splenocytes, *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*. (2012) 32:592-598.
- [76] He H., Genovese K.J., Kogut M.H., Modulation of chicken macrophage effector function by T(H)1/T(H)2 cytokines, *Cytokine*. (2011) 53:363-369.

- [77] Gobel T.W., Schneider K., Schaerer B., Mejri I., Puehler F., Weigend S., Staeheli P., Kaspers B., IL-18 stimulates the proliferation and IFN-gamma release of CD4⁺ T cells in the chicken: conservation of a Th1-like system in a nonmammalian species, *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950). (2003) 171:1809-1815.
- [78] Shanmugasundaram R., Selvaraj R.K., Regulatory T cell properties of chicken CD4⁺CD25⁺ cells, *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950). (2011) 186:1997-2002.
- [79] Goto Y., Panea C., Nakato G., Cebula A., Lee C., Diez Marta G., Laufer Terri M., Ignatowicz L., Ivanov Ivaylo I., Segmented Filamentous Bacteria Antigens Presented by Intestinal Dendritic Cells Drive Mucosal Th17 Cell Differentiation, *Immunity*. (2014) 40:594-607.
- [80] Macpherson A.J., Uhr T., Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria, *Science* (New York, N.Y.). (2004) 303:1662-1665.
- [81] Macpherson A.J., Gatto D., Sainsbury E., Harriman G.R., Hengartner H., Zinkernagel R.M., A primitive T cell-independent mechanism of intestinal mucosal IgA responses to commensal bacteria, *Science* (New York, N.Y.). (2000) 288:2222-2226.
- [82] Chang S.-Y., Ko H.-J., Kweon M.-N., Mucosal dendritic cells shape mucosal immunity, *Exp Mol Med*. (2014) 46:e84.
- [83] Brisbin J.T., Zhou H., Gong J., Sabour P., Akbari M.R., Haghighi H.R., Yu H., Clarke A., Sarson A.J., Sharif S., Gene expression profiling of chicken lymphoid cells after treatment with *Lactobacillus acidophilus* cellular components, *Developmental and comparative immunology*. (2008) 32:563-574.
- [84] Haghighi H.R., Abdul-Careem M.F., Dara R.A., Chambers J.R., Sharif S., Cytokine gene expression in chicken cecal tonsils following treatment with probiotics and *Salmonella* infection, *Veterinary microbiology*. (2008) 126:225-233.
- [85] Belkaid Y., Hand Timothy W., Role of the Microbiota in Immunity and Inflammation, *Cell*. (2014) 157:121-141.
- [86] Littman D.R., Pamer E.G., Role of the commensal microbiota in normal and pathogenic host immune responses, *Cell host & microbe*. (2011) 10:311-323.
- [87] Zeissig S., Blumberg R.S., Life at the beginning: perturbation of the microbiota by antibiotics in early life and its role in health and disease, *Nature immunology*. (2014) 15:307-310.
- [88] Palmer C., Bik E.M., DiGiulio D.B., Relman D.A., Brown P.O., Development of the human infant intestinal microbiota, *PLoS biology*. (2007) 5:e177.
- [89] Yatsunenkov T., Rey F.E., Manary M.J., Trehan I., Dominguez-Bello M.G., Contreras M., Magris M., Hidalgo G., Baldassano R.N., Anokhin A.P., Heath A.C., Warner B., Reeder J., Kuczynski J., Caporaso J.G., Lozupone C.A., Lauber C., Clemente J.C., Knights D.,

Knight R., Gordon J.I., Human gut microbiome viewed across age and geography, *Nature*. (2012) 486:222-227.

[90] Renz H., Brandtzaeg P., Hornef M., The impact of perinatal immune development on mucosal homeostasis and chronic inflammation, *Nature reviews. Immunology*. (2012) 12:9-23.

[91] Goossens H., Ferech M., Vander Stichele R., Elseviers M., Outpatient antibiotic use in Europe and association with resistance: a cross-national database study, *Lancet*. (2005) 365:579-587.

[92] McCaig L.F., Besser R.E., Hughes J.M., Trends in antimicrobial prescribing rates for children and adolescents, *Jama*. (2002) 287:3096-3102.

[93] Dethlefsen L., Huse S., Sogin M.L., Relman D.A., The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing, *PLoS biology*. (2008) 6:e280.

[94] Jakobsson H.E., Jernberg C., Andersson A.F., Sjolund-Karlsson M., Jansson J.K., Engstrand L., Short-term antibiotic treatment has differing long-term impacts on the human throat and gut microbiome, *PloS one*. (2010) 5:e9836.

[95] Willing B.P., Russell S.L., Finlay B.B., Shifting the balance: antibiotic effects on host-microbiota mutualism, *Nature reviews. Microbiology*. (2011) 9:233-243.

[96] Sekirov I., Tam N.M., Jogova M., Robertson M.L., Li Y., Lupp C., Finlay B.B., Antibiotic-induced perturbations of the intestinal microbiota alter host susceptibility to enteric infection, *Infection and immunity*. (2008) 76:4726-4736.

[97] Croswell A., Amir E., Tegatz P., Barman M., Salzman N.H., Prolonged impact of antibiotics on intestinal microbial ecology and susceptibility to enteric Salmonella infection, *Infection and immunity*. (2009) 77:2741-2753.

[98] Dessein R., Gironella M., Vignal C., Peyrin-Biroulet L., Sokol H., Secher T., Lacas-Gervais S., Gratadoux J.J., Lafont F., Dagorn J.C., Ryffel B., Akira S., Langella P., Nunez G., Sirard J.C., Iovanna J., Simonet M., Chamaillard M., Toll-like receptor 2 is critical for induction of Reg3 beta expression and intestinal clearance of *Yersinia pseudotuberculosis*, *Gut*. (2009) 58:771-776.

[99] Olszak T., An D., Zeissig S., Vera M.P., Richter J., Franke A., Glickman J.N., Siebert R., Baron R.M., Kasper D.L., Blumberg R.S., Microbial exposure during early life has persistent effects on natural killer T cell function, *Science (New York, N.Y.)*. (2012) 336:489-493.

[100] An D., Oh S.F., Olszak T., Neves J.F., Avci F.Y., Erturk-Hasdemir D., Lu X., Zeissig S., Blumberg R.S., Kasper D.L., Sphingolipids from a symbiotic microbe regulate homeostasis of host intestinal natural killer T cells, *Cell*. (2014) 156:123-133.

- [101] Ley R.E., Lozupone C.A., Hamady M., Knight R., Gordon J.I., Worlds within worlds: evolution of the vertebrate gut microbiota, *Nature reviews. Microbiology*. (2008) 6:776-788.
- [102] Osawa N., Mitsuhashi S., Infection of germfree mice with shigella flexneri 3a, *The Japanese journal of experimental medicine*. (1964) 34:77-80.
- [103] O'Hara A.M., Shanahan F., The gut flora as a forgotten organ, *EMBO reports*. (2006) 7:688-693.
- [104] Yi P., Li L., The germfree murine animal: an important animal model for research on the relationship between gut microbiota and the host, *Veterinary microbiology*. (2012) 157:1-7.
- [105] Ivanov, II, Atarashi K., Manel N., Brodie E.L., Shima T., Karaoz U., Wei D., Goldfarb K.C., Santee C.A., Lynch S.V., Tanoue T., Imaoka A., Itoh K., Takeda K., Umesaki Y., Honda K., Littman D.R., Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria, *Cell*. (2009) 139:485-498.
- [106] Atarashi K., Nishimura J., Shima T., Umesaki Y., Yamamoto M., Onoue M., Yagita H., Ishii N., Evans R., Honda K., Takeda K., ATP drives lamina propria T(H)17 cell differentiation, *Nature*. (2008) 455:808-812.
- [107] Shaw M.H., Kamada N., Kim Y.G., Nunez G., Microbiota-induced IL-1 β , but not IL-6, is critical for the development of steady-state TH17 cells in the intestine, *The Journal of experimental medicine*. (2012) 209:251-258.
- [108] Chung H., Pamp S.J., Hill J.A., Surana N.K., Edelman S.M., Troy E.B., Reading N.C., Villablanca E.J., Wang S., Mora J.R., Umesaki Y., Mathis D., Benoist C., Relman D.A., Kasper D.L., Gut immune maturation depends on colonization with a host-specific microbiota, *Cell*. (2012) 149:1578-1593.
- [109] Umesaki Y., Setoyama H., Structure of the intestinal flora responsible for development of the gut immune system in a rodent model, *Microbes and infection / Institut Pasteur*. (2000) 2:1343-1351.
- [110] Umesaki Y., Okada Y., Matsumoto S., Imaoka A., Setoyama H., Segmented filamentous bacteria are indigenous intestinal bacteria that activate intraepithelial lymphocytes and induce MHC class II molecules and fucosyl asialo GM1 glycolipids on the small intestinal epithelial cells in the ex-germ-free mouse, *Microbiology and immunology*. (1995) 39:555-562.
- [111] Round J.L., Lee S.M., Li J., Tran G., Jabri B., Chatila T.A., Mazmanian S.K., The Toll-like receptor 2 pathway establishes colonization by a commensal of the human microbiota, *Science (New York, N.Y.)*. (2011) 332:974-977.
- [112] Atarashi K., Tanoue T., Shima T., Imaoka A., Kuwahara T., Momose Y., Cheng G., Yamasaki S., Saito T., Ohba Y., Taniguchi T., Takeda K., Hori S., Ivanov, II, Umesaki Y., Itoh K., Honda K., Induction of colonic regulatory T cells by indigenous *Clostridium* species, *Science (New York, N.Y.)*. (2011) 331:337-341.

- [113] Geuking M.B., Cahenzli J., Lawson M.A., Ng D.C., Slack E., Hapfelmeier S., McCoy K.D., Macpherson A.J., Intestinal bacterial colonization induces mutualistic regulatory T cell responses, *Immunity*. (2011) 34:794-806.
- [114] Arpaia N., Campbell C., Fan X., Dikiy S., van der Veeken J., deRoos P., Liu H., Cross J.R., Pfeffer K., Coffer P.J., Rudensky A.Y., Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation, *Nature*. (2013) 504:451-455.
- [115] Furusawa Y., Obata Y., Fukuda S., Endo T.A., Nakato G., Takahashi D., Nakanishi Y., Uetake C., Kato K., Kato T., Takahashi M., Fukuda N.N., Murakami S., Miyauchi E., Hino S., Atarashi K., Onawa S., Fujimura Y., Lockett T., Clarke J.M., Topping D.L., Tomita M., Hori S., Ohara O., Morita T., Koseki H., Kikuchi J., Honda K., Hase K., Ohno H., Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells, *Nature*. (2013) 504:446-450.
- [116] Uematsu S., Fujimoto K., Jang M.H., Yang B.G., Jung Y.J., Nishiyama M., Sato S., Tsujimura T., Yamamoto M., Yokota Y., Kiyono H., Miyasaka M., Ishii K.J., Akira S., Regulation of humoral and cellular gut immunity by lamina propria dendritic cells expressing Toll-like receptor 5, *Nature immunology*. (2008) 9:769-776.
- [117] Tezuka H., Abe Y., Iwata M., Takeuchi H., Ishikawa H., Matsushita M., Shiohara T., Akira S., Ohteki T., Regulation of IgA production by naturally occurring TNF/iNOS-producing dendritic cells, *Nature*. (2007) 448:929-933.
- [118] Mora J.R., Iwata M., Eksteen B., Song S.Y., Junt T., Senman B., Otipoby K.L., Yokota A., Takeuchi H., Ricciardi-Castagnoli P., Rajewsky K., Adams D.H., von Andrian U.H., Generation of gut-homing IgA-secreting B cells by intestinal dendritic cells, *Science (New York, N.Y.)*. (2006) 314:1157-1160.
- [119] Tezuka H., Abe Y., Asano J., Sato T., Liu J., Iwata M., Ohteki T., Prominent role for plasmacytoid dendritic cells in mucosal T cell-independent IgA induction, *Immunity*. (2011) 34:247-257.
- [120] Macpherson A.J., McCoy K.D., Johansen F.E., Brandtzaeg P., The immune geography of IgA induction and function, *Mucosal immunology*. (2008) 1:11-22.
- [121] Jakobsson H.E., Rodriguez-Pineiro A.M., Schutte A., Ermund A., Boysen P., Bemark M., Sommer F., Backhed F., Hansson G.C., Johansson M.E., The composition of the gut microbiota shapes the colon mucus barrier, *EMBO reports*. (2015) 16:164-177.
- [122] Salzman N.H., Hung K., Haribhai D., Chu H., Karlsson-Sjoberg J., Amir E., Tegatz P., Barman M., Hayward M., Eastwood D., Stoel M., Zhou Y., Sodergren E., Weinstock G.M., Bevins C.L., Williams C.B., Bos N.A., Enteric defensins are essential regulators of intestinal microbial ecology, *Nature immunology*. (2010) 11:76-83.
- [123] Gallo R.L., Hooper L.V., Epithelial antimicrobial defence of the skin and intestine, *Nature reviews. Immunology*. (2012) 12:503-516.
- [124] Putsep K., Axelsson L.G., Boman A., Midtvedt T., Normark S., Boman H.G.,

Andersson M., Germ-free and colonized mice generate the same products from enteric prodefensins, *The Journal of biological chemistry*. (2000) 275:40478-40482.

[125] Cash H.L., Whitham C.V., Behrendt C.L., Hooper L.V., Symbiotic bacteria direct expression of an intestinal bactericidal lectin, *Science (New York, N.Y.)*. (2006) 313:1126-1130.

[126] Hooper L.V., Stappenbeck T.S., Hong C.V., Gordon J.I., Angiogenins: a new class of microbicidal proteins involved in innate immunity, *Nature immunology*. (2003) 4:269-273.

[127] Franchi L., Kamada N., Nakamura Y., Burberry A., Kuffa P., Suzuki S., Shaw M.H., Kim Y.G., Nunez G., NLRC4-driven production of IL-1 β discriminates between pathogenic and commensal bacteria and promotes host intestinal defense, *Nature immunology*. (2012) 13:449-456.

[128] Schaubert J., Svanholm C., Termen S., Iffland K., Menzel T., Scheppach W., Melcher R., Agerberth B., Luhrs H., Gudmundsson G.H., Expression of the cathelicidin LL-37 is modulated by short chain fatty acids in colonocytes: relevance of signalling pathways, *Gut*. (2003) 52:735-741.

[129] Mebius R.E., Organogenesis of lymphoid tissues, *Nature reviews. Immunology*. (2003) 3:292-303.

[130] van de Pavert S.A., Mebius R.E., New insights into the development of lymphoid tissues, *Nature reviews. Immunology*. (2010) 10:664-674.

[131] Eberl G., Inducible lymphoid tissues in the adult gut: recapitulation of a fetal developmental pathway?, *Nature reviews. Immunology*. (2005) 5:413-420.

[132] Hamada H., Hiroi T., Nishiyama Y., Takahashi H., Masunaga Y., Hachimura S., Kaminogawa S., Takahashi-Iwanaga H., Iwanaga T., Kiyono H., Yamamoto H., Ishikawa H., Identification of multiple isolated lymphoid follicles on the antimesenteric wall of the mouse small intestine, *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. (2002) 168:57-64.

[133] Bouskra D., Brezillon C., Berard M., Werts C., Varona R., Boneca I.G., Eberl G., Lymphoid tissue genesis induced by commensals through NOD1 regulates intestinal homeostasis, *Nature*. (2008) 456:507-510.

[134] Reinhardt C., Bergentall M., Greiner T.U., Schaffner F., Ostergren-Lunden G., Petersen L.C., Ruf W., Backhed F., Tissue factor and PAR1 promote microbiota-induced intestinal vascular remodelling, *Nature*. (2012) 483:627-631.

[135] Trebichavsky I., Splichal I., Rada V., Splichalova A., Modulation of natural immunity in the gut by *Escherichia coli* strain Nissle 1917, *Nutrition reviews*. (2010) 68:459-464.

[136] Banasaz M., Norin E., Holma R., Midtvedt T., Increased enterocyte production in gnotobiotic rats mono-associated with *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Applied and environmental microbiology*. (2002) 68:3031-3034.

- [137] Saulnier N., Zocco M.A., Di Caro S., Gasbarrini G., Gasbarrini A., Probiotics and small bowel mucosa: Molecular aspects of their interactions, *Genes & nutrition*. (2006) 1:107-115.
- [138] van Baarlen P., Wells J.M., Kleerebezem M., Regulation of intestinal homeostasis and immunity with probiotic lactobacilli, *Trends in immunology*. (2013) 34:208-215.
- [139] Wells J.M., Immunomodulatory mechanisms of lactobacilli, *Microbial cell factories*. (2011) 10 Suppl 1:S17.
- [140] Kernbauer E., Ding Y., Cadwell K., An enteric virus can replace the beneficial function of commensal bacteria, *Nature*. (2014) 516:94-98.
- [141] Cebra J.J., Influences of microbiota on intestinal immune system development, *The American journal of clinical nutrition*. (1999) 69:1046s-1051s.
- [142] Stanley D., Geier M.S., Hughes R.J., Denman S.E., Moore R.J., Highly variable microbiota development in the chicken gastrointestinal tract, *PloS one*. (2013) 8:e84290.
- [143] Salanitro J.P., Fairchild I.G., Zgornicki Y.D., Isolation, culture characteristics, and identification of anaerobic bacteria from the chicken cecum, *Applied microbiology*. (1974) 27:678-687.
- [144] Stanley D., Hughes R.J., Moore R.J., Microbiota of the chicken gastrointestinal tract: influence on health, productivity and disease, *Applied microbiology and biotechnology*. (2014) 98:4301-4310.
- [145] Zhu X.Y., Joerger R.D., Composition of microbiota in content and mucus from cecae of broiler chickens as measured by fluorescent in situ hybridization with group-specific, 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes, *Poultry science*. (2003) 82:1242-1249.
- [146] Lu J., Idris U., Harmon B., Hofacre C., Maurer J.J., Lee M.D., Diversity and succession of the intestinal bacterial community of the maturing broiler chicken, *Applied and environmental microbiology*. (2003) 69:6816-6824.
- [147] Gong J., Forster R.J., Yu H., Chambers J.R., Wheatcroft R., Sabour P.M., Chen S., Molecular analysis of bacterial populations in the ileum of broiler chickens and comparison with bacteria in the cecum, *FEMS microbiology ecology*. (2002) 41:171-179.
- [148] Snel J., Heinen P.P., Blok H.J., Carman R.J., Duncan A.J., Allen P.C., Collins M.D., Comparison of 16S rRNA sequences of segmented filamentous bacteria isolated from mice, rats, and chickens and proposal of "Candidatus Arthromitus", *International journal of systematic bacteriology*. (1995) 45:780-782.
- [149] Sergeant M.J., Constantinidou C., Cogan T.A., Bedford M.R., Penn C.W., Pallen M.J., Extensive Microbial and Functional Diversity within the Chicken Cecal Microbiome, *PloS one*. (2014) 9:e91941.
- [150] Hegde S.N., Rolls B.A., Turvey A., Coates M.E., Influence of gut microflora on the

lymphoid tissue of the chicken (*Gallus domesticus*) and japanese quail (*coturnix coturnix japonica*), *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*. (1982) 72:205-209.

[151] Baba E., Nagaishi S., Fukata T., Arakawa A., The role of intestinal microflora on the prevention of *Salmonella* colonization in gnotobiotic chickens, *Poultry science*. (1991) 70:1902-1907.

[152] Mwangi W.N., Beal R.K., Powers C., Wu X., Humphrey T., Watson M., Bailey M., Friedman A., Smith A.L., Regional and global changes in TCR α T cell repertoires in the gut are dependent upon the complexity of the enteric microflora, *Developmental and comparative immunology*. (2010) 34:406-417.

[153] Kumar H., Salminen S., Verhagen H., Rowland I., Heimbach J., Banares S., Young T., Nomoto K., Lalonde M., Novel probiotics and prebiotics: road to the market, *Current opinion in biotechnology*. (2014) 32c:99-103.

[154] Zhu X.Y., Zhong T., Pandya Y., Joerger R.D., 16S rRNA-based analysis of microbiota from the cecum of broiler chickens, *Applied and environmental microbiology*. (2002) 68:124-137.

[155] Crhanova M., Hradecka H., Faldynova M., Matulova M., Havlickova H., Sisak F., Rychlik I., Immune response of chicken gut to natural colonization by gut microflora and to *Salmonella enterica* serovar enteritidis infection, *Infection and immunity*. (2011) 79:2755-2763.

[156] Brisbin J.T., Gong J., Orouji S., Esufali J., Mallick A.I., Parvizi P., Shewen P.E., Sharif S., Oral treatment of chickens with lactobacilli influences elicitation of immune responses, *Clinical and vaccine immunology : CVI*. (2011) 18:1447-1455.

[157] Haghighi H.R., Gong J., Gyles C.L., Hayes M.A., Sanei B., Parvizi P., Gisavi H., Chambers J.R., Sharif S., Modulation of antibody-mediated immune response by probiotics in chickens, *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. (2005) 12:1387-1392.

[158] Fajardo P., Pastrana L., Mendez J., Rodriguez I., Fucinos C., Guerra N.P., Effects of feeding of two potentially probiotic preparations from lactic acid bacteria on the performance and faecal microflora of broiler chickens, *TheScientificWorldJournal*. (2012) 2012:562635.

[159] Luo J., Zheng A., Meng K., Chang W., Bai Y., Li K., Cai H., Liu G., Yao B., Proteome changes in the intestinal mucosa of broiler (*Gallus gallus*) activated by probiotic *Enterococcus faecium*, *Journal of proteomics*. (2013) 91:226-241.

[160] Nissle A., Old and new experiences on therapeutic successes by restoration of the colonic flora with mutaflor in gastrointestinal diseases, *Die Medizinische Welt*. (1961) 29-30:1519-1523.

[161] Grozdanov L., Raasch C., Schulze J., Sonnenborn U., Gottschalk G., Hacker J., Dobrindt U., Analysis of the genome structure of the nonpathogenic probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917, *Journal of bacteriology*. (2004) 186:5432-5441.

- [162] Grosse C., Scherer J., Koch D., Otto M., Taudte N., Grass G., A new ferrous iron-uptake transporter, EfeU (YcdN), from *Escherichia coli*, *Molecular microbiology*. (2006) 62:120-131.
- [163] Barth S., Duncker S., Hempe J., Breves G., Baljer G., Bauerfeind R., *Escherichia coli* Nissle 1917 for probiotic use in piglets: evidence for intestinal colonization, *Journal of applied microbiology*. (2009) 107:1697-1710.
- [164] Altenhoefer A., Oswald S., Sonnenborn U., Enders C., Schulze J., Hacker J., Oelschlaeger T.A., The probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 interferes with invasion of human intestinal epithelial cells by different enteroinvasive bacterial pathogens, *FEMS immunology and medical microbiology*. (2004) 40:223-229.
- [165] Boudeau J., Glasser A.L., Julien S., Colombel J.F., Darfeuille-Michaud A., Inhibitory effect of probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 on adhesion to and invasion of intestinal epithelial cells by adherent-invasive *E. coli* strains isolated from patients with Crohn's disease, *Alimentary pharmacology & therapeutics*. (2003) 18:45-56.
- [166] Wehkamp J., Harder J., Wehkamp K., Wehkamp-von Meissner B., Schlee M., Enders C., Sonnenborn U., Nuding S., Bengmark S., Fellermann K., Schroder J.M., Stange E.F., NF-kappaB- and AP-1-mediated induction of human beta defensin-2 in intestinal epithelial cells by *Escherichia coli* Nissle 1917: a novel effect of a probiotic bacterium, *Infection and immunity*. (2004) 72:5750-5758.
- [167] Grabig A., Paclik D., Guzy C., Dankof A., Baumgart D.C., Erckenbrecht J., Raupach B., Sonnenborn U., Eckert J., Schumann R.R., Wiedenmann B., Dignass A.U., Sturm A., *Escherichia coli* strain Nissle 1917 ameliorates experimental colitis via toll-like receptor 2- and toll-like receptor 4-dependent pathways, *Infection and immunity*. (2006) 74:4075-4082.
- [168] Cross M.L., Ganner A., Teilab D., Fray L.M., Patterns of cytokine induction by gram-positive and gram-negative probiotic bacteria, *FEMS immunology and medical microbiology*. (2004) 42:173-180.
- [169] Hafez M., Hayes K., Goldrick M., Grencis R.K., Roberts I.S., The K5 capsule of *Escherichia coli* strain Nissle 1917 is important in stimulating expression of Toll-like receptor 5, CD14, MyD88, and TRIF together with the induction of interleukin-8 expression via the mitogen-activated protein kinase pathway in epithelial cells, *Infection and immunity*. (2010) 78:2153-2162.
- [170] Cukrowska B., LodInova-Zadnlkova R., Enders C., Sonnenborn U., Schulze J., Tlaskalova-Hogenova H., Specific proliferative and antibody responses of premature infants to intestinal colonization with nonpathogenic probiotic *E. coli* strain Nissle 1917, *Scandinavian journal of immunology*. (2002) 55:204-209.
- [171] Patzer S.I., Baquero M.R., Bravo D., Moreno F., Hantke K., The colicin G, H and X determinants encode microcins M and H47, which might utilize the catecholate siderophore receptors FepA, Cir, Fiu and IroN, *Microbiology (Reading, England)*. (2003) 149:2557-2570.
- [172] Zyrek A.A., Cichon C., Helms S., Enders C., Sonnenborn U., Schmidt M.A., *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*. (2007) 9:804-816.

[173] Ukena S.N., Singh A., Dringenberg U., Engelhardt R., Seidler U., Hansen W., Bleich A., Bruder D., Franzke A., Rogler G., Suerbaum S., Buer J., Gunzer F., Westendorf A.M., Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 inhibits leaky gut by enhancing mucosal integrity, *PloS one*. (2007) 2:e1308.

[174] Hancock V., Dahl M., Klemm P., Probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 outcompetes intestinal pathogens during biofilm formation, *Journal of medical microbiology*. (2010) 59:392-399.

[175] Splichal I., Fagerhol M.K., Trebichavsky I., Splichalova A., Schulze J., The effect of intestinal colonization of germ-free pigs with *Escherichia coli* on calprotectin levels in plasma, intestinal and bronchoalveolar lavages, *Immunobiology*. (2005) 209:681-687.

[176] Franz C.M.A.P., Huch M., Abriouel H., Holzapfel W., Gálvez A., Enterococci as probiotics and their implications in food safety, *International journal of food microbiology*. (2011) 151:125-140.

[177] European Food Safety Authority E., Scientific Opinion on the safety and efficacy of Bonvital (*Enterococcus faecium*) as a feed additive for sows, *EFSA Journal*. (2014) 12:3565.

[178] European Food Safety Authority E., Scientific Opinion on Bonvital (*Enterococcus faecium*) as a feed additive for chickens for fattening *EFSA Journal* (2010) 8:1636.

[179] Scharek L., Guth J., Reiter K., Weyrauch K.D., Taras D., Schwerk P., Schierack P., Schmidt M.F.G., Wieler L.H., Tedin K., Influence of a probiotic *Enterococcus faecium* strain on development of the immune system of sows and piglets, *Veterinary immunology and immunopathology*. (2005) 105:151-161.

[180] Kreuzer S., Janczyk P., Assmus J., Schmidt M.F., Brockmann G.A., Nockler K., No beneficial effects evident for *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 in weaned pigs infected with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104, *Applied and environmental microbiology*. (2012) 78:4816-4825.

[181] Cao G.T., Zeng X.F., Chen A.G., Zhou L., Zhang L., Xiao Y.P., Yang C.M., Effects of a probiotic, *Enterococcus faecium*, on growth performance, intestinal morphology, immune response, and cecal microflora in broiler chickens challenged with *Escherichia coli* K88, *Poultry science*. (2013) 92:2949-2955.

[182] Zhang L., Cao G.T., Zeng X.F., Zhou L., Ferket P.R., Xiao Y.P., Chen A.G., Yang C.M., Effects of *Clostridium butyricum* on growth performance, immune function, and cecal microflora in broiler chickens challenged with *Escherichia coli* K88, *Poultry science*. (2014) 93:46-53.

[183] Yang C.M., Cao G.T., Ferket P.R., Liu T.T., Zhou L., Zhang L., Xiao Y.P., Chen A.G., Effects of probiotic *Clostridium butyricum* on growth performance immune function and

cecal microflora in broiler chickens, Poultry science. (2012) 91:2121-2129.

[184] Bernardeau M., Guguen M., Vernoux J.P., Beneficial lactobacilli in food and feed: long-term use, biodiversity and proposals for specific and realistic safety assessments, FEMS Microbiology Reviews. (2006) 30:487-513.

[185] Servin A.L., Coconnier M.H., Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and interaction with pathogens, Best practice & research. Clinical gastroenterology. (2003) 17:741-754.

[186] Bouzaine T., Dauphin R.D., Thonart P., Urdaci M.C., Hamdi M., Adherence and colonization properties of *Lactobacillus rhamnosus* TB1, a broiler chicken isolate, Letters in applied microbiology. (2005) 40:391-396.

[187] Coeuret V., Gueguen M., Vernoux J.P., Numbers and strains of lactobacilli in some probiotic products, International journal of food microbiology. (2004) 97:147-156.

[188] Nikoskelainen S., Ouwehand A.C., Bylund G., Salminen S., Lilius E.M., Immune enhancement in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by potential probiotic bacteria (*Lactobacillus rhamnosus*), Fish & shellfish immunology. (2003) 15:443-452.

[189] Yan F., Cao H., Cover T.L., Washington M.K., Shi Y., Liu L., Chaturvedi R., Peek R.M., Jr., Wilson K.T., Polk D.B., Colon-specific delivery of a probiotic-derived soluble protein ameliorates intestinal inflammation in mice through an EGFR-dependent mechanism, The Journal of Clinical Investigation. (2011) 121:2242-2253.

[190] El-Nezami H., Mykkanen H., Kankaanpaa P., Salminen S., Ahokas J., Ability of *Lactobacillus* and *Propionibacterium* strains to remove aflatoxin B, from the chicken duodenum, Journal of food protection. (2000) 63:549-552.

[191] Foster L.M., Tompkins T.A., Dahl W.J., A comprehensive post-market review of studies on a probiotic product containing *Lactobacillus helveticus* R0052 and *Lactobacillus rhamnosus* R0011, Beneficial microbes. (2011) 2:319-334.

[192] Seo M., Inoue I., Tanaka M., Matsuda N., Nakano T., Awata T., Katayama S., Alpers D.H., Komoda T., *Clostridium butyricum* MIYAIRI 588 improves high-fat diet-induced non-alcoholic fatty liver disease in rats, Digestive diseases and sciences. (2013) 58:3534-3544.

[193] Yang C.M., Cao G.T., Ferket P.R., Liu T.T., Zhou L., Zhang L., Xiao Y.P., Chen A.G., Effects of probiotic, *Clostridium butyricum*, on growth performance, immune function, and cecal microflora in broiler chickens, Poultry science. (2012) 91:2121-2129.

[194] Seki H., Shiohara M., Matsumura T., Miyagawa N., Tanaka M., Komiyama A., Kurata S., Prevention of antibiotic-associated diarrhea in children by *Clostridium butyricum* MIYAIRI, Pediatrics international : official journal of the Japan Pediatric Society. (2003) 45:86-90.

[195] EFSA, Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP);

Scientific Opinion on Miya-Gold®(*Clostridium butyricum*) as a feed additive for weaned piglets, minor weaned porcine species and minor avian species, ESFA Journal. (2011) 9:1951.

[196] Takahashi M., Taguchi, H., Yamaguchi, H., Osaki, T., Komatsu, A. and Kamiya, S, The effect of probiotic treatment with *Clostridium butyricum* on enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infection in mice, FEMS Immunology & Medical Microbiology. (2004) 41:219–226.

[197] Ducluzeau R., Ladire M., Callut C., Raibaud P., Abrams G.D., Antagonistic effect of extremely oxygen-sensitive clostridia from the microflora of conventional mice and of *Escherichia coli* against *Shigella flexneri* in the digestive tract of gnotobiotic mice, Infection and immunity. (1977) 17:415-424.

[198] Takahashi M., Taguchi H., Yamaguchi H., Osaki T., Komatsu A., Kamiya S., The effect of probiotic treatment with *Clostridium butyricum* on enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infection in mice, FEMS Immunology & Medical Microbiology. (2004) 41:219-226.

[199] Takahashi M., Taguchi, H., Yamaguchi, H., Osaki, T., Kamiya, S. , Studies of the effect of *Clostridium butyricum* on *Helicobacter pylori* in several test models including gnotobiotic mice, J. Med. Microbiol. (2000) 49:635-642.

[200] Popoff M.R., Szylit O., Ravisse P., Dabard J., Ohayon H., Experimental cecitis in gnotoxenic chickens monoassociated with *Clostridium butyricum* strains isolated from patients with neonatal necrotizing enterocolitis, Infection and immunity. (1985) 47:697-703.

[201] Le Bars J., Mise au point d'un protocole pour l'obtention de poulets axeniques, Annales de Recherches Veterinaires. (1976) 7: 383-396

[202] Tregaskes C.A., Bumstead N., Davison T.F., Young J.R., Chicken B-cell marker chB6 (Bu-1) is a highly glycosylated protein of unique structure, Immunogenetics. (1996) 44:212-217.

[203] Rothwell C.J., Vervelde L., Davison T.F., Identification of chicken Bu-1 alloantigens using the monoclonal antibody AV20, Veterinary immunology and immunopathology. (1996) 55:225-234.

[204] Chan M.M., Chen C.L., Ager L.L., Cooper M.D., Identification of the avian homologues of mammalian CD4 and CD8 antigens, Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950). (1988) 140:2133-2138.

[205] Luhtala M., Koskinen R., Toivanen P., Vainio O., Characterization of chicken CD8-specific monoclonal antibodies recognizing novel epitopes, Scandinavian journal of immunology. (1995) 42:171-174.

[206] Sowder J.T., Chen C.L., Ager L.L., Chan M.M., Cooper M.D., A large subpopulation of avian T cells express a homologue of the mammalian T gamma/delta receptor, The Journal of experimental medicine. (1988) 167:315-322.

- [207] Chen C.L., Cihak J., Losch U., Cooper M.D., Differential expression of two T cell receptors, TcR1 and TcR2, on chicken lymphocytes, *European journal of immunology*. (1988) 18:539-543.
- [208] Mast J., Goddeeris B.M., Peeters K., Vandesande F., Berghman L.R., Characterisation of chicken monocytes, macrophages and interdigitating cells by the monoclonal antibody KUL01, *Veterinary immunology and immunopathology*. (1998) 61:343-357.
- [209] Erhard M.H., Von Quistorp I., Schraner I., Jungling A., Kaspers B., Schmidt P., Kuhlmann R., Development of specific enzyme-linked immunosorbent antibody assay systems for the detection of chicken immunoglobulins G, M, and A using monoclonal antibodies, *Poultry science*. (1992) 71:302-310.
- [210] Schmieder S., Transkriptomische Analyse der Bursa Fabricii des Huhns zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten, Dissertation, München, 2011.
- [211] Leitner G., Melamed D., Drabkin N., Heller E.D., An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies against *Escherichia coli*: association between indirect hemagglutination test and survival, *Avian diseases*. (1990) 34:58-62.
- [212] Röhl S.H., Identifizierung Interferon-regulierter Gene beim Haushuhn, Dissertation, München, 2013.
- [213] Kim E.J., Park J.S., Um S.J., Identification and characterization of HIPK2 interacting with p73 and modulating functions of the p53 family in vivo, *The Journal of biological chemistry*. (2002) 277:32020-32028.
- [214] Möller A., Funktionelle Analyse der Lokalisation und Regulation der humanen Homeodomänen-Interagierenden Protein Kinase 2 (HIPK2), Hamburg, 2003.
- [215] Waerner T., Gardellin P., Pfizenmaier K., Weith A., Kraut N., Human RERE is localized to nuclear promyelocytic leukemia oncogenic domains and enhances apoptosis, *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research*. (2001) 12:201-210.
- [216] Barone S., Fussell S.L., Singh A.K., Lucas F., Xu J., Kim C., Wu X., Yu Y., Amlal H., Seidler U., Zuo J., Soleimani M., Slc2a5 (Glut5) is essential for the absorption of fructose in the intestine and generation of fructose-induced hypertension, *The Journal of biological chemistry*. (2009) 284:5056-5066.
- [217] Williams Y.N., Baba H., Hayashi S., Ikai H., Sugita T., Tanaka S., Miyasaka N., Kubota T., Dipeptidyl peptidase IV on activated T cells as a target molecule for therapy of rheumatoid arthritis, *Clinical and experimental immunology*. (2003) 131:68-74.
- [218] Ithychanda S.S., Das M., Ma Y.Q., Ding K., Wang X., Gupta S., Wu C., Plow E.F., Qin J., Migfilin, a molecular switch in regulation of integrin activation, *The Journal of biological chemistry*. (2009) 284:4713-4722.

- [219] Maguer-Satta V., Besancon R., Bachelard-Cascales E., Concise review: neutral endopeptidase (CD10): a multifaceted environment actor in stem cells, physiological mechanisms, and cancer, *Stem cells* (Dayton, Ohio). (2011) 29:389-396.
- [220] Tavano F., Palmieri O., di Mola F.F., Latiano A., Burbaci F.P., Valvano M.R., Corritore G., Augello B., Merla G., Annese V., Andriulli A., di Sebastiano P., Genetic variants of membrane metallopeptidase genes in inflammatory bowel diseases, *Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver*. (2013) 45:1003-1010.
- [221] Varanasi U., Chu R., Chu S., Espinosa R., LeBeau M.M., Reddy J.K., Isolation of the human peroxisomal acyl-CoA oxidase gene: organization, promoter analysis, and chromosomal localization, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. (1994) 91:3107-3111.
- [222] Ylikallio E., Poyhonen R., Zimon M., De Vriendt E., Hilander T., Paetau A., Jordanova A., Lonnqvist T., Tyynismaa H., Deficiency of the E3 ubiquitin ligase TRIM2 in early-onset axonal neuropathy, *Human molecular genetics*. (2013) 22:2975-2983.
- [223] Kunas T.A., Wallen M.J., Kulomaa M.S., Induction of chicken avidin and related mRNAs after bacterial infection, *Biochimica et biophysica acta*. (1993) 1216:441-445.
- [224] Carroll R.E., Matkowskyj K., Sauntharajah Y., Sekosan M., Battey J.F., Benya R.V., Contribution of gastrin-releasing peptide and its receptor to villus development in the murine and human gastrointestinal tract, *Mechanisms of Development*. (2002) 113:121-130.
- [225] Salisbury J.G., Nicholls T.J., Lammerding A.M., Turnidge J., Nunn M.J., A risk analysis framework for the long-term management of antibiotic resistance in food-producing animals, *International journal of antimicrobial agents*. (2002) 20:153-164.
- [226] Lathers C.M., Role of veterinary medicine in public health: antibiotic use in food animals and humans and the effect on evolution of antibacterial resistance, *Journal of clinical pharmacology*. (2001) 41:595-599.
- [227] Menz J., Schneider M., Kummerer K., Usage pattern-based exposure screening as a simple tool for the regional priority-setting in environmental risk assessment of veterinary antibiotics: A case study of north-western Germany, *Chemosphere*. (2015) 127c:42-48.
- [228] Molloy M.J., Bouladoux N., Belkaid Y., Intestinal microbiota: shaping local and systemic immune responses, *Seminars in immunology*. (2012) 24:58-66.
- [229] Hooper L.V., Littman D.R., Macpherson A.J., Interactions between the microbiota and the immune system, *Science* (New York, N.Y.). (2012) 336:1268-1273.
- [230] Pleasants J.R., Rearing germfree cesarean-born rats, mice, and rabbits through weaning, *Annals of the New York Academy of Sciences*. (1959) 78:116-126.
- [231] Gordon H.A., Bruckner-Kardoss E., Effect of normal microbial flora on intestinal

surface area, *The American journal of physiology*. (1961) 201:175-178.

[232] Kemgang T.S., Kapila S., Shanmugam V.P., Kapila R., Cross-talk between probiotic lactobacilli and host immune system, *Journal of applied microbiology*. (2014) 117:303-319.

[233] Laukova A., Guba P., Nemcova R., Vasilkova Z., Reduction of Salmonella in gnotobiotic Japanese quails caused by the enterocin A-producing EK13 strain of *Enterococcus faecium*, *Veterinary research communications*. (2003) 27:275-280.

[234] Sato R., Tanaka M., Intestinal distribution and intraluminal localization of orally administered *Clostridium butyricum* in rats, *Microbiology and immunology*. (1997) 41:665-671.

[235] Davies L.C., Jenkins S.J., Allen J.E., Taylor P.R., Tissue-resident macrophages, *Nature immunology*. (2013) 14:986-995.

[236] Witherden D.A., Havran W.L., Molecular aspects of epithelial gammadelta T cell regulation, *Trends in immunology*. (2011) 32:265-271.

[237] Hediger M.A., Romero M.F., Peng J.B., Rolfs A., Takanaga H., Bruford E.A., The ABCs of solute carriers: physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteins Introduction, *Pflügers Archiv : European journal of physiology*. (2004) 447:465-468.

[238] Roediger W.E., Moore A., Effect of short-chain fatty acid on sodium absorption in isolated human colon perfused through the vascular bed, *Digestive diseases and sciences*. (1981) 26:100-106.

[239] Cladaras C., Hadzopoulou-Cladaras M., Nolte R.T., Atkinson D., Zannis V.I., The complete sequence and structural analysis of human apolipoprotein B-100: relationship between apoB-100 and apoB-48 forms, *The EMBO journal*. (1986) 5:3495-3507.

[240] Weisiger R.A., Cytosolic fatty acid binding proteins catalyze two distinct steps in intracellular transport of their ligands, *Molecular and cellular biochemistry*. (2002) 239:35-43.

[241] Backhed F., Ding H., Wang T., Hooper L.V., Koh G.Y., Nagy A., Semenkovich C.F., Gordon J.I., The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. (2004) 101:15718-15723.

[242] Hegde S.N., Rolls B.A., Coates M.E., The effects of the gut microflora and dietary fibre on energy utilization by the chick, *The British journal of nutrition*. (1982) 48:73-80.

[243] Muramatsu T., Kodama H., Morishita T., Furuse M., Okumura J., Effect of intestinal microflora on digestible energy and fiber digestion in chickens fed a high-fiber diet, *American journal of veterinary research*. (1991) 52:1178-1181.

[244] Muramatsu T., Nakajima S., Okumura J., Modification of energy metabolism by the

presence of the gut microflora in the chicken, *The British journal of nutrition*. (1994) 71:709-717.

[245] Xu J., Bjursell M.K., Himrod J., Deng S., Carmichael L.K., Chiang H.C., Hooper L.V., Gordon J.I., A genomic view of the human-Bacteroides thetaiotaomicron symbiosis, *Science* (New York, N.Y.). (2003) 299:2074-2076.

[246] Adachi T., Wakabayashi C., Nakayama T., Yakura H., Tsubata T., CD72 negatively regulates signaling through the antigen receptor of B cells, *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950). (2000) 164:1223-1229.

[247] Reddy S.K., Hu T., Gudivada R., Staines K.A., Wright K.E., Vickerstaff L., Kothlow S., Hunt L.G., Butter C., Kaspers B., Young J.R., The BAFF-Interacting receptors of chickens, *Developmental and comparative immunology*. (2008) 32:1076-1087.

[248] Imai T., Baba M., Nishimura M., Kakizaki M., Takagi S., Yoshie O., The T cell-directed CC chemokine TARC is a highly specific biological ligand for CC chemokine receptor 4, *The Journal of biological chemistry*. (1997) 272:15036-15042.

[249] Galic S., Sachithanandan N., Kay T.W., Steinberg G.R., Suppressor of cytokine signalling (SOCS) proteins as guardians of inflammatory responses critical for regulating insulin sensitivity, *The Biochemical journal*. (2014) 461:177-188.

[250] Johansen F.E., Kaetzel C.S., Regulation of the polymeric immunoglobulin receptor and IgA transport: new advances in environmental factors that stimulate pIgR expression and its role in mucosal immunity, *Mucosal immunology*. (2011) 4:598-602.

[251] Kumar R., DiMenna L.J., Chaudhuri J., Evans T., Biological function of activation-induced cytidine deaminase (AID), *Biomedical journal*. (2014) 37:269-283.

[252] Velasquez-Manoff M., Gut Microbiome: The Peacekeepers, *Nature*. (2015) 518:S3-S11.

[253] Jacobi C.A., Malfertheiner P., *Escherichia coli* Nissle 1917 (Mutaflor): new insights into an old probiotic bacterium, *Digestive diseases* (Basel, Switzerland). (2011) 29:600-607.

[254] Mast J., Goddeeris B.M., Development of immunocompetence of broiler chickens, *Veterinary immunology and immunopathology*. (1999) 70:245-256.

[255] Lamouse-Smith E.S., Tzeng A., Starnbach M.N., The intestinal flora is required to support antibody responses to systemic immunization in infant and germ free mice, *PloS one*. (2011) 6:e27662.

[256] Ohwaki M., Yasutake N., Yasui H., Ogura R., A comparative study on the humoral immune responses in germ-free and conventional mice, *Immunology*. (1977) 32:43-48.

[257] Wilks J., Beilinson H., Theriault B., Chervonsky A., Golovkina T., Antibody-mediated immune control of a retrovirus does not require the microbiota, *Journal of virology*. (2014) 88:6524-6527.

[258] Sprinz H., Kundel D.W., Dammin G.J., Horowitz R.E., Schneider H., Formal S.B., The response of the germfree guinea pig to oral bacterial challenge with *Escherichia coli* and *Shigella flexneri*, *The American journal of pathology*. (1961) 39:681-695.

10. ANHANG

A Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Die Bezugsquellen wurden als Hochzahlen entsprechend nachfolgender Tabelle in Kapitel 4 (Material und Methoden) integriert:

1. JohnsonDiversey, Frankreich
2. Dietex, Frankreich
3. Promega Corp., Mannheim
4. Thermo Fisher Scientific, Dreieich
5. Hartenstein, Würzburg
6. AIR LIQUIDE Deutschland GmbH, Düsseldorf
7. Sigma Aldrich, Saint Louis/USA
8. Nunc, Wiesbaden
9. Mediate, Burgdorf
10. Applichem, Darmstadt
11. Sigma, Deisenhofen
12. CLN GmbH, Freising
13. Linaris, Wertheim
14. Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., New Market/UK
15. Southern Biotechnologies, Birmingham/USA
16. Beckmann Coulter GmbH, Krefeld
17. Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
18. Agilent Technologies Deutschland GmbH, Böblingen
19. Qiagen GmbH, Hilden
20. Becton Dickinson GmbH/BD Biosciences, Heidelberg
21. Bio-Rad AbD Serotec GmbH, Puchheim

-
22. Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Ulrich Dobrindt, Westfälische Wilhelms-Universität Münster
 23. Fermentas GmbH, St- Leon-Rot
 24. MWG, Ebersberg
 25. Qiagen GmbH, Hilden
 26. Sarstedt, Nümbrecht
 27. Merck, Darmstadt
 28. Stereospecific Detection Technologies, Baesweiler
 29. Invitrogen GmbH, Karlsruhe
 30. Biochrom, Berlin
 31. Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. David C. B. Taras, Lohmann Animal Health
 32. Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Catherine Schouler, INRA Tours
 33. SLT Labinstruments, Crailsheim
 34. Tecan, Crailsheim

B. Laborgeräte in alphabetischer Reihenfolge

Gerät	Bezeichnung	Herstellerfirma
Analysewaage	Mettler PJ400	Mettler-Toledo GmbH, Gießen
Bioanalyzer	Agilent 2100 Bioanalyzer	Applied Biosciences, Darmstadt
Dampfsterilisator	Varioklav Typ 500E	Thermo Scientific, München
ELISA-Washer	Tecan M8/4R Columbus plus	SLT Labinstruments, Crailsheim
Flockeneisbereiter	Scotsman AF100	Scotsman Ice Systems, Mailand, Italien
Handzentrifuge	Rotilabo®-Mini-Zentrifuge	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe
Homogenisator	Precellys24	Peqlab, Erlangen
Horizontalschüttler	KL-2	Edmund Bühler GmbH
Hybridisierungssofen	G2545A	Sheldon Manufacturing, Inc., Cornelius/USA
Magnetrührer	IKAMAG®RCT	IKA®Werke GmbH + Co.KG, Staufen
Microarrayscanner	Agilent G2505C Scanner	Agilent, Böblingen
Mikroskop	Axioskop Kamera: AxioCam MRC5	Zeiss, Jena
Mikrozentrifuge	5415R	Eppendorf AG, Hamburg
Kryotom	CryoStar NX70	ThermoFisher, Dreieich
PCR-Workstation	Ultraviolet Sterilizing PCR Workstation	Peqlab, Erlangen
pH-Meter	Sartorius PB-11 mit Glaselektrode PY-P10	
Platten-Photometer	Sunrise-Remote Software: x-read Plus	Tecan, Crailsheim
Plattenwaschgerät	ELISA-Washer Atlantis 2	Asys, Dornstadt
qPCR System	7300 Real-Time PCR System	Applied Biosciences, Darmstadt
Schüttelinkubator	Schüttler KS15A mit Inkubatorhaube TH15	Edmund Bühler GmbH, Hechingen
Schüttler	Kombischüttler KL-2	Johanna-Otto GmbH, Hechingen
Sicherheitswerkbank	Mikroflow	Nunc, Wiesbaden
Spectrophotometer	NanoDrop ND-100	Peqlab, Erlangen
Stickstofftank	Locator 6 Plus	Barnstead Thermolyne, Dubuque/USA
Tauml-Rollenmischer	RM5	neoLab, Heidelberg
Thermocycler	MJ Mini	Bio-Rad, München
Thermoschüttler	TS 1 Thermoshaker	Biometra, Göttingen
Überkopf-Schüttler	Multi Bio RS24	Biosan, Riga, Lettland
Vortex-Mixer	GVLab®	Gilson Inc., Middleton, USA
Wärmeschränk	neoLab Universal Wärmeschränk Basic 39I	neoLab Migge Laborbedarfs-Gm
Zentrifuge	Sigma 4K15C	Sigma, Deisenhofen

C. Abbildungen

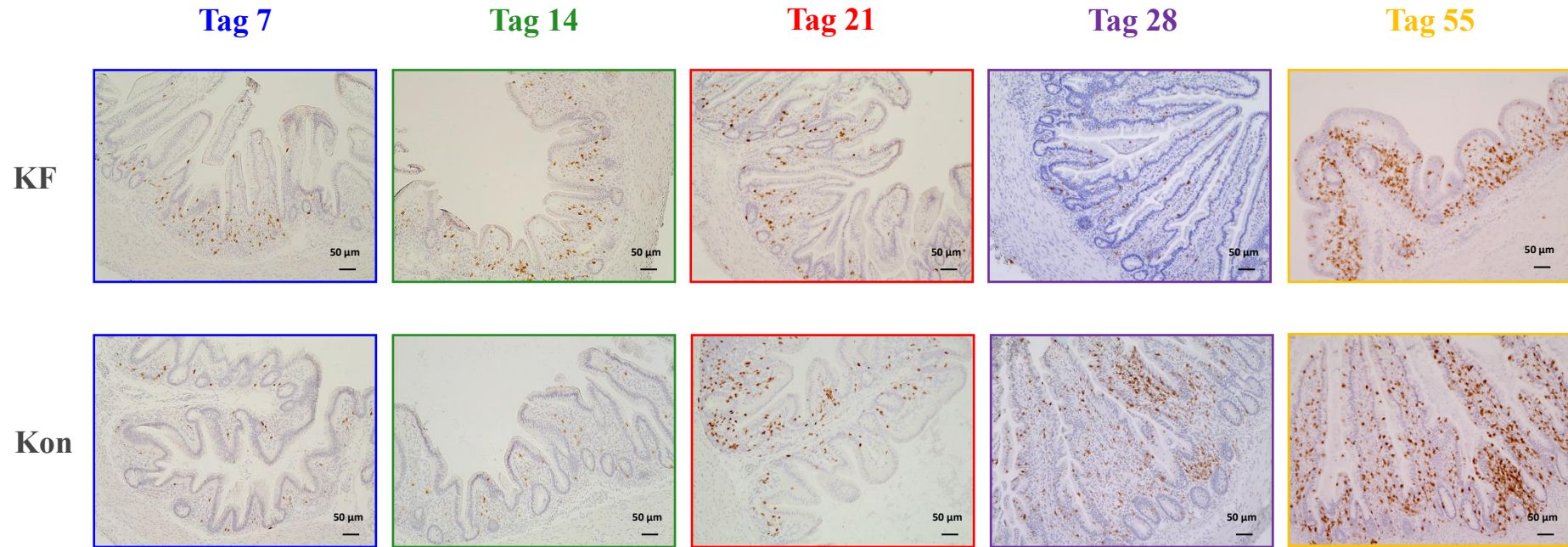


Abbildung 45: $\gamma\delta$ T-Lymphozyten im Caecum

Immunhistologische Färbung des Caecums von keimfrei gehaltenen (KF) und konventionell gehaltenen (Kon) Hühnern an Tag 7, 14, 21, 28 und 55 nach dem Schlupf mit dem mAK TCR1. Vergrößerung 10x.

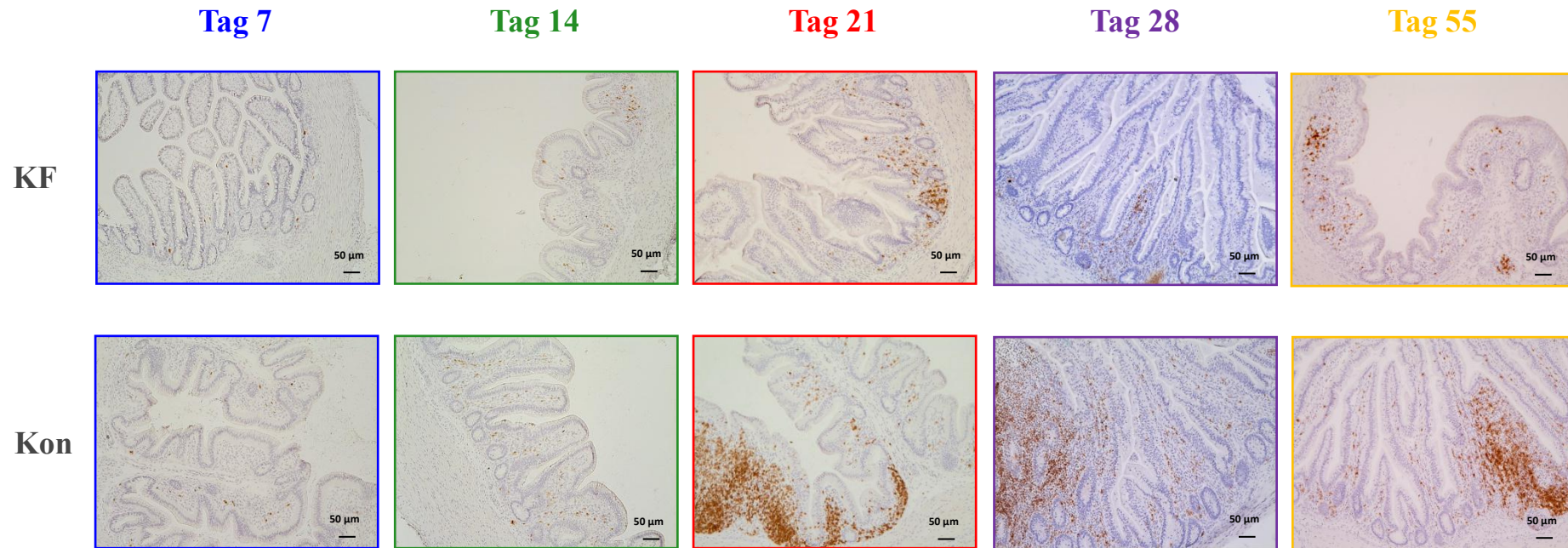


Abbildung 46: $\alpha\beta$ T-Lymphozyten im Caecum

Immunhistologische Färbung des Caecums von keimfrei gehaltenen (KF) und konventionell gehaltenen (Kon) Hühnern an Tag 7, 14, 21, 28 und 55 nach dem Schlupf mit dem mAK TCR2. Vergrößerung 10x.

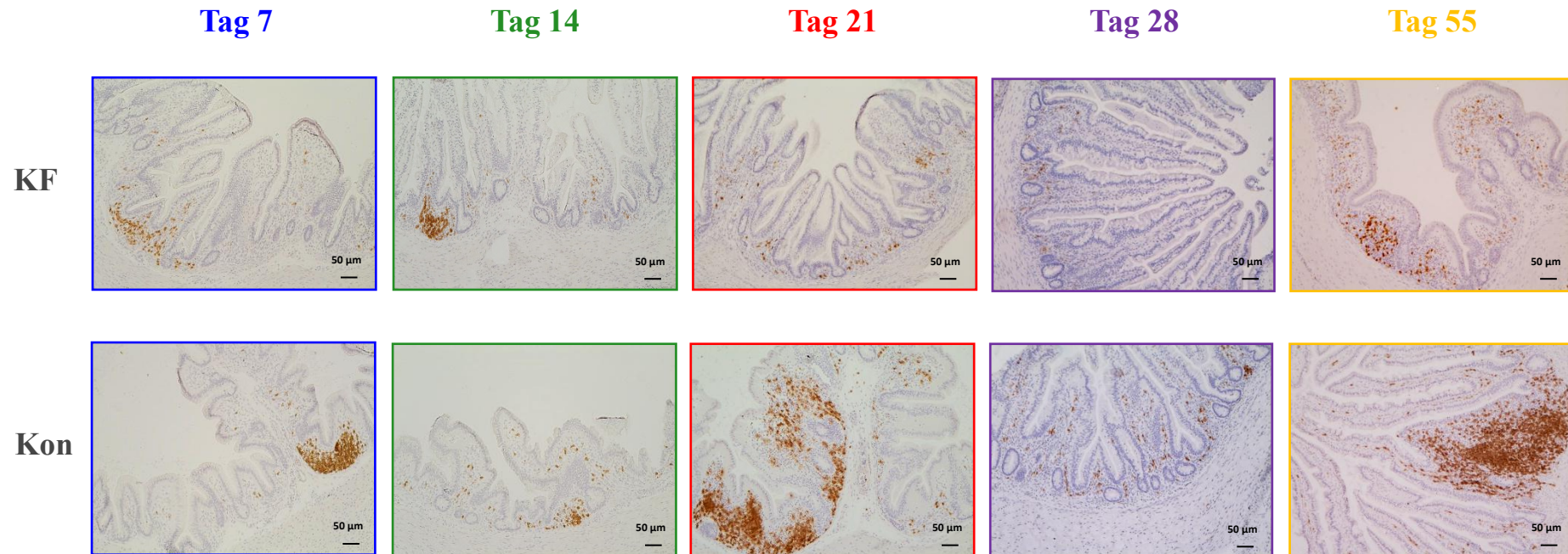


Abbildung 47: CD4⁺ T-Lymphozyten im Caecum

Immunhistologische Färbung des Caecums von keimfrei gehaltenen (KF) und konventionell gehaltenen (Kon) Hühnern an Tag 7, 14, 21, 28 und 55 nach dem Schlupf mit dem mAK CT4. Vergrößerung 10x.

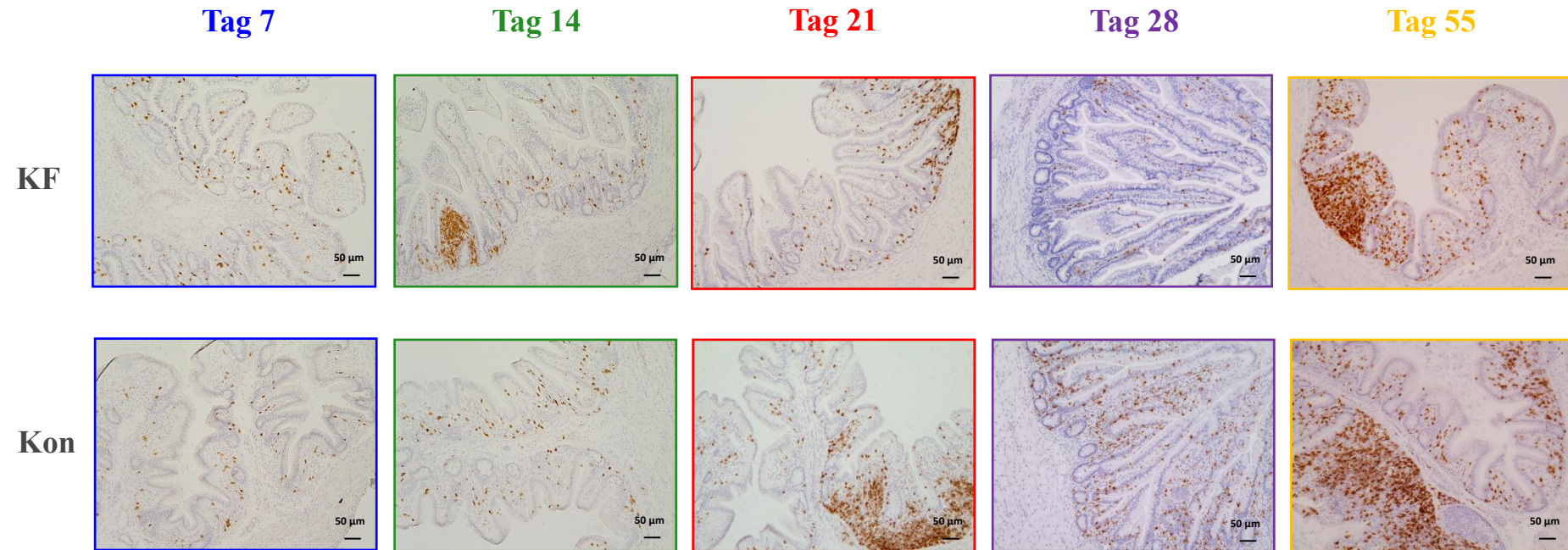


Abbildung 48: CD8⁺ T-Lymphozyten im Caecum

Immunhistologische Färbung des Caecums von keimfrei gehaltenen (KF) und konventionell gehaltenen (Kon) Hühnern an Tag 7, 14, 21, 28 und 55 nach dem Schlupf mit dem mAK CT8. Vergrößerung 10x.

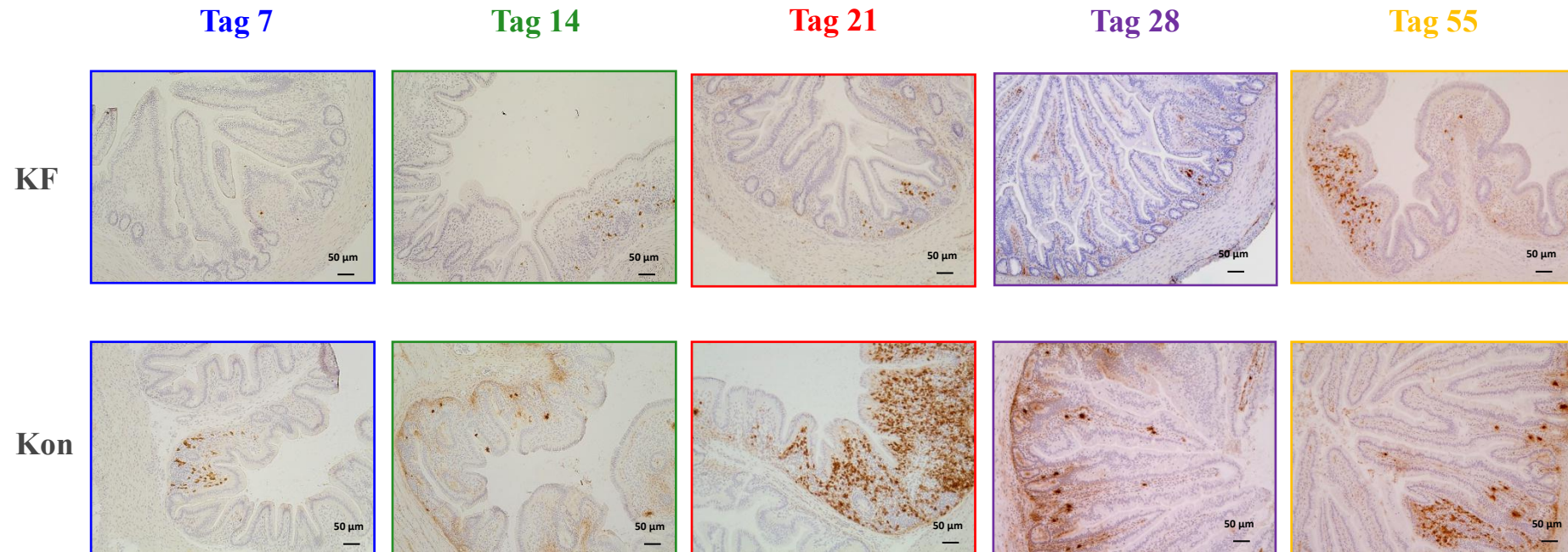


Abbildung 49: IgM⁺ Zellen im Caecum

Immunhistologische Färbung des Caecums von keimfrei gehaltenen (KF) und konventionell gehaltenen (Kon) Hühnern an Tag 7, 14, 21, 28 und 55 nach dem Schlupf mit dem mAK M1. Vergrößerung 10x.

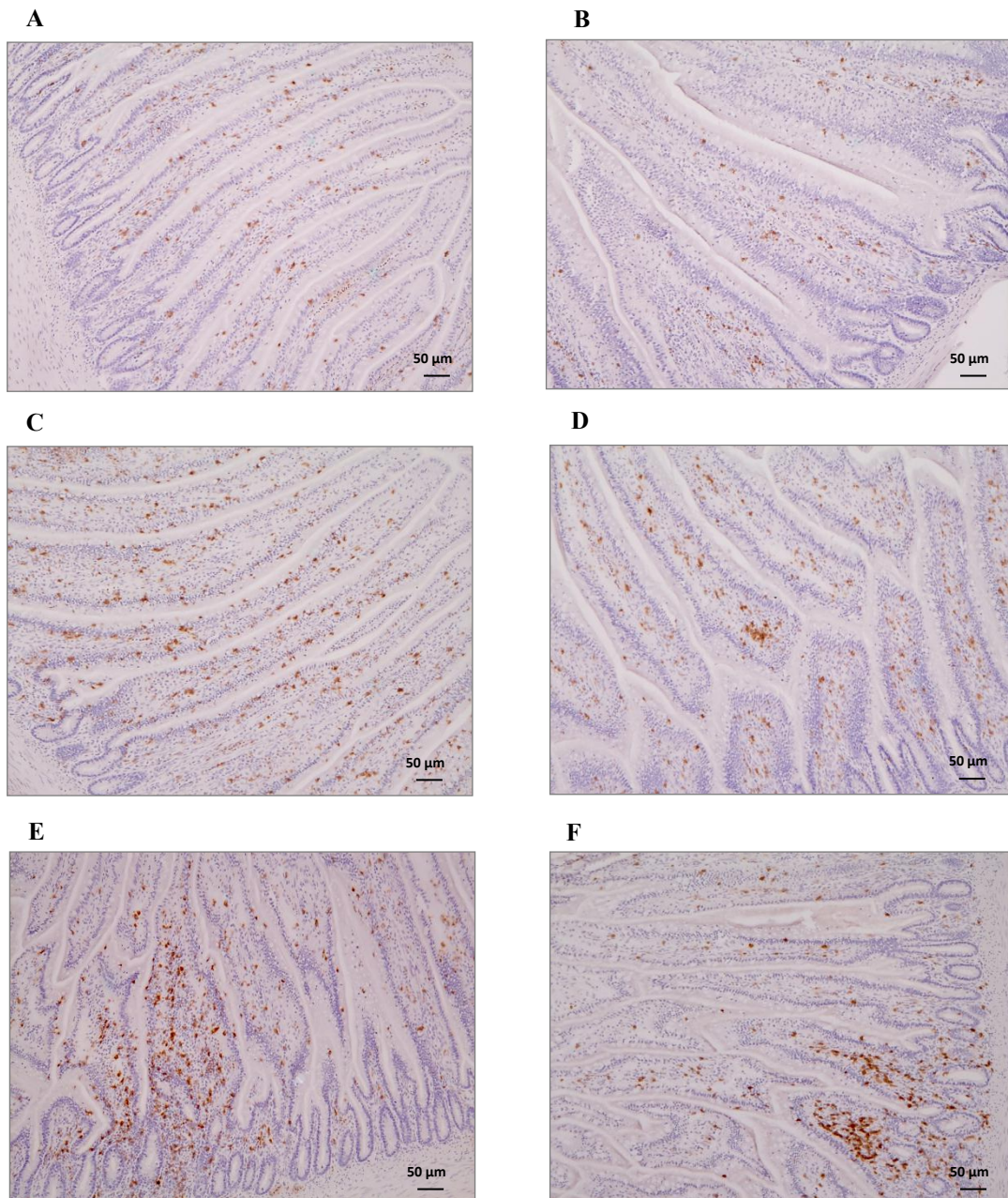


Abbildung 50: $\gamma\delta$ - und $\alpha\beta$ T-Lymphozyten im Jejunum

Immunhistologische Färbung des Jejunums von keimfrei gehaltenen (A, B), konventionell gehaltenen (B, C) und mono-rekonstituierten (E, F) Hühnern an Tag 28 nach dem Schlupf mit den mAK TCR1 (A, C, E) und TCR2 (B, D, F). Vergrößerung 10x.

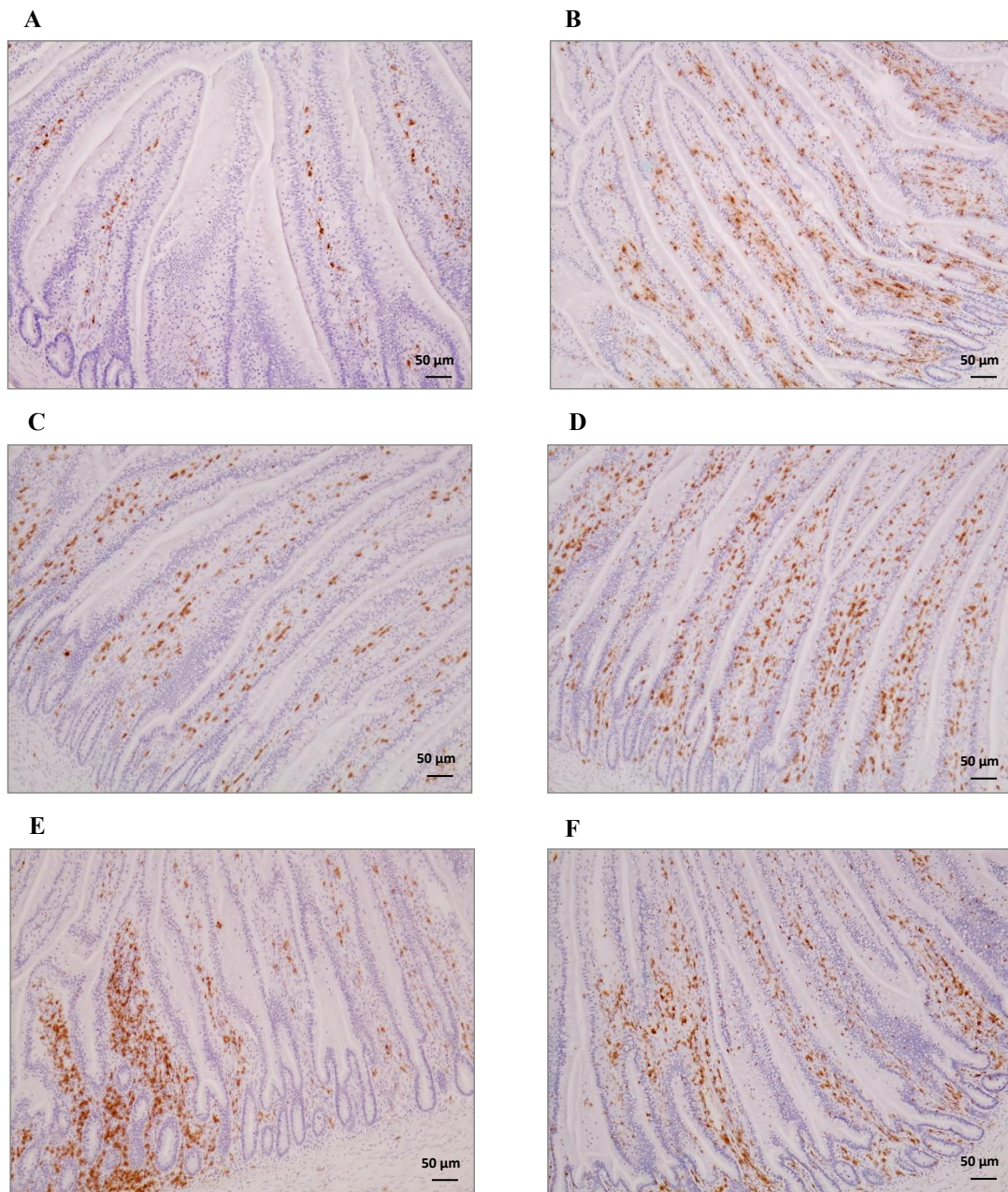


Abbildung 51: CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten im Jejunum

Immunhistologische Färbung des Jejunums von keimfrei gehaltenen (A, B), konventionell gehaltenen (B, C) und mono-rekonstituierten (E, F) Hühnern an Tag 28 nach dem Schlupf mit den mAK CT4 (A, C, E) und CT8 (B, D, F). Vergrößerung 10x.

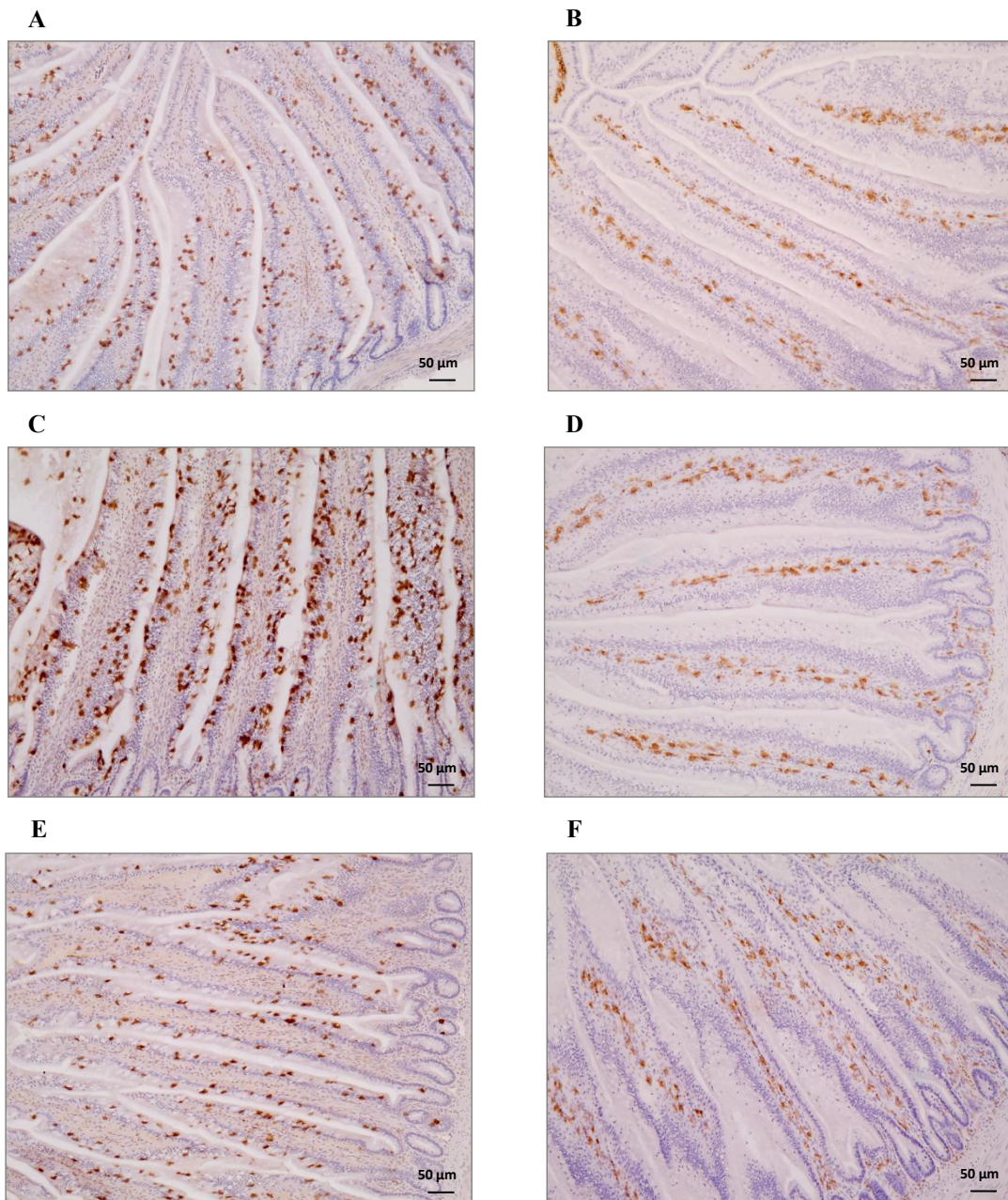


Abbildung 52: B-Lymphozyten und Makrophagen im Jejunum

Immunhistologische Färbung des Jejunums von keimfrei gehaltenen (A, B), konventionell gehaltenen (B, C) und mono-rekonstituierten (E, F) Hühnern an Tag 28 nach dem Schlupf mit den mAK AV20 (A, C, E) und Kul01 (B, D, F). Vergrößerung 10x.

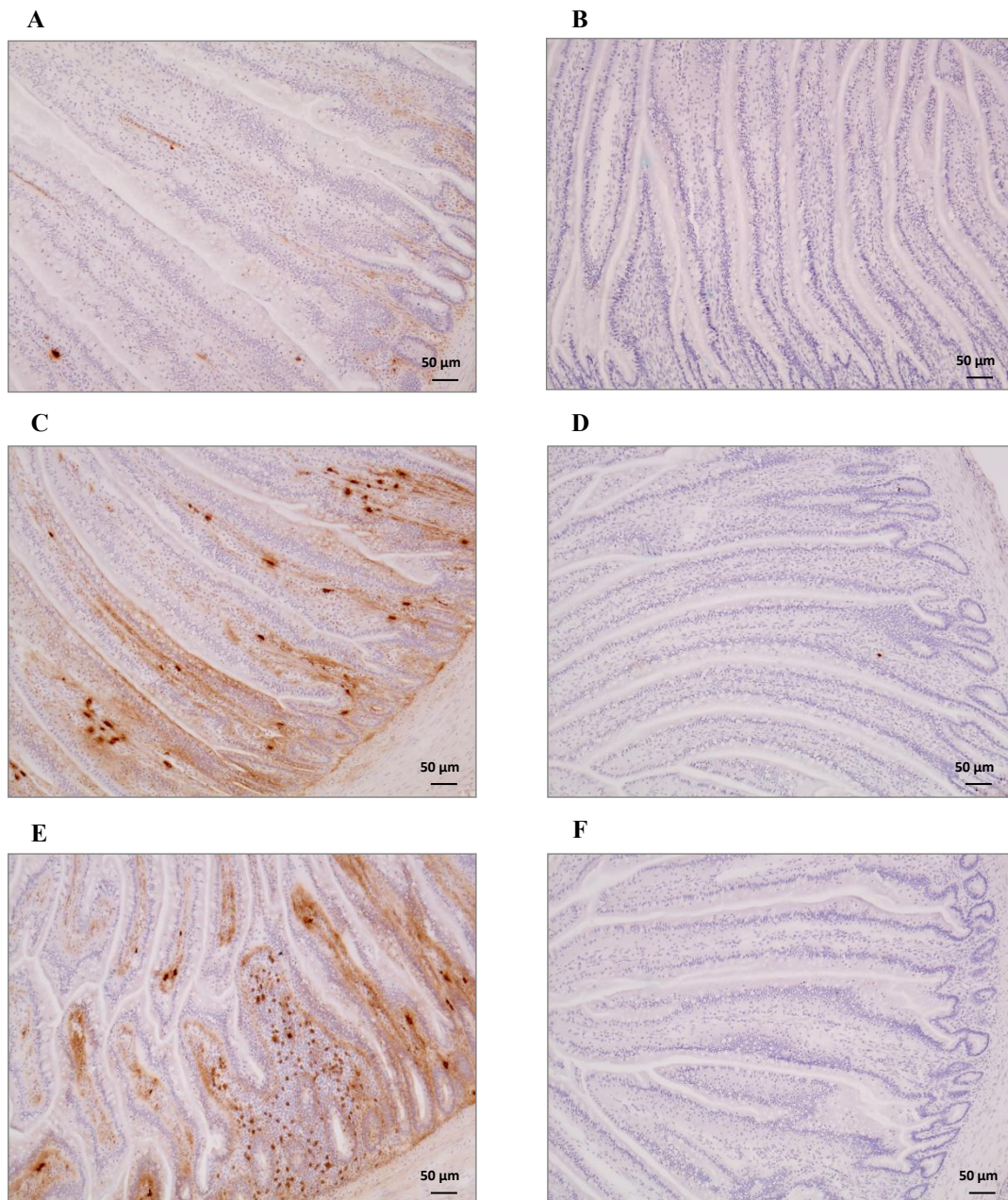


Abbildung 53: IgM und IgY im Jejunum

Immunhistologische Färbung des Jejunums von keimfrei gehaltenen (A, B), konventionell gehaltenen (C, D) und mono-rekonstituierten (E, F) Hühnern an Tag 28 nach dem Schlupf mit den mAK M1 (A, C, E) und G1 (B, D, F). Vergrößerung 10x.

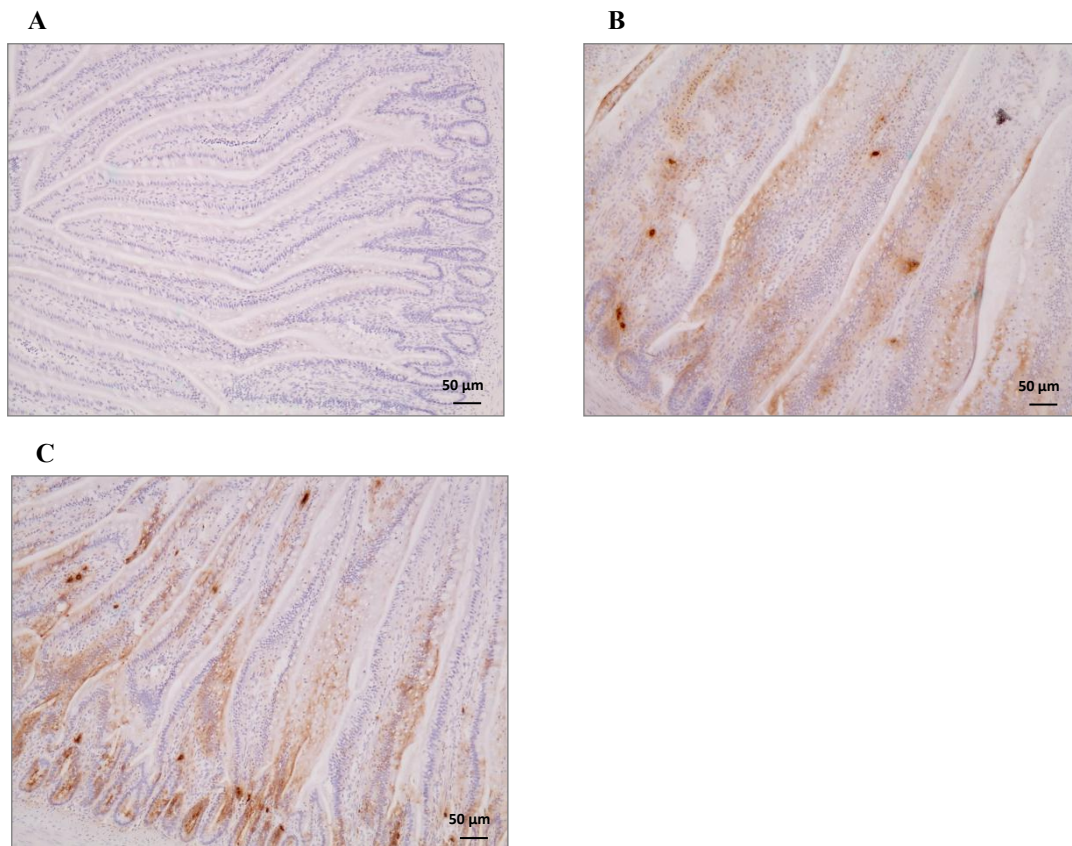


Abbildung 54: IgA im Jejunum

Immunhistologische Färbung des Jejunums von keimfrei gehaltenen (A), konventionell gehaltenen (B) und mono-rekonstituierten (C) Hühnern an Tag 28 nach dem Schlupf mit dem mAK A1. Vergrößerung 10x.

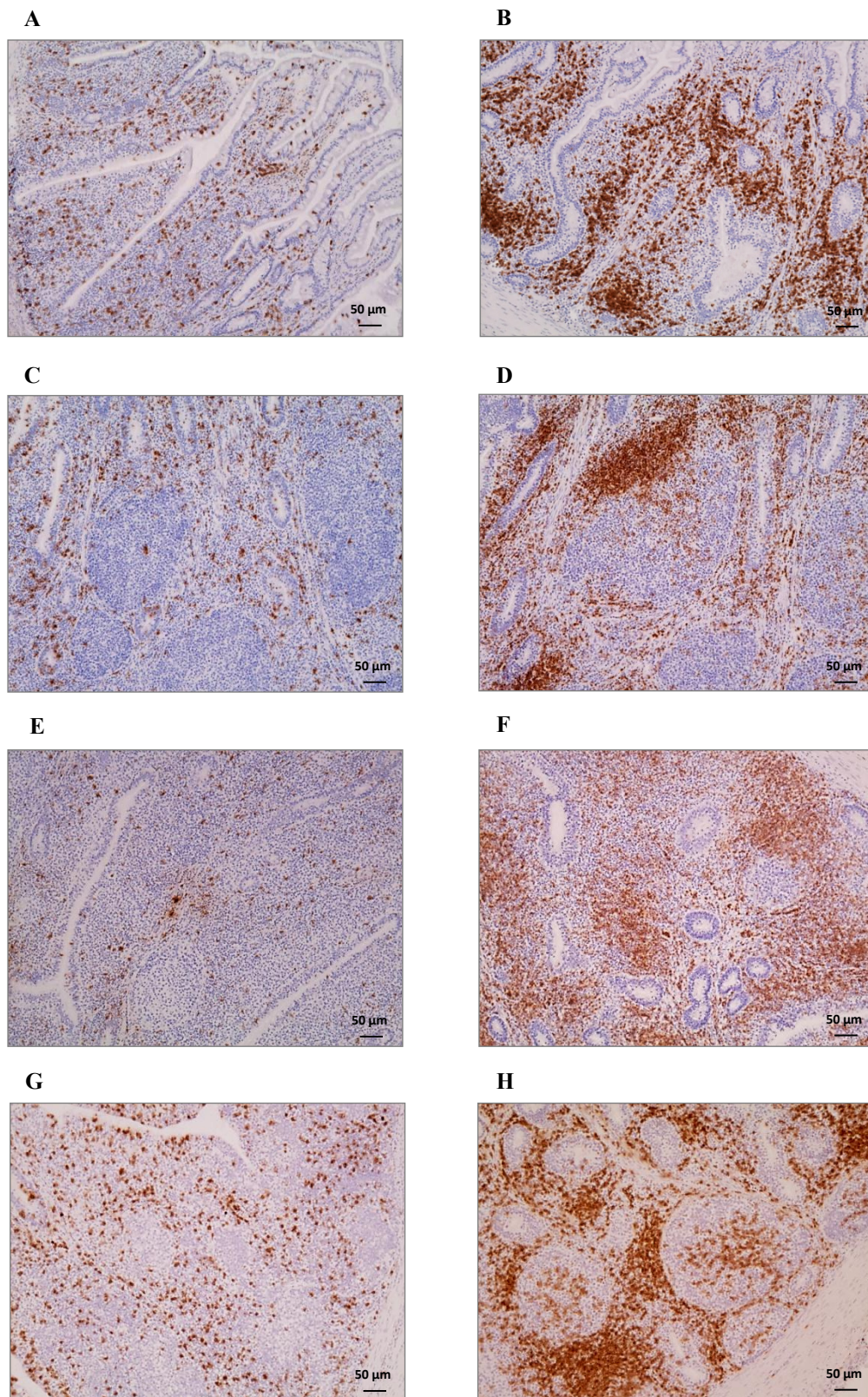


Abbildung 55: $\gamma\delta$ - und $CD4^+$ T-Lymphozyten in der Caecaltonsille

Immunhistologische Färbung der Caecaltonsille von keimfrei gehaltenen (A, B), konventionell gehaltenen (C, D) und mono-rekonstituierten (E, F) und tetra-rekonstituierten (G, H) Hühnern an Tag 28 nach dem Schlupf mit den mAK TCR1 (A, C, E, G) und CT4 (B, D, F, H). Vergrößerung 10x.

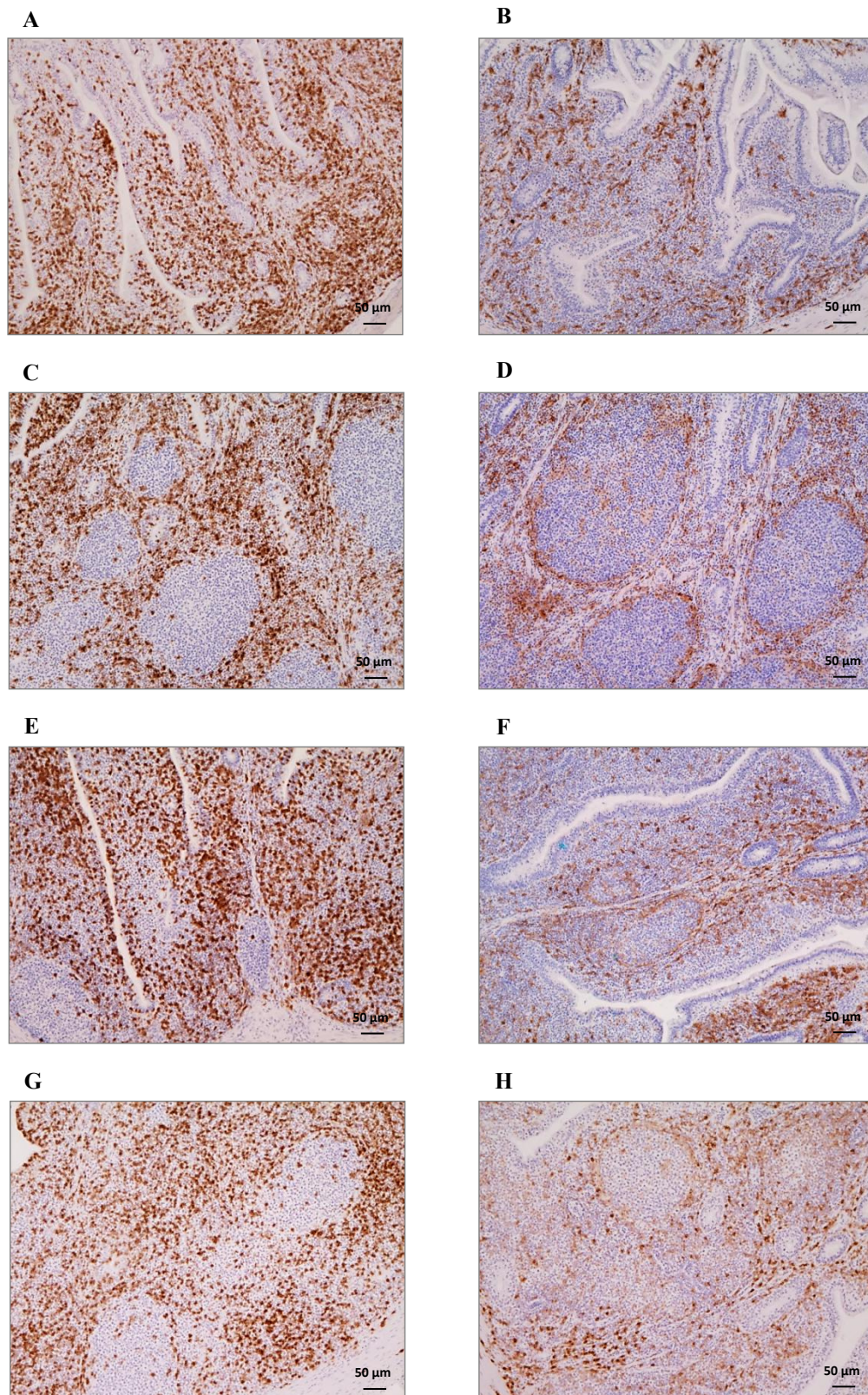


Abbildung 56: CD8⁺ T-Lymphozyten und Makrophagen in der Caecaltonsille

Immunhistologische Färbung der Caecaltonsille von keimfrei gehaltenen (A, B), konventionell gehaltenen (C, D) und mono-rekonstituierten (E, F) und tetra-rekonstituierten (G, H) Hühnern an Tag 28 nach dem Schlupf mit den mAK CT8 (A, C, E, G) und Kul01 (B, D, F, H). Vergrößerung 10x.

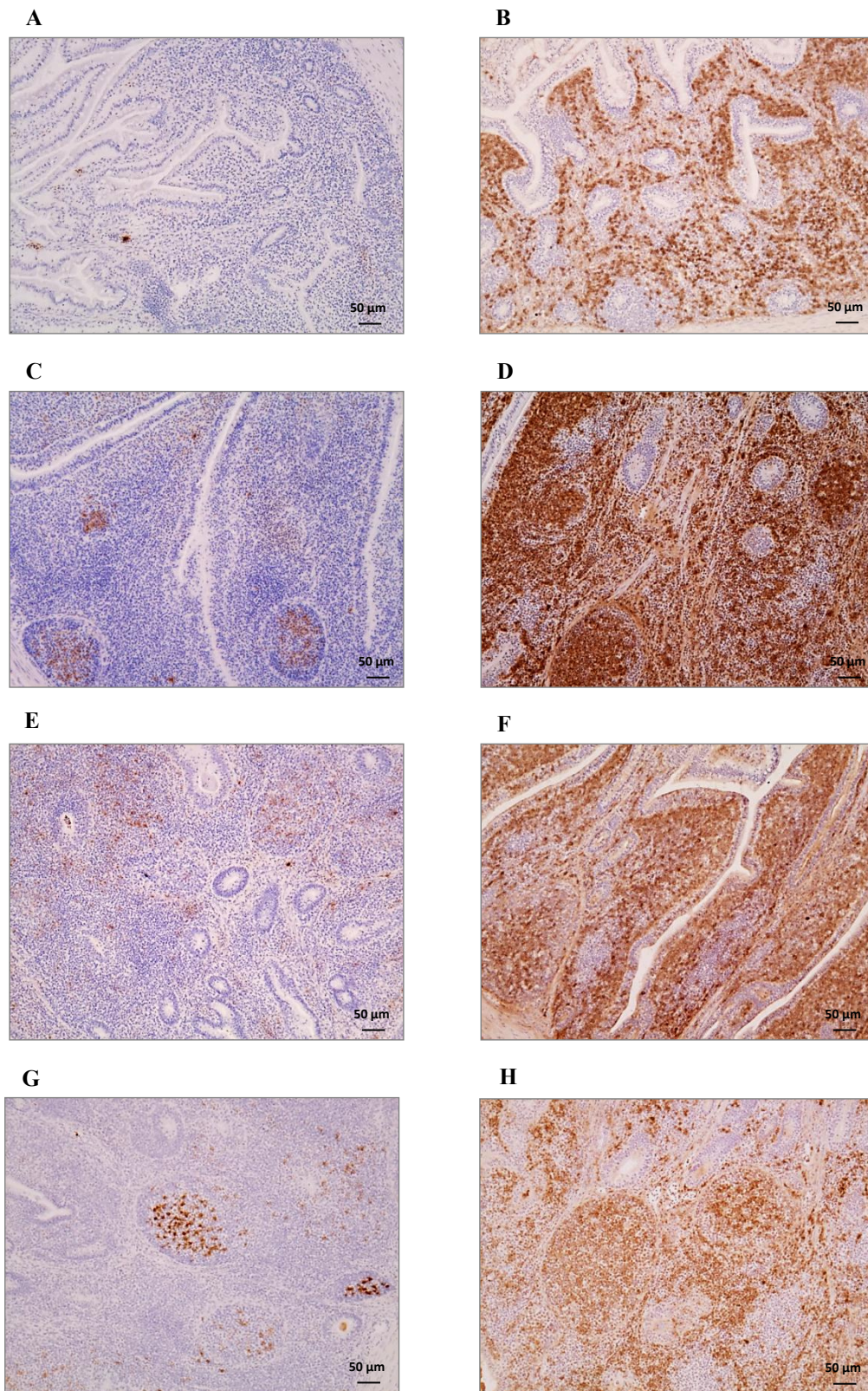


Abbildung 57: IgY und IgM in der Caecaltonsille

Immunhistologische Färbung der Caecaltonsille von keimfrei gehaltenen (A, B), konventionell gehaltenen (C, D) und mono-rekonstituierten (E, F) und tetra-rekonstituierten (G, H) Hühnern an Tag 28 nach dem Schlupf mit den mAK G1 (A, C, E, G) und M1 (B, D, F, H). Vergrößerung 10x.

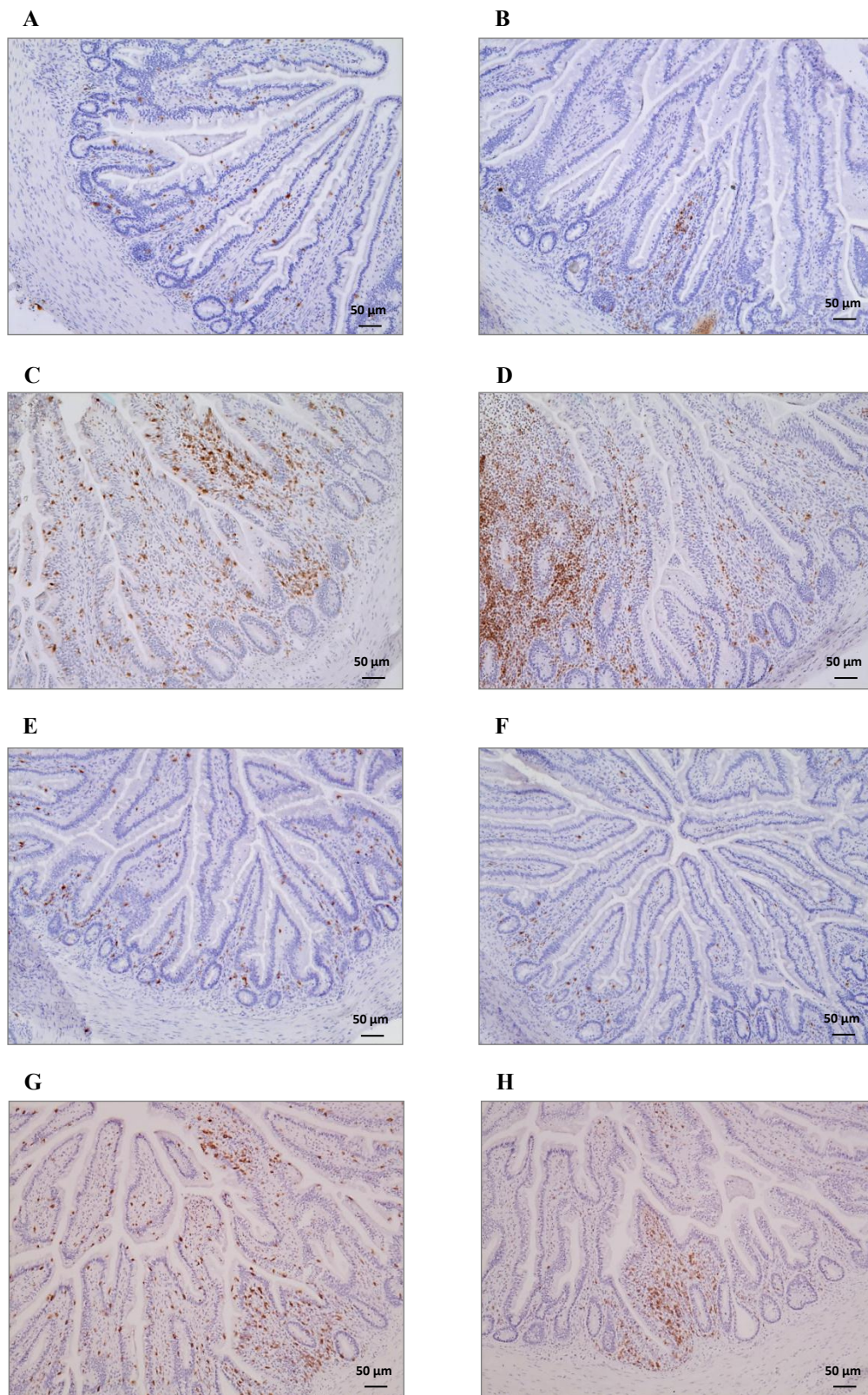


Abbildung 58: $\gamma\delta$ - und $\alpha\beta$ T-Lymphozyten im Caecum

Immunhistologische Färbung des Caecums von keimfrei gehaltenen (A, B), konventionell gehaltenen (C, D) und mono-rekonstituierten (E, F) und tetra-rekonstituierten (G, H) Hühnern an Tag 28 nach dem Schlupf mit den mAK TCR1 (A, C, E, G) und TCR2 (B, D, F, H). Vergrößerung 10x.

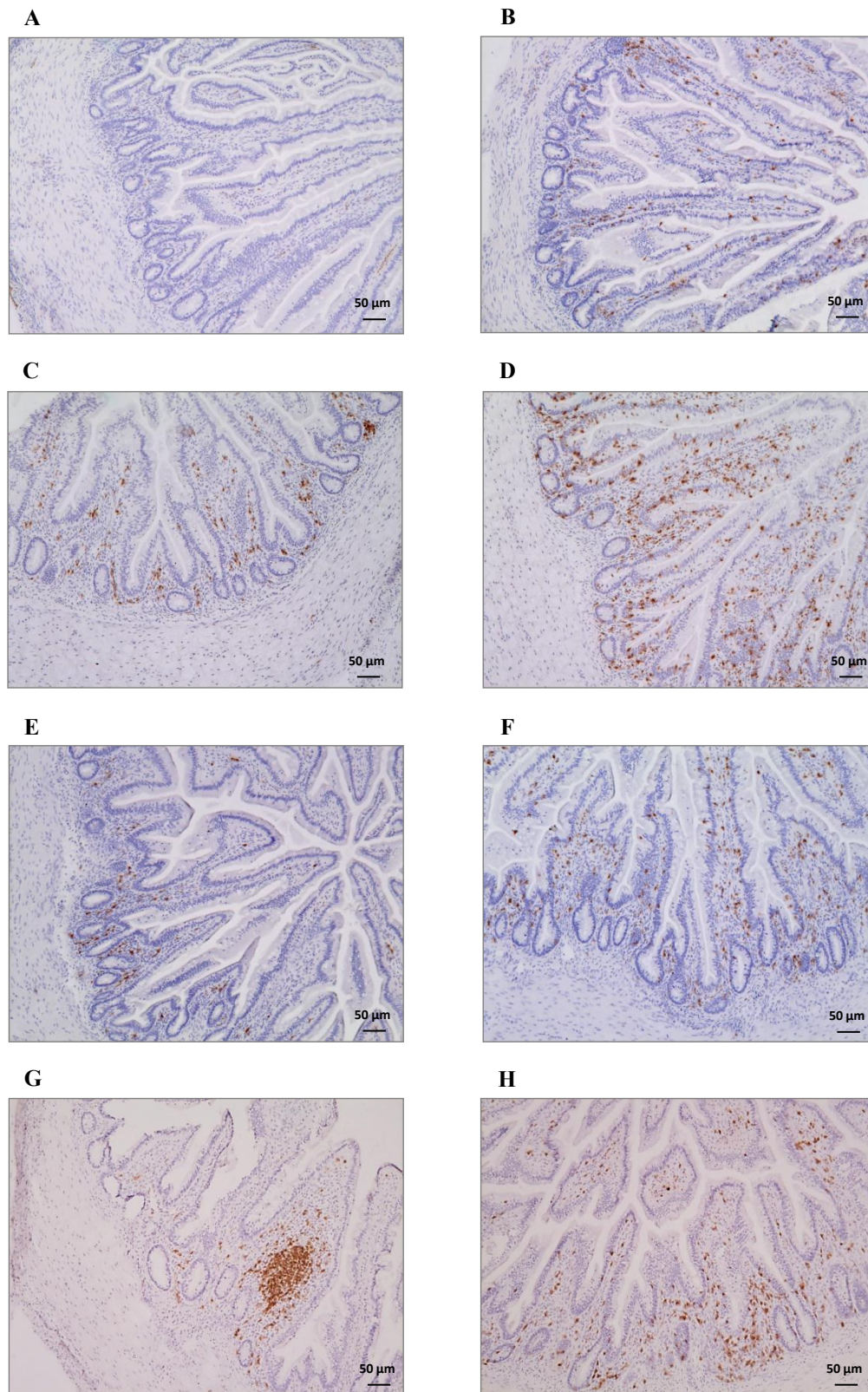


Abbildung 59: CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten im Caecum

Immunhistologische Färbung des Caecums von keimfrei gehaltenen (A, B), konventionell gehaltenen (C, D) und mono-rekonstituierten (E, F) und tetra-rekonstituierten (G, H) Hühnern an Tag 28 nach dem Schlupf mit den mAK CT4 (A, C, E, G) und CT8 (B, D, F, H). Vergrößerung 10x.

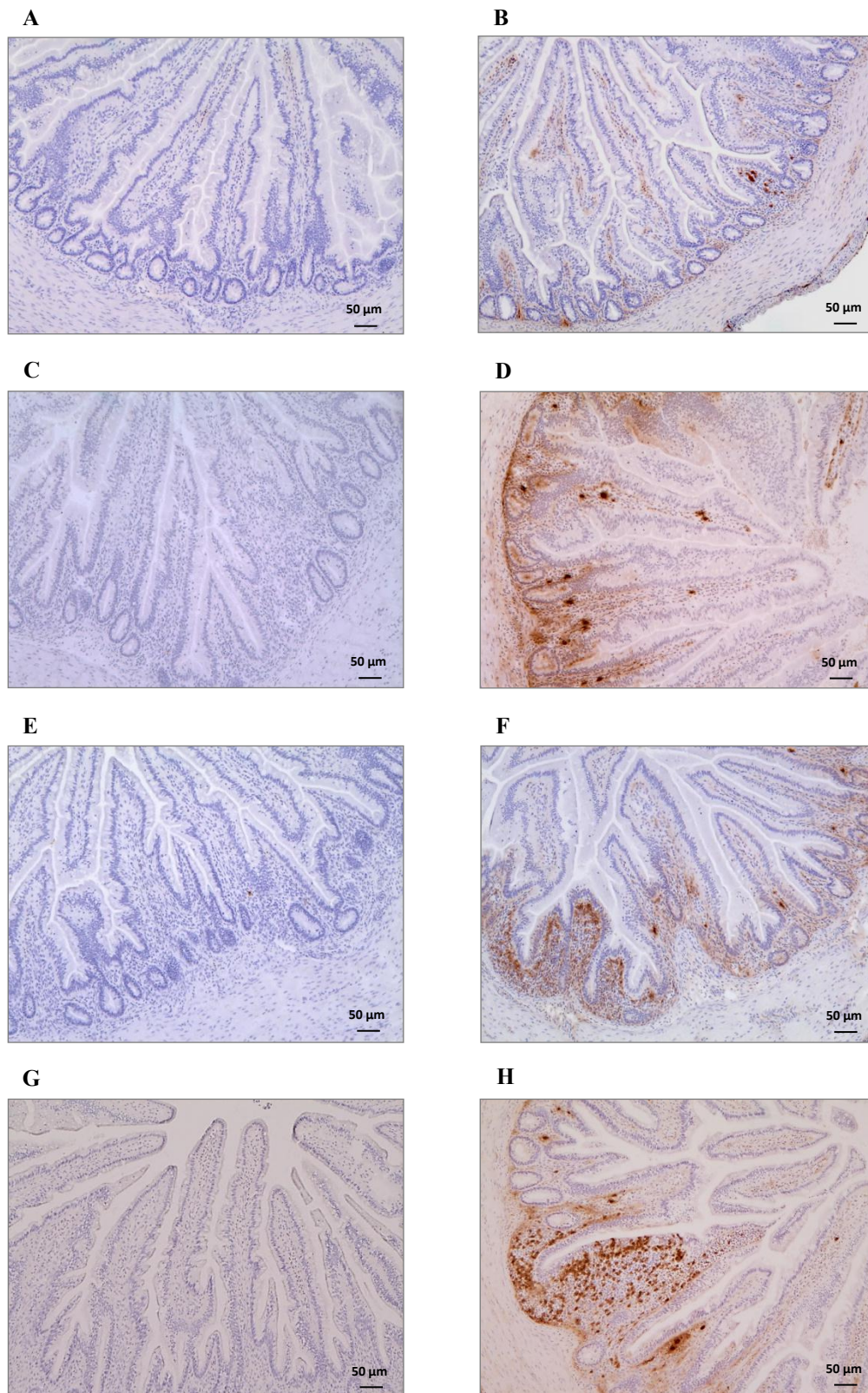


Abbildung 60: IgY und IgM im Caecum

Immunhistologische Färbung des Caecums von keimfrei gehaltenen (A, B), konventionell gehaltenen (C, D) und mono-rekonstituierten (E, F) und tetra-rekonstituierten (G, H) Hühnern an Tag 28 nach dem Schlupf mit den mAK G1 (A, C, E, G) und M1 (B, D, F, H). Vergrößerung 10x.

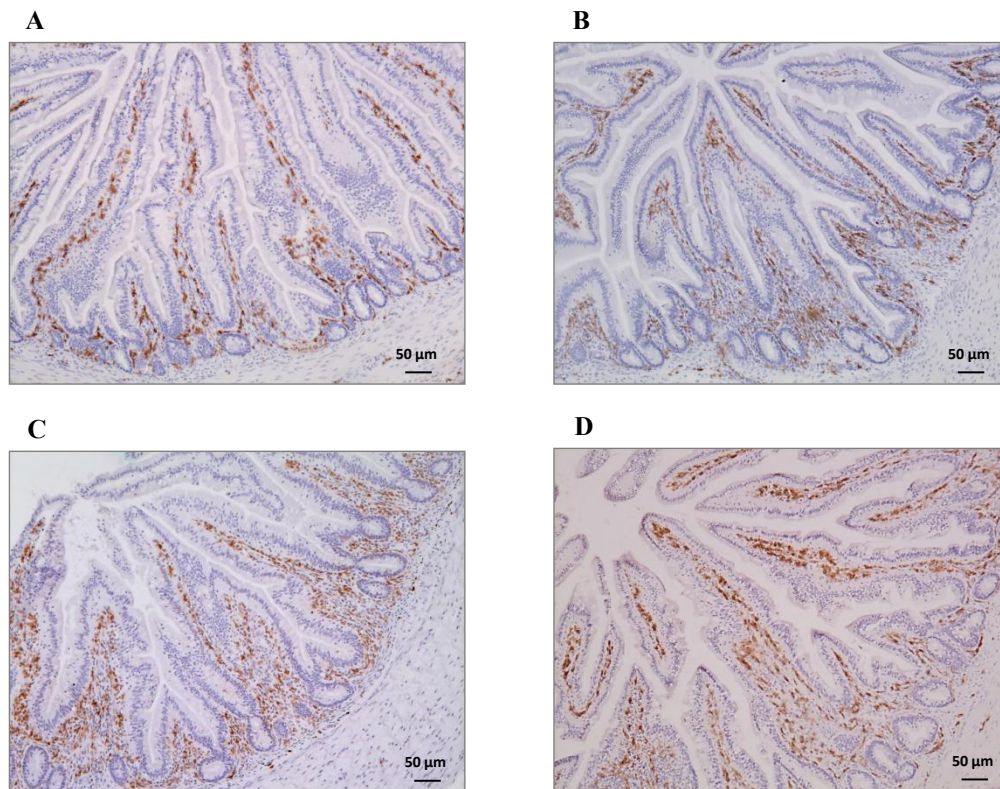


Abbildung 61: Makrophagen im Caecum

Immunhistologische Färbung des Caecums von keimfrei gehaltenen (A), konventionell gehaltenen (B) und mono-rekonstituierten (C) und tetra-rekonstituierten (D) Hühnern an Tag 28 nach dem Schlupf mit dem mAK Kul01. Vergrößerung 10x.

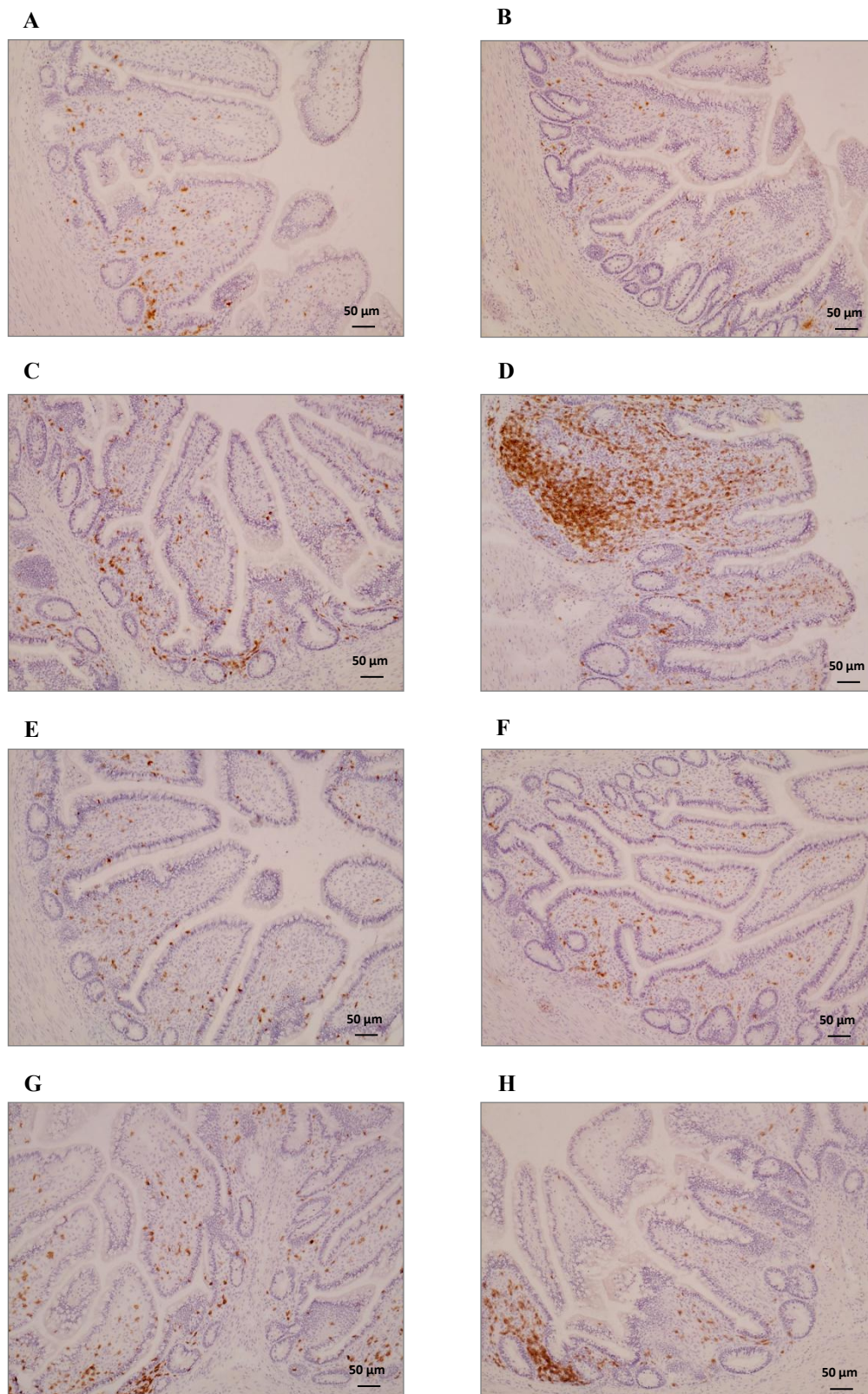


Abbildung 62: T-Lymphozyten im Colon

Immunhistologische Färbung des Colons von keimfrei gehaltenen (A, B), konventionell gehaltenen (C, D) und mono-rekonstituierten (E, F) und tetra-rekonstituierten (G, H) Hühnern an Tag 28 nach dem Schlupf mit den mAK TCR1 (A, C, E, G) und TCR2 (B, D, F, H). Vergrößerung 10x.

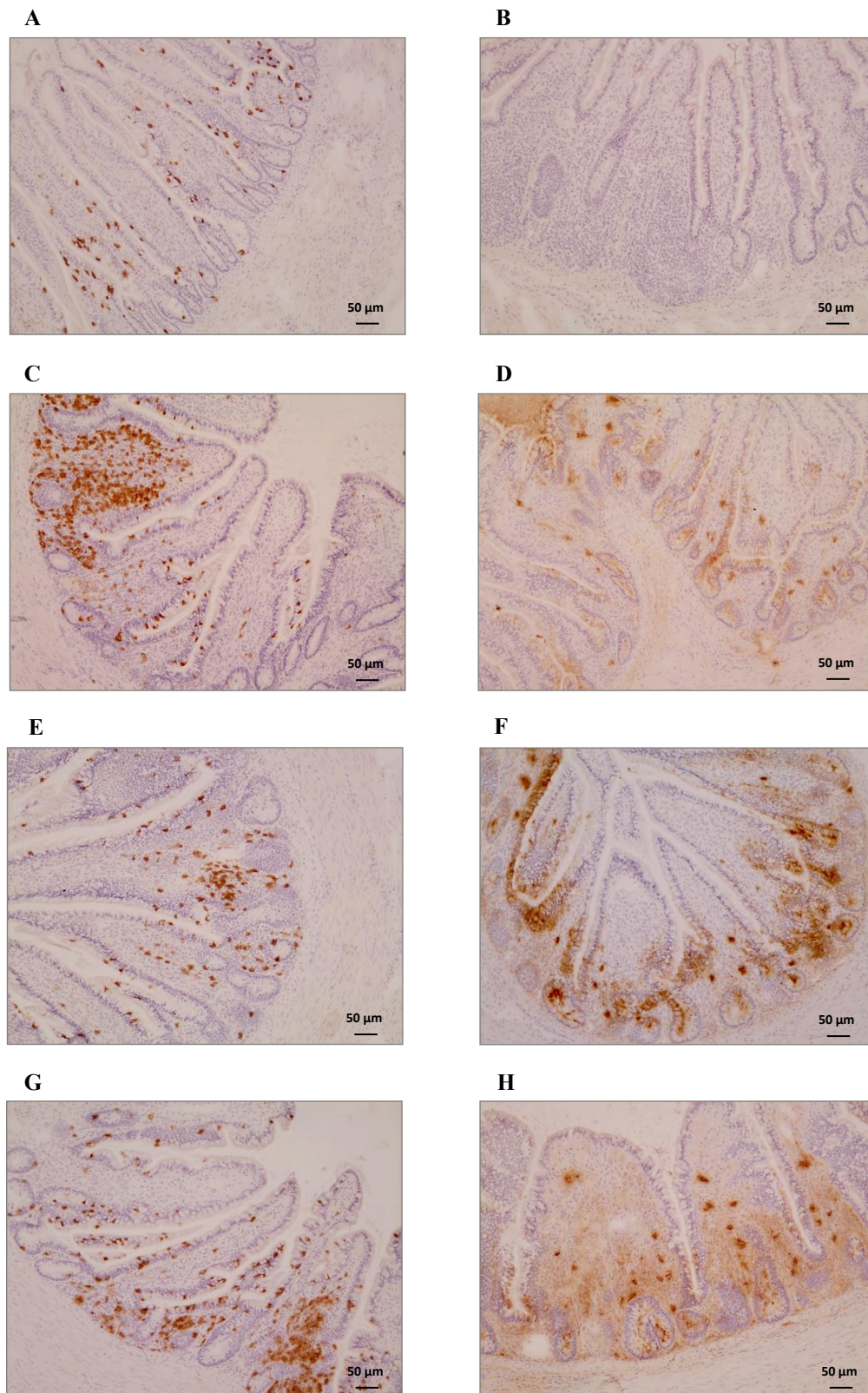


Abbildung 63: B-Lymphozyten und IgA im Colon

Immunhistologische Färbung des Colons von keimfrei gehaltenen (A, B), konventionell gehaltenen (C, D) und mono-rekonstituierten (E, F) und tetra-rekonstituierten (G, H) Hühnern an Tag 28 nach dem Schlupf mit den mAK AV20 (A, C, E, G) und A1 (B, D, F, H). Vergrößerung 10x.

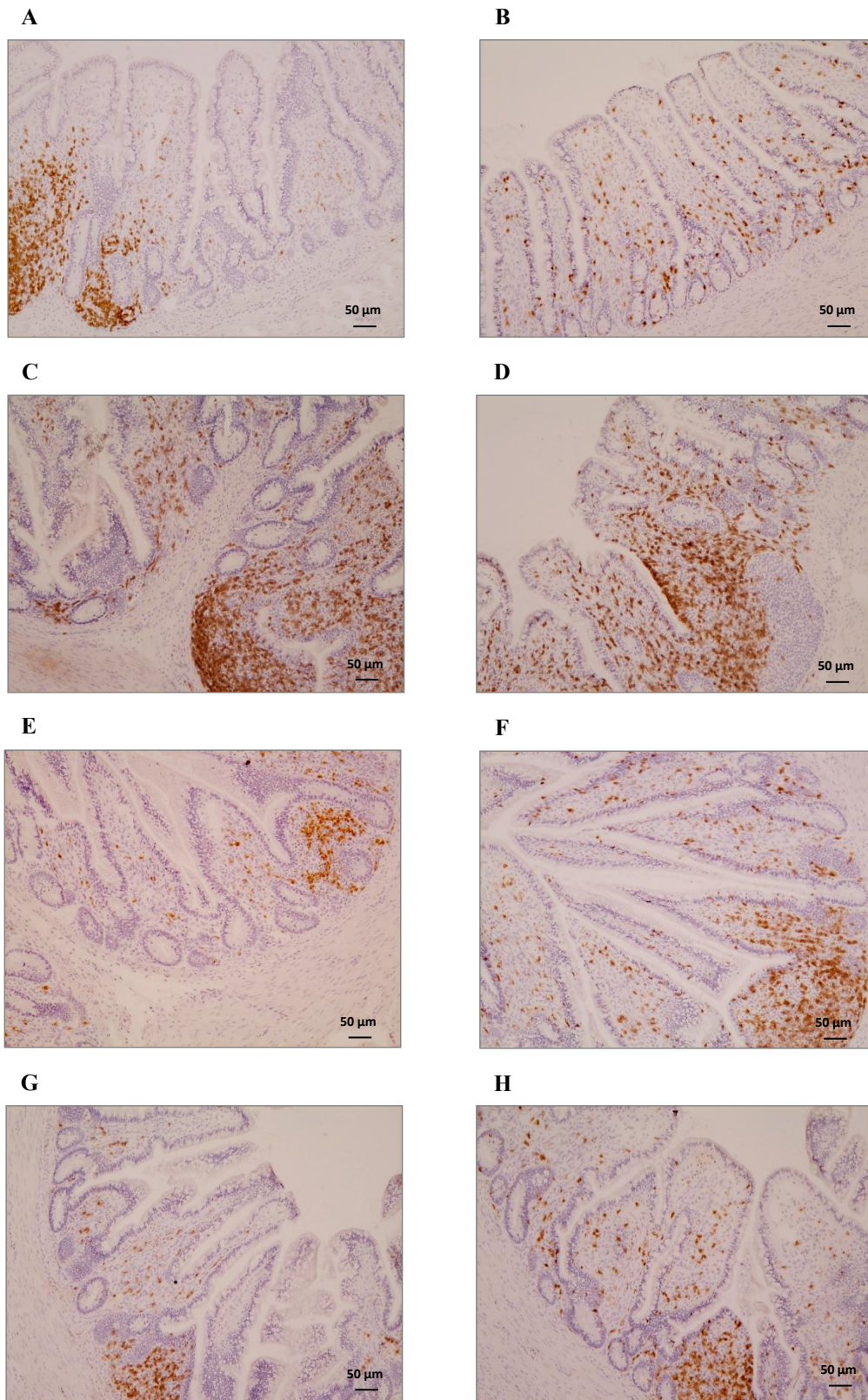


Abbildung 64: CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten im Colon

Immunhistologische Färbung des Colons von keimfrei gehaltenen (A, B), konventionell gehaltenen (C, D) und mono-rekonstituierten (E, F) und tetra-rekonstituierten (G, H) Hühnern an Tag 28 nach dem Schlupf mit den mAK CT4 (A, C, E, G) und CT8 (B, D, F, H). Vergrößerung 10x.

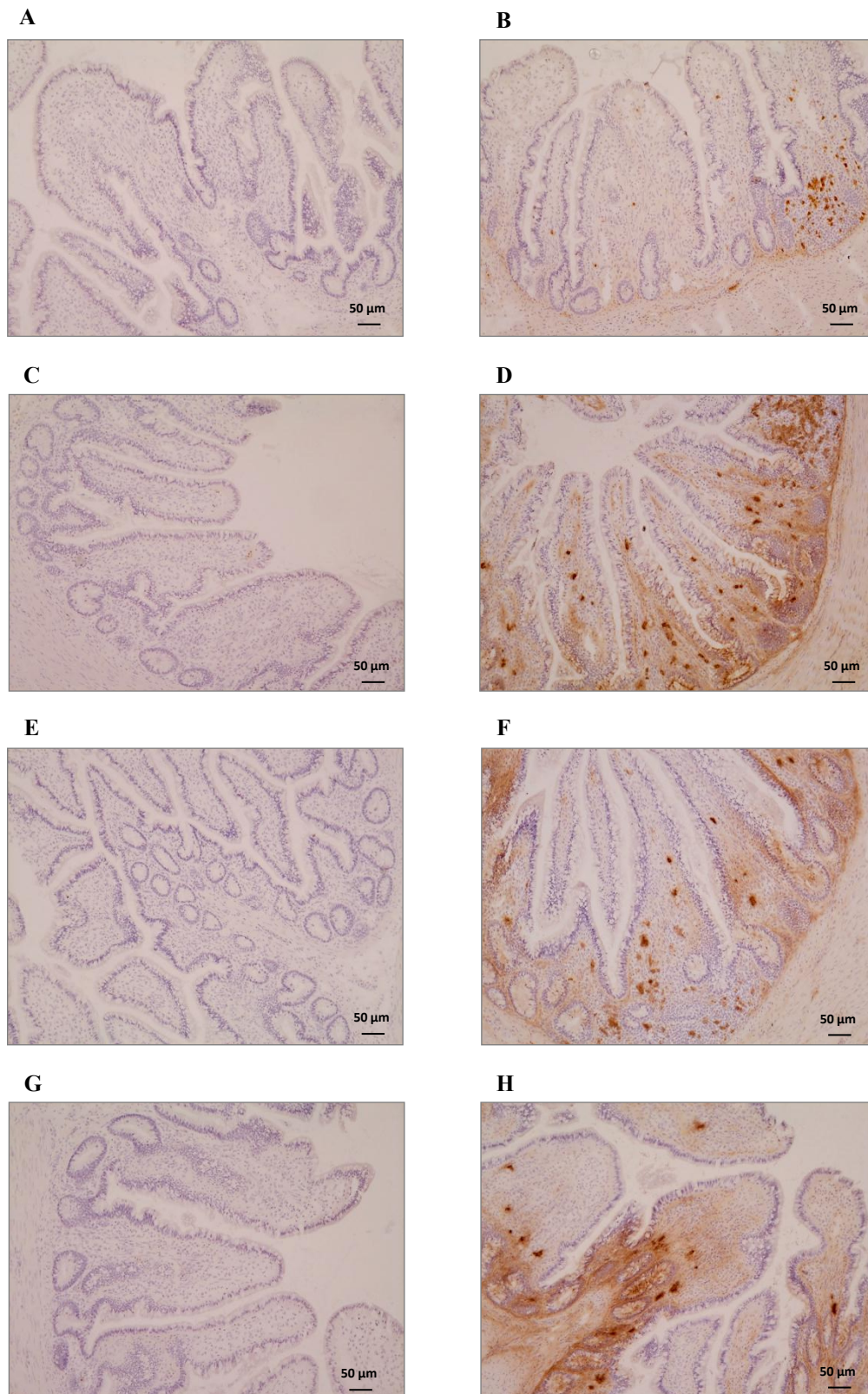


Abbildung 65: IgY und IgM im Colon

Immunhistologische Färbung des Colons von keimfrei gehaltenen (A, B), konventionell gehaltenen (C, D) und mono-rekonstituierten (E, F) und tetra-rekonstituierten (G, H) Hühnern an Tag 28 nach dem Schlupf mit den mAK G1 (A, C, E, G) und M1 (B, D, F, H). Vergrößerung 10x.

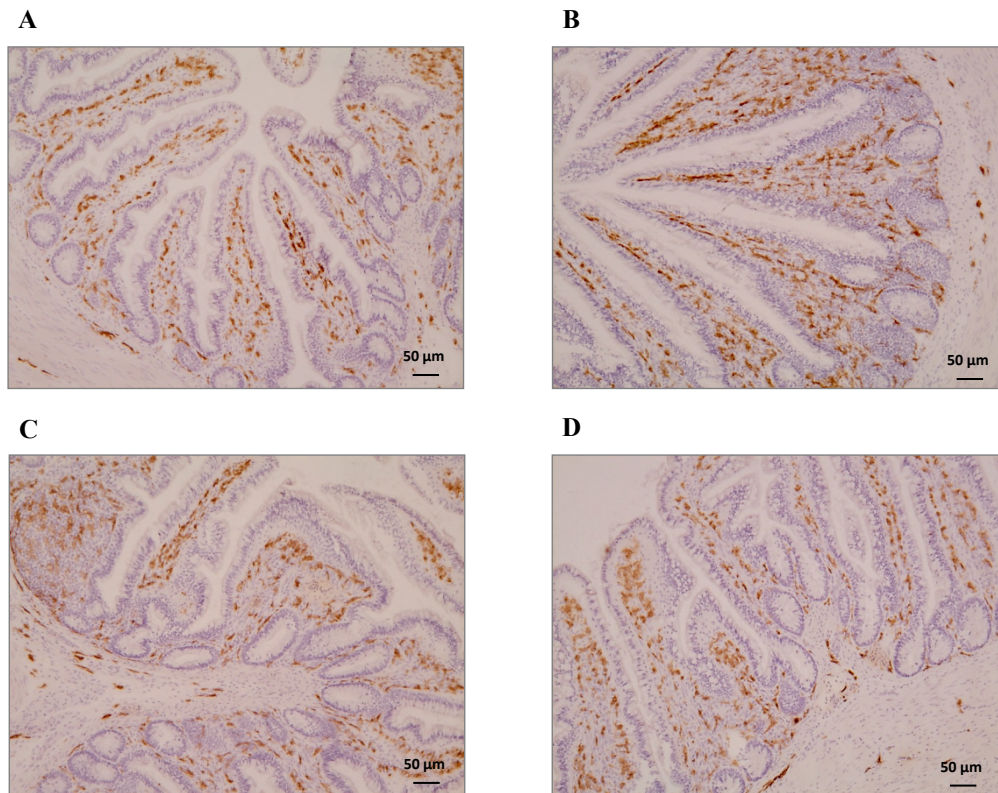


Abbildung 66: Makrophagen im Colon

Immunhistologische Färbung des Colons von keimfrei gehaltenen (A), konventionell gehaltenen (B) und mono-rekonstituierten (C) und tetra-rekonstituierten (D) Hühnern an Tag 28 nach dem Schlupf mit dem mAK Kul01. Vergrößerung 10x.

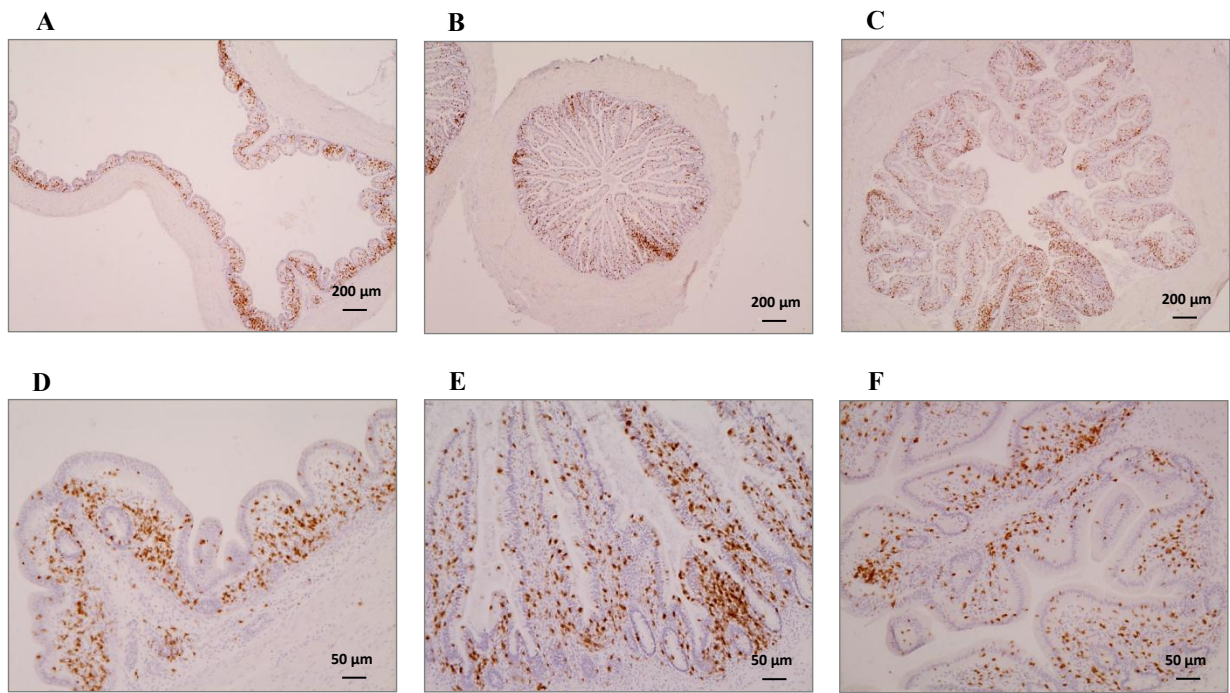


Abbildung 67: $\gamma\delta$ T-Lymphozyten im Caecum am 55. Lebenstag

Immunhistologische Färbung des Caecums von keimfrei gehaltenen (A, D), konventionell gehaltenen (B, E) und tetra-rekonstituierten (C, F) Hühnern an Tag 55 nach dem Schlupf mit dem mAK TCR1. Die obere Reihe (A-C) zeigt eine Übersicht (Vergrößerung 2,5x) mit jeweiliger Detailansicht in der unteren Reihe (D-F, 10x).

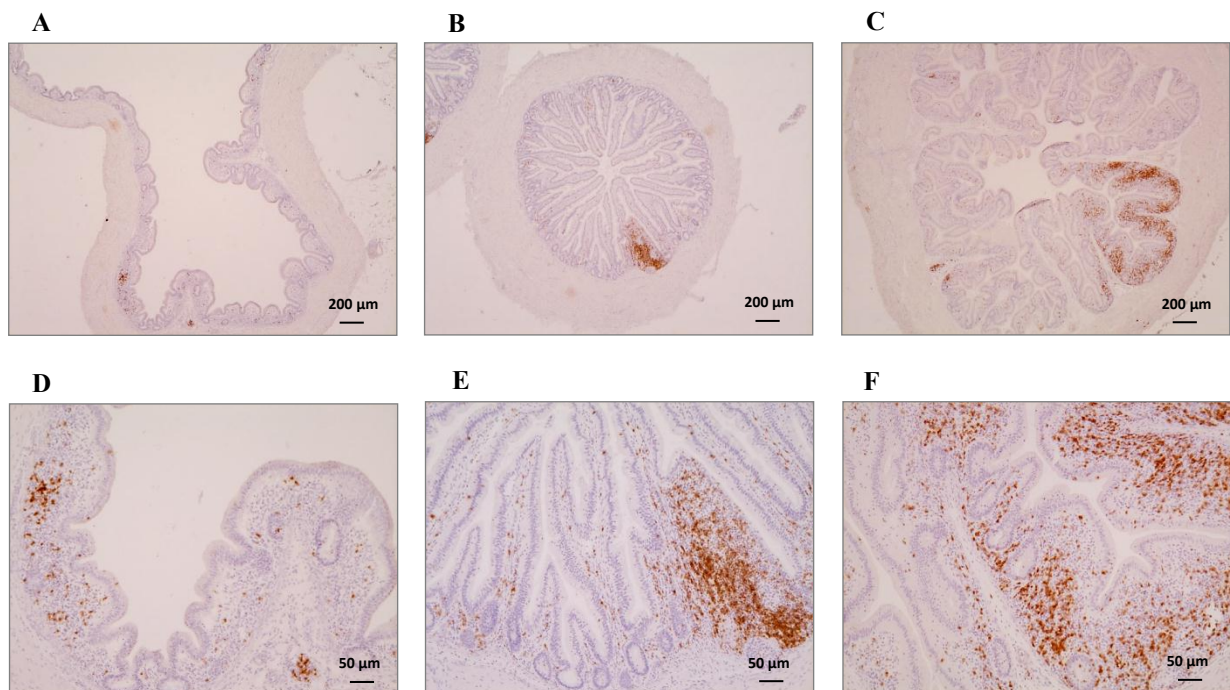


Abbildung 68: $\alpha\beta$ T-Lymphozyten im Caecum am 55. Lebenstag

Immunhistologische Färbung des Caecums von keimfrei gehaltenen (A, D), konventionell gehaltenen (B, E) und tetra-rekonstituierten (C, F) Hühnern an Tag 55 nach dem Schlupf mit dem mAK TCR2. Die obere Reihe (A-C) zeigt eine Übersicht (Vergrößerung 2,5x) mit jeweiliger Detailansicht in der unteren Reihe (D-F, 10x).

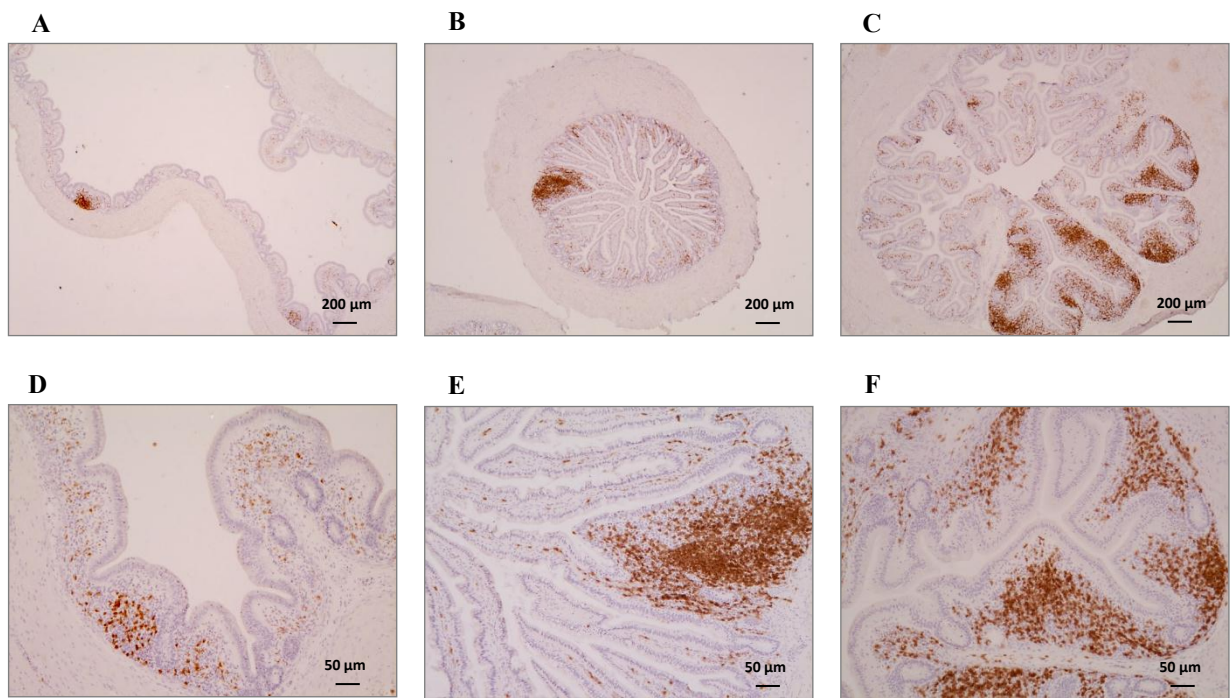


Abbildung 69: CD4⁺ T-Lymphozyten im Caecum am 55. Lebenstag

Immunhistologische Färbung des Caecums von keimfrei gehaltenen (A, D), konventionell gehaltenen (B, E) und tetra-rekonstituierten (C, F) Hühnern an Tag 55 nach dem Schlupf mit dem mAK CT4. Die obere Reihe (A-C) zeigt eine Übersicht (Vergrößerung 2,5x) mit jeweiliger Detailansicht in der unteren Reihe (D-F, 10x).

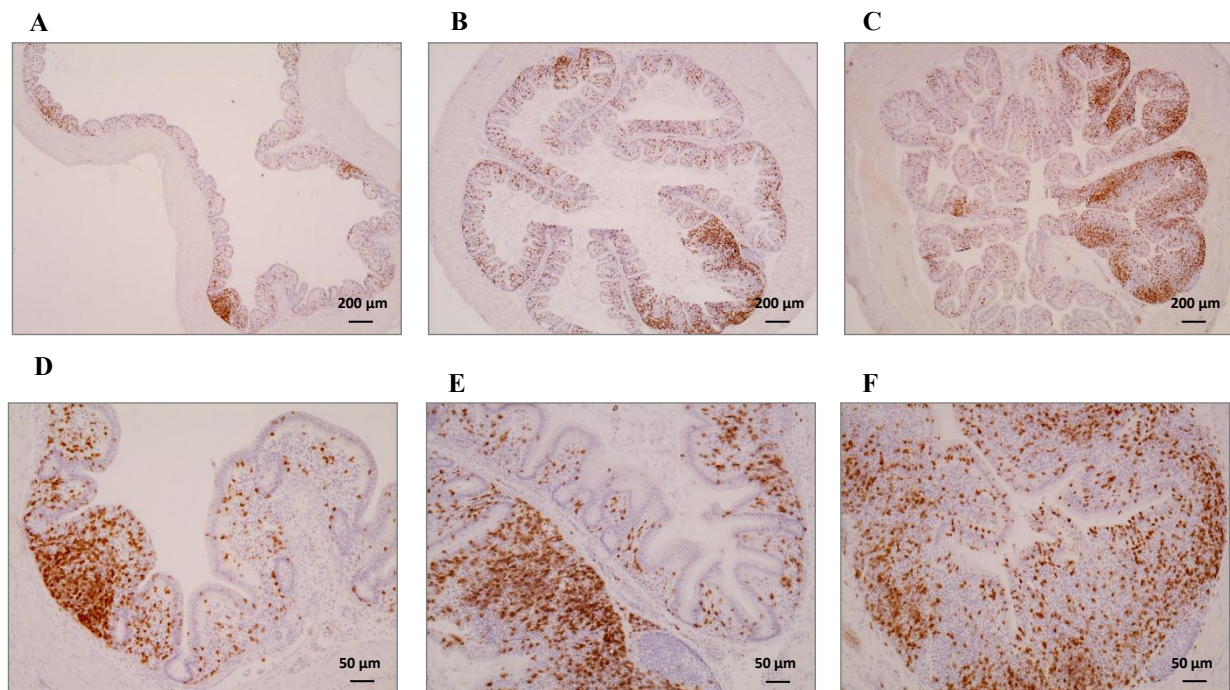


Abbildung 70: CD8⁺ T-Lymphozyten im Caecum am 55. Lebenstag

Immunhistologische Färbung des Caecums von keimfrei gehaltenen (A, D), konventionell gehaltenen (B, E) und tetra-rekonstituierten (C, F) Hühnern an Tag 55 nach dem Schlupf mit dem mAK CT8. Die obere Reihe (A-C) zeigt eine Übersicht (Vergrößerung 2,5x) mit jeweiliger Detailansicht in der unteren Reihe (D-F, 10x).

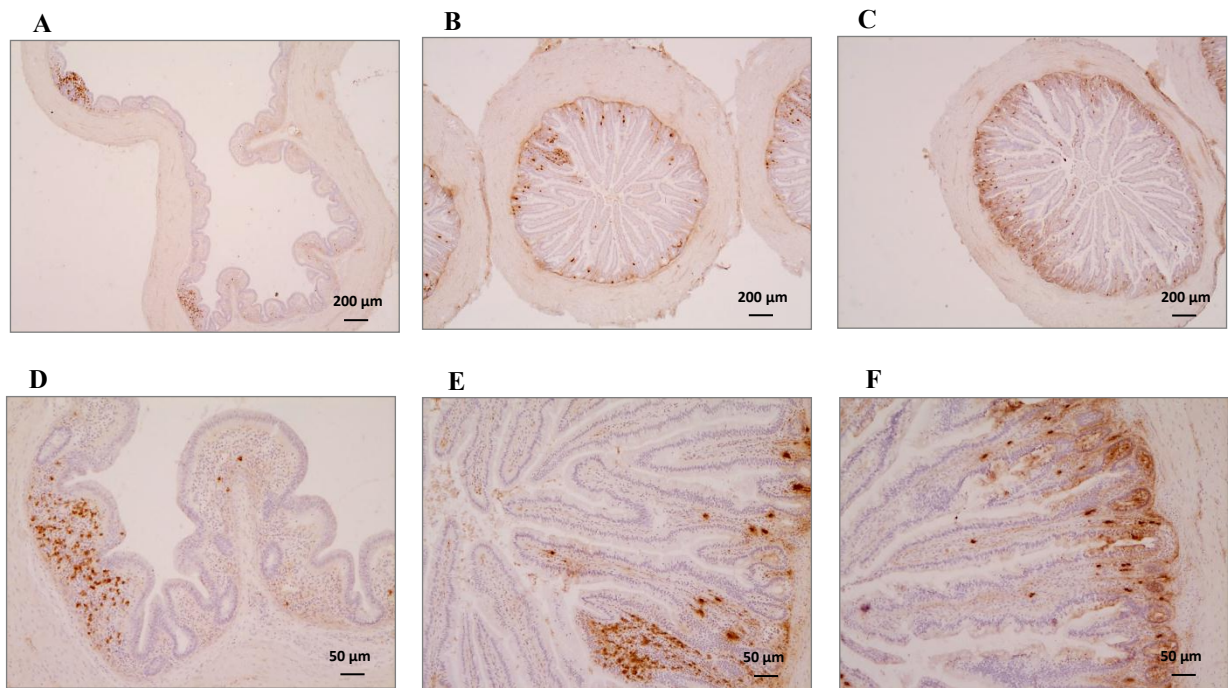


Abbildung 71: IgA im Caecum am 55. Lebenstag

Immunhistologische Färbung des Caecums von keimfrei gehaltenen (A, D), konventionell gehaltenen (B, E) und tetra-rekonstituierten (C, F) Hühnern an Tag 55 nach dem Schlupf mit dem mAK A1. Die obere Reihe (A-C) zeigt eine Übersicht (Vergrößerung 2,5x) mit jeweiliger Detailansicht in der unteren Reihe (D-F, 10x).

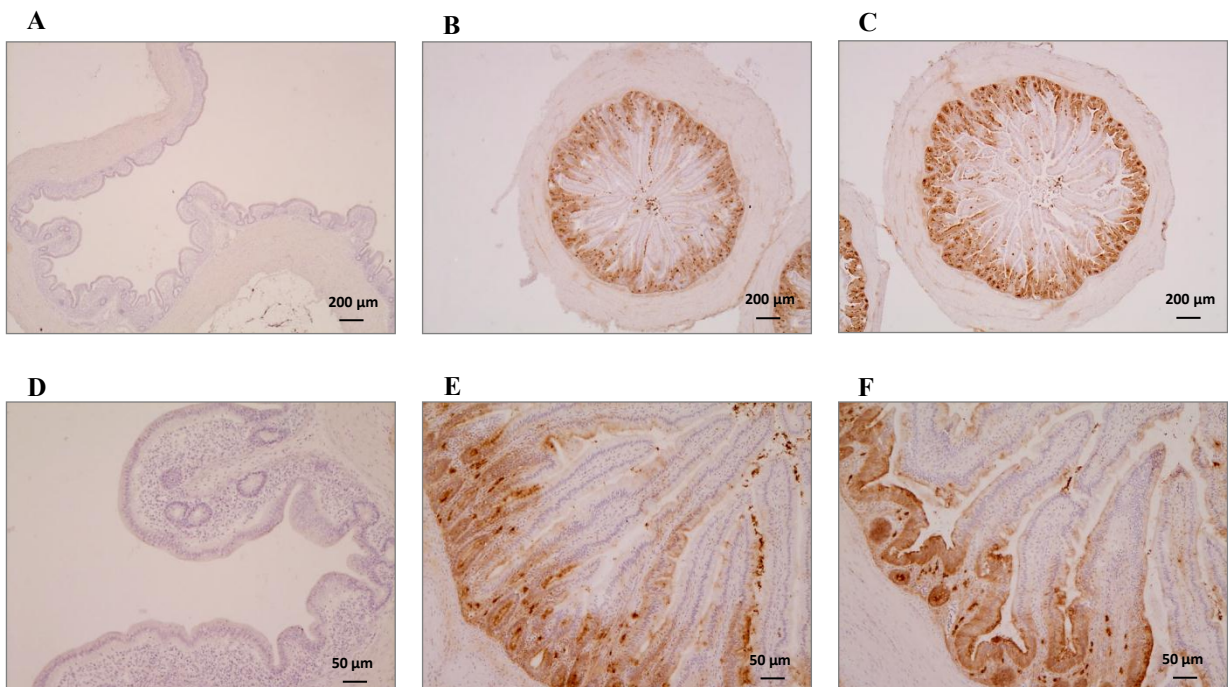


Abbildung 72: IgM im Caecum am 55. Lebenstag

Immunhistologische Färbung des Caecums von keimfrei gehaltenen (A, D), konventionell gehaltenen (B, E) und tetra-rekonstituierten (C, F) Hühnern an Tag 55 nach dem Schlupf mit dem mAK M1. Die obere Reihe (A-C) zeigt eine Übersicht (Vergrößerung 2,5x) mit jeweiliger Detailansicht in der unteren Reihe (D-F, 10x).

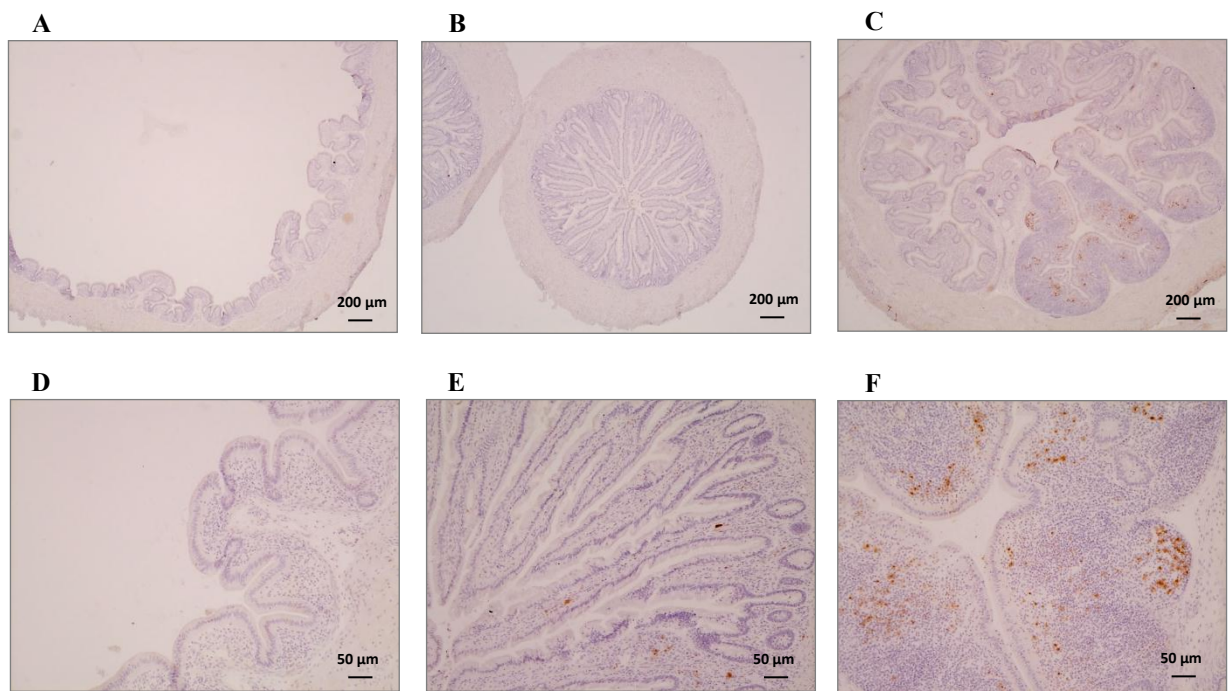


Abbildung 73: IgY im Caecum am 55. Lebenstag

Immunhistologische Färbung des Caecums von keimfrei gehaltenen (A, D), konventionell gehaltenen (B, E) und tetra-rekonstituierten (C, F) Hühnern an Tag 55 nach dem Schlupf mit dem mAK G1. Die obere Reihe (A-C) zeigt eine Übersicht (Vergrößerung 2,5x) mit jeweiliger Detailansicht in der unteren Reihe (D-F, 10x).

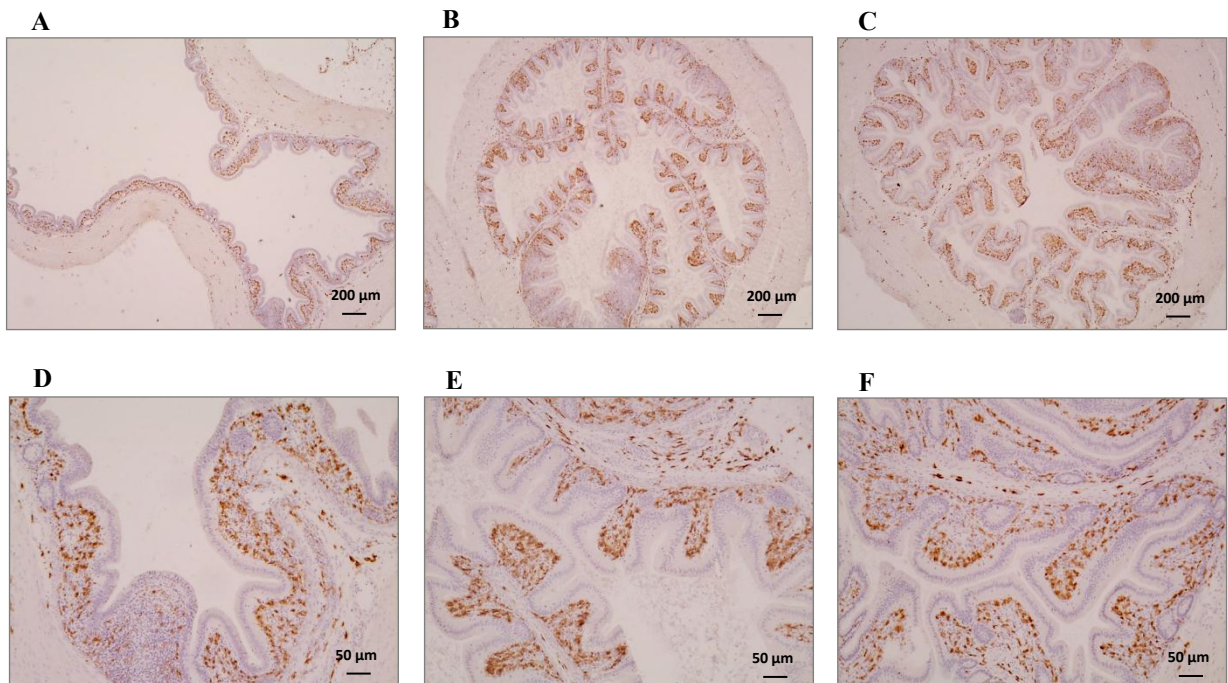


Abbildung 74: Makrophagen im Caecum am 55. Lebenstag

Immunhistologische Färbung des Caecums von keimfrei gehaltenen (A, D), konventionell gehaltenen (B, E) und tetra-rekonstituierten (C, F) Hühnern an Tag 55 nach dem Schlupf mit dem mAK Kul01. Die obere Reihe (A-C) zeigt eine Übersicht (Vergrößerung 2,5x) mit jeweiliger Detailansicht in der unteren Reihe (D-F, 10x).

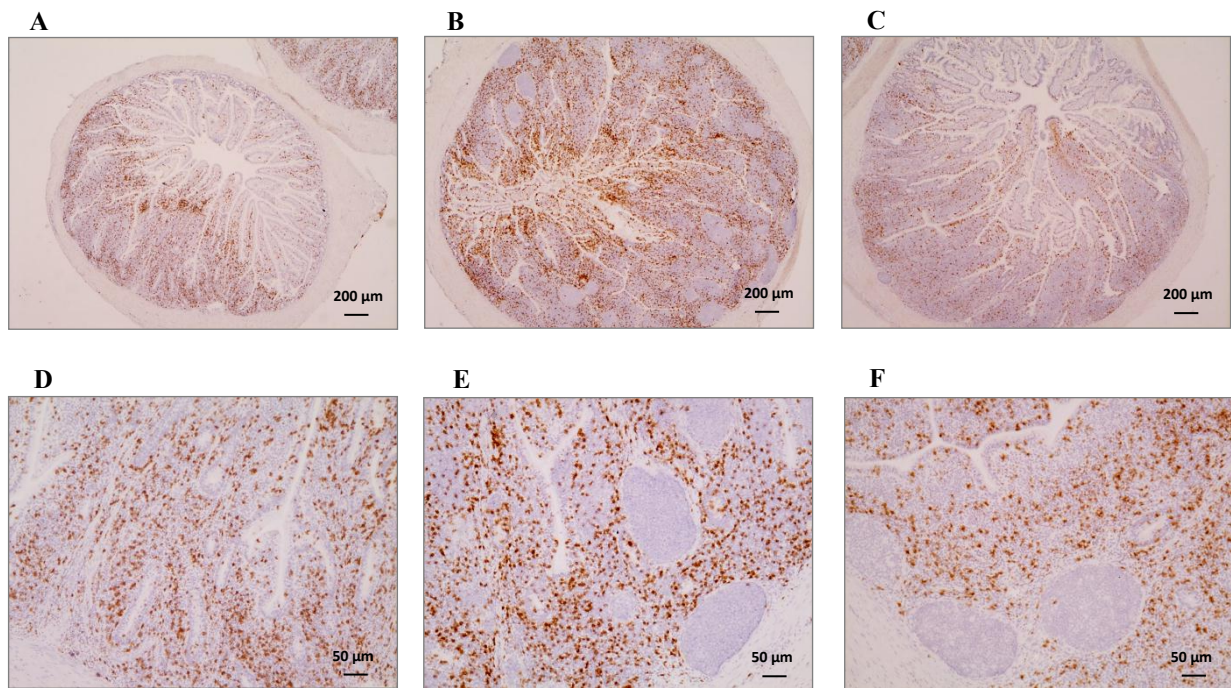


Abbildung 75: $\gamma\delta$ T-Lymphozyten in der Caecaltonsille am 55. Lebenstag

Immunhistologische Färbung des Caecums von keimfrei gehaltenen (A, D), konventionell gehaltenen (B, E) und tetra-rekonstituierten (C, F) Hühnern an Tag 55 nach dem Schlupf mit dem mAK TCR1. Die obere Reihe (A-C) zeigt eine Übersicht (Vergrößerung 2,5x) mit jeweiliger Detailansicht in der unteren Reihe (D-F, 10x).

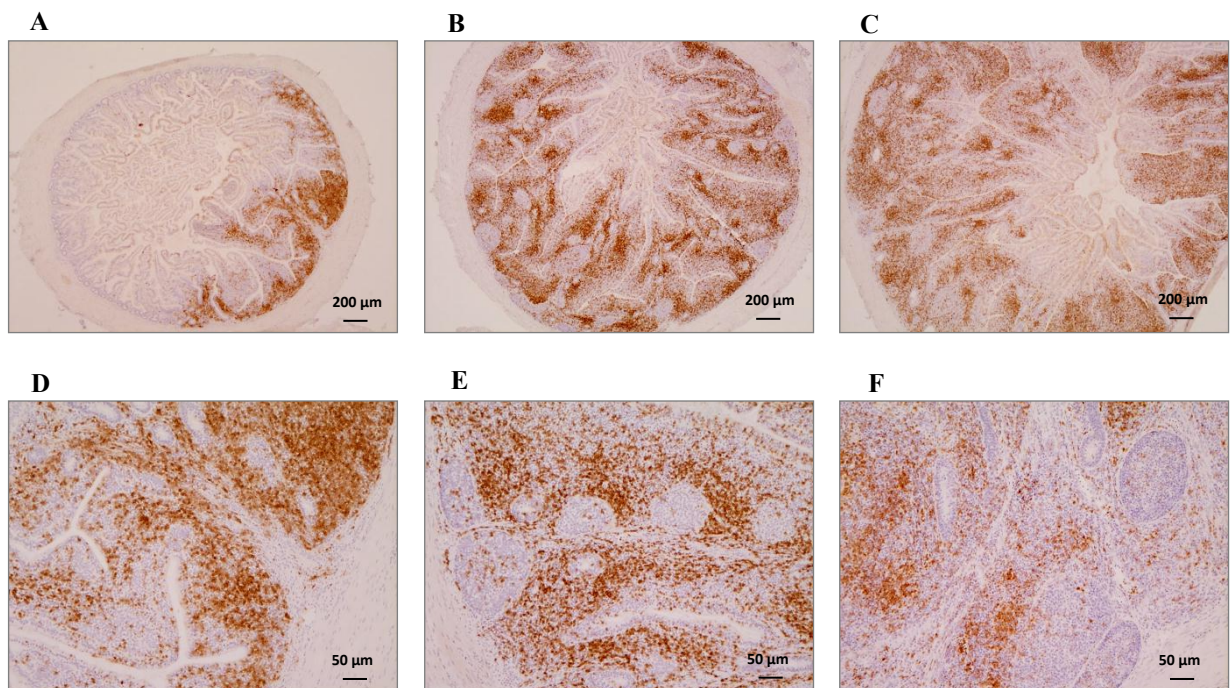


Abbildung 76: $\alpha\beta$ T-Lymphozyten in der Caecaltonsille am 55. Lebenstag

Immunhistologische Färbung des Caecums von keimfrei gehaltenen (A, D), konventionell gehaltenen (B, E) und tetra-rekonstituierten (C, F) Hühnern an Tag 55 nach dem Schlupf mit dem mAK TCR2. Die obere Reihe (A-C) zeigt eine Übersicht (Vergrößerung 2,5x) mit jeweiliger Detailansicht in der unteren Reihe (D-F, 10x).

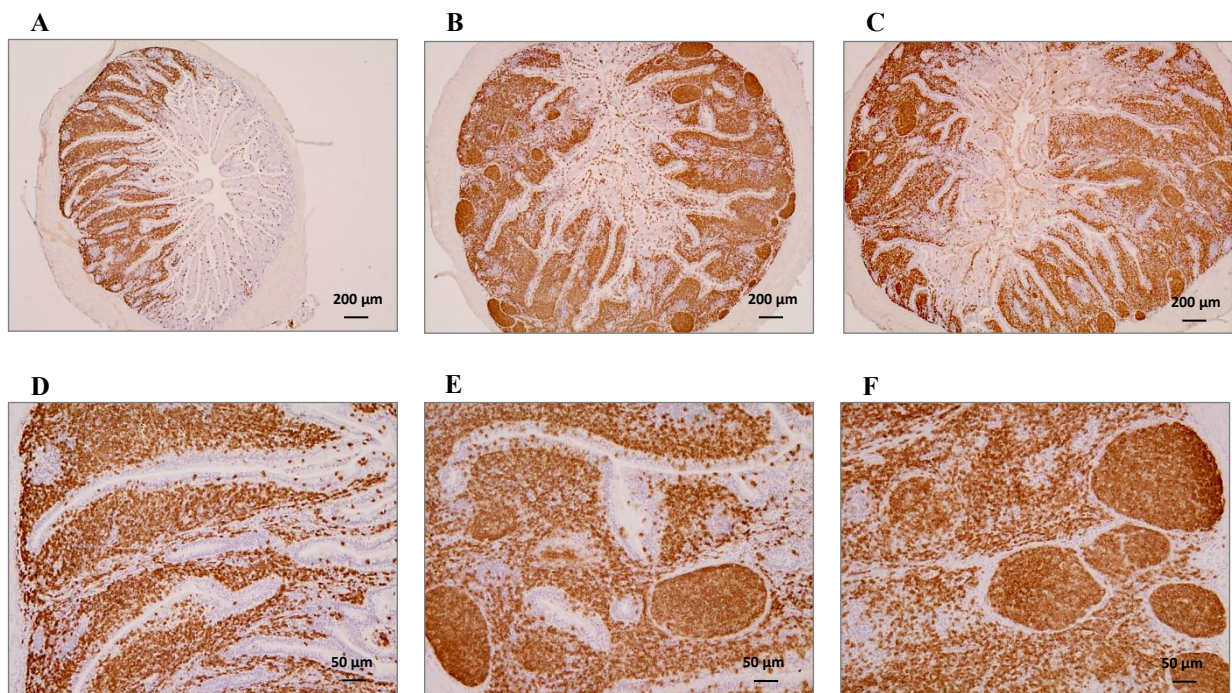


Abbildung 77: B-Lymphozyten in der Caecaltonsille am 55. Lebenstag

Immunhistologische Färbung des Caecums von keimfrei gehaltenen (A, D), konventionell gehaltenen (B, E) und tetra-rekonstituierten (C, F) Hühnern an Tag 55 nach dem Schlupf mit dem mAK AV20. Die obere Reihe (A-C) zeigt eine Übersicht (Vergrößerung 2,5x) mit jeweiliger Detailansicht in der unteren Reihe (D-F, 10x).

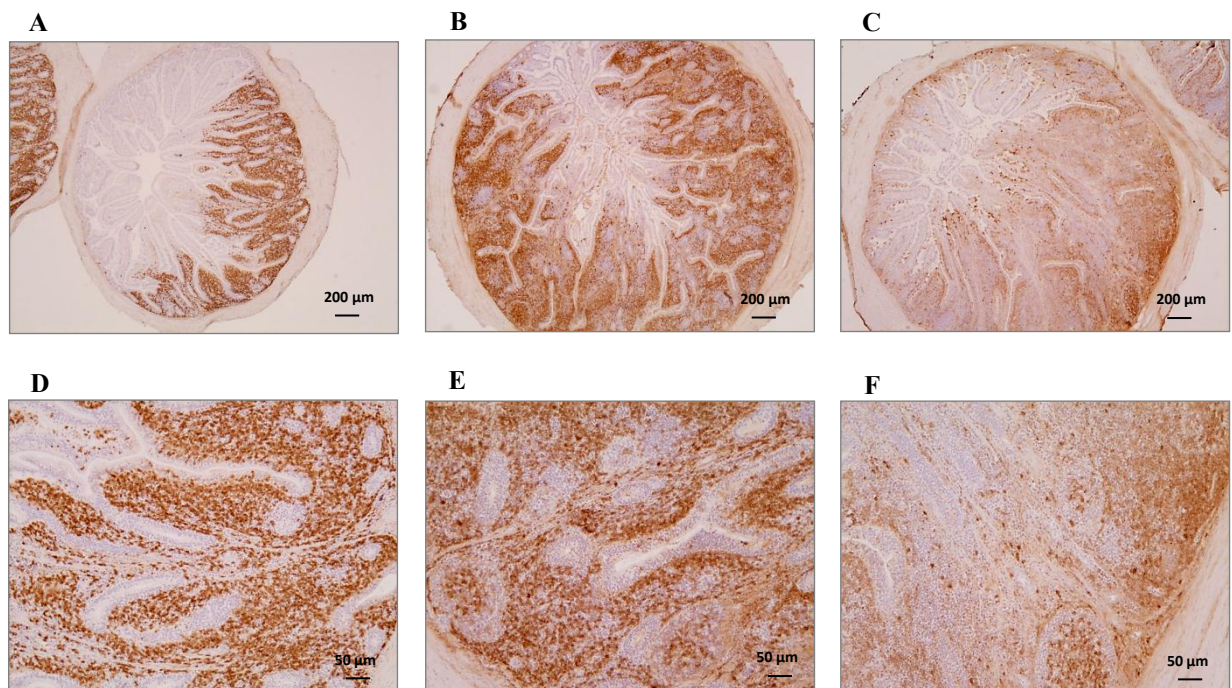


Abbildung 78: IgM in der Caecaltonsille am 55. Lebenstag

Immunhistologische Färbung des Caecums von keimfrei gehaltenen (A, D), konventionell gehaltenen (B, E) und tetra-rekonstituierten (C, F) Hühnern an Tag 55 nach dem Schlupf mit dem mAK M1. Die obere Reihe (A-C) zeigt eine Übersicht (Vergrößerung 2,5x) mit jeweiliger Detailansicht in der unteren Reihe (D-F, 10x).

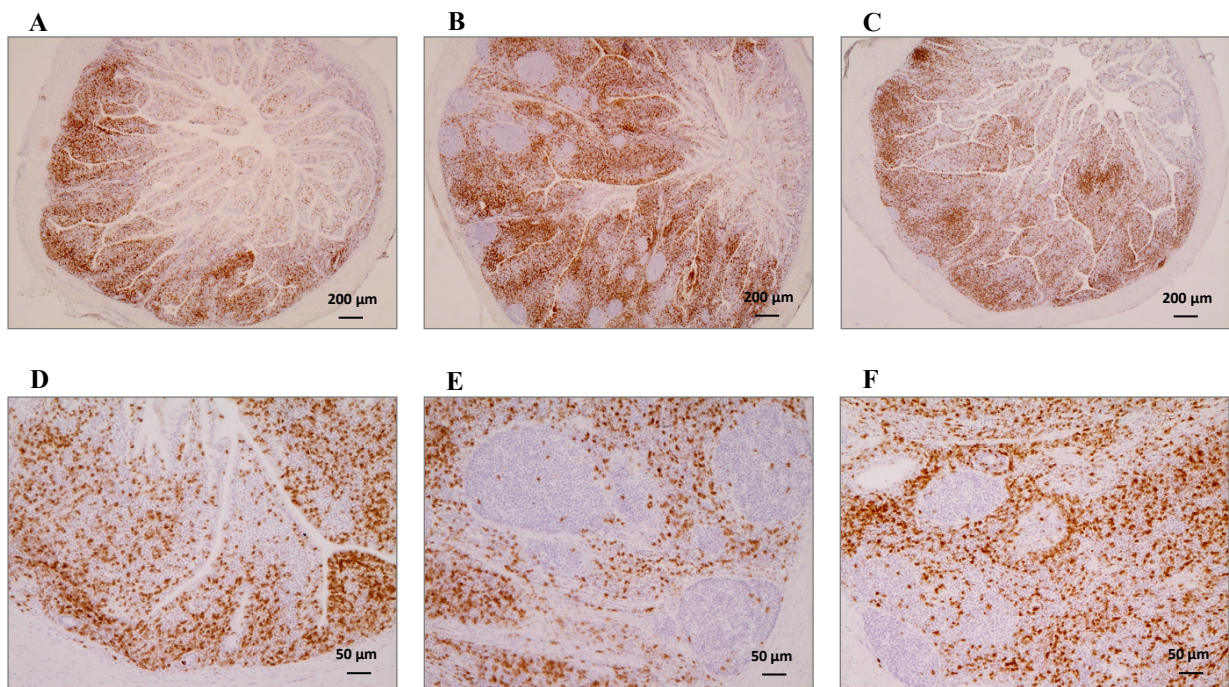


Abbildung 79: CD8⁺ T-Lymphozyten in der Caecaltonsille am 55. Lebenstag

Immunhistologische Färbung des Caecums von keimfrei gehaltenen (A, D), konventionell gehaltenen (B, E) und tetra-rekonstituierten (C, F) Hühnern an Tag 55 nach dem Schlupf mit dem mAK CT8. Die obere Reihe (A-C) zeigt eine Übersicht (Vergrößerung 2,5x) mit jeweiliger Detailansicht in der unteren Reihe (D-F, 10x).

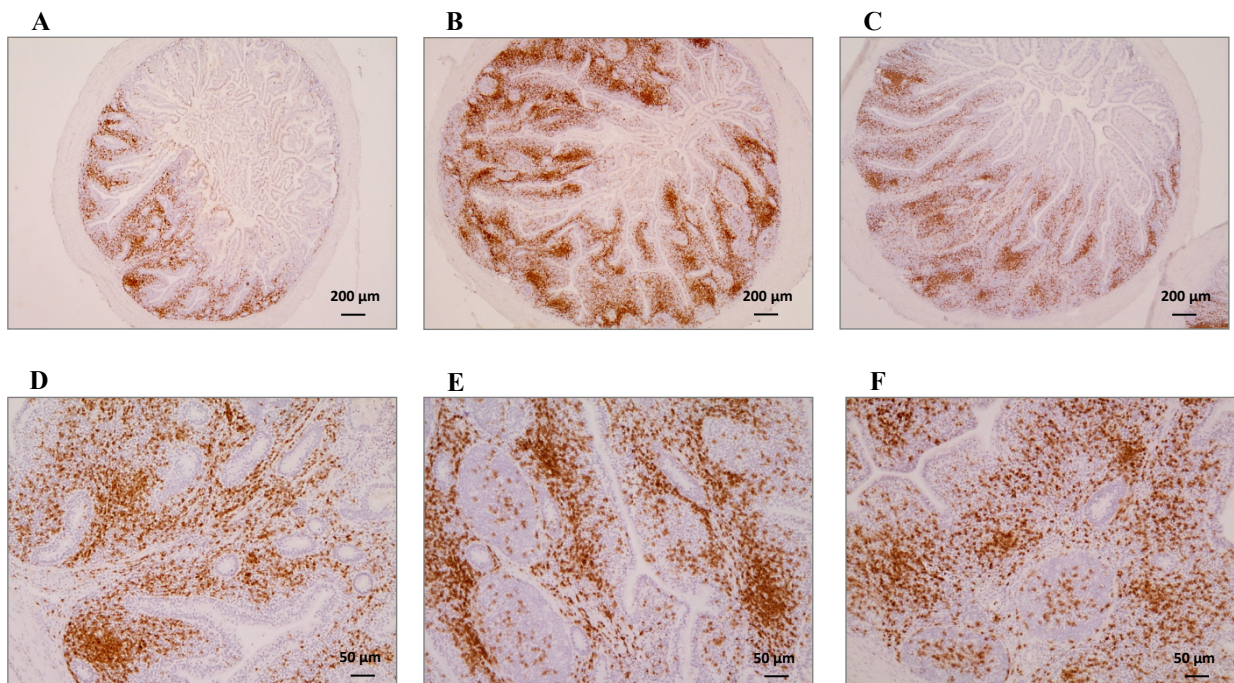


Abbildung 80: CD4⁺ T-Lymphozyten in der Caecaltonsille am 55. Lebenstag

Immunhistologische Färbung des Caecums von keimfrei gehaltenen (A, D), konventionell gehaltenen (B, E) und tetra-rekonstituierten (C, F) Hühnern an Tag 55 nach dem Schlupf mit dem mAK CT4. Die obere Reihe (A-C) zeigt eine Übersicht (Vergrößerung 2,5x) mit jeweiliger Detailansicht in der unteren Reihe (D-F, 10x).

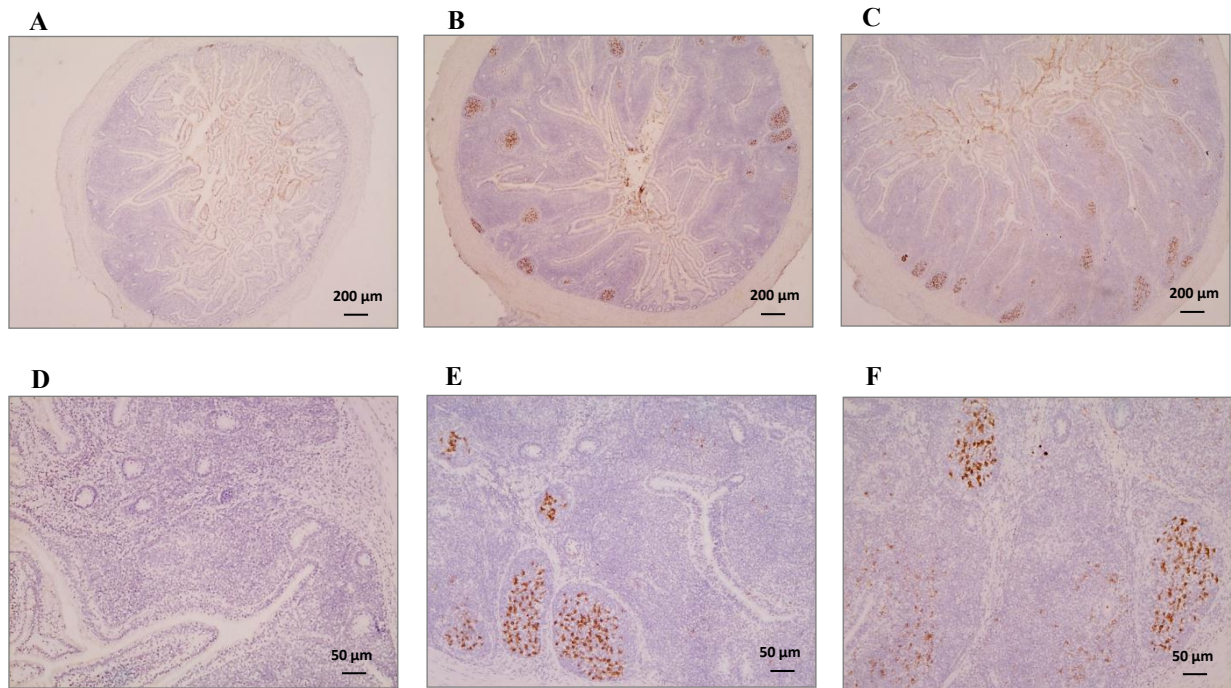


Abbildung 81: IgY in der Caecaltonsille am 55. Lebenstag

Immunhistologische Färbung des Caecums von keimfrei gehaltenen (A, D), konventionell gehaltenen (B, E) und tetra-rekonstituierten (C, F) Hühnern an Tag 55 nach dem Schlupf mit dem mAK G1. Die obere Reihe (A-C) zeigt eine Übersicht (Vergrößerung 2,5x) mit jeweiliger Detailansicht in der unteren Reihe (D-F, 10x).

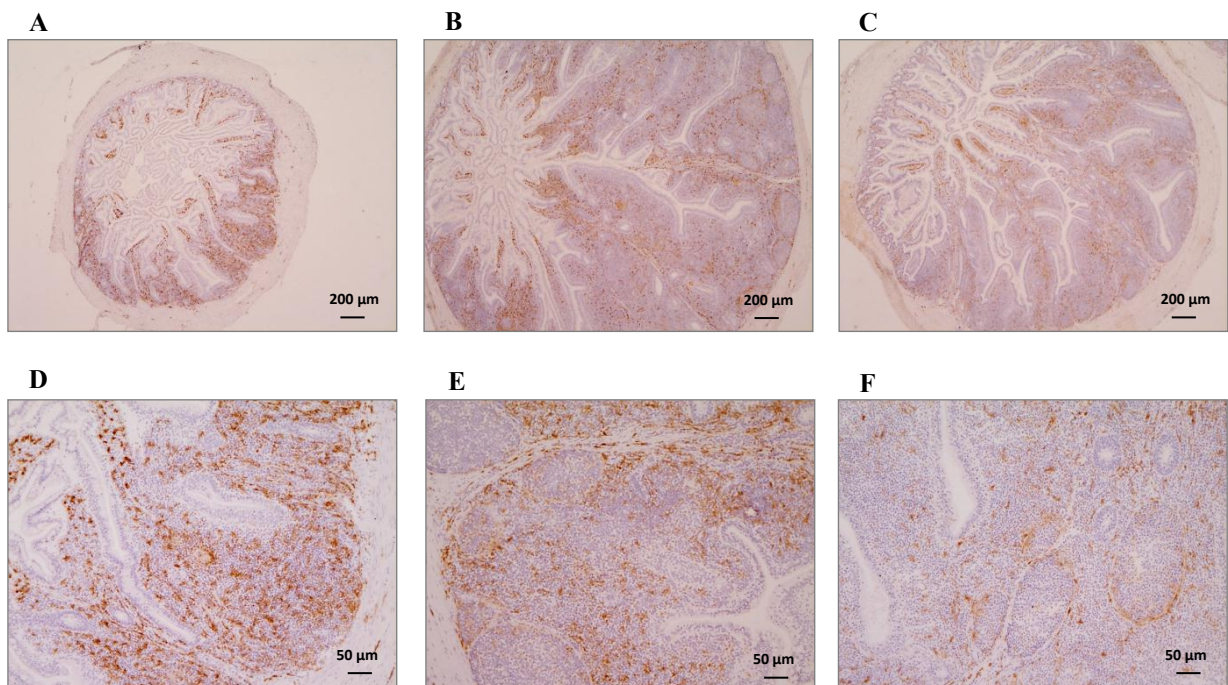


Abbildung 82: Makrophagen in der Caecaltonsille am 55. Lebenstag

Immunhistologische Färbung des Caecums von keimfrei gehaltenen (A, D), konventionell gehaltenen (B, E) und tetra-rekonstituierten (C, F) Hühnern an Tag 55 nach dem Schlupf mit dem mAK Kul01. Die obere Reihe (A-C) zeigt eine Übersicht (Vergrößerung 2,5x) mit jeweiliger Detailansicht in der unteren Reihe (D-F, 10x).

E. Tabellen

Tabelle 18: Untersuchung immunrelevanter Gene mittels qRT-PCR

Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden ausgewählte Gene in der Caecaltonsille (CT) und dem Caecum von keimfrei gehaltenen, konventionell gehaltenen (Konvent), mono-rekonstituierten (Mono) und tetra-rekonstituierten (Tetra) Hühnern mittels qRT-PCR untersucht. Dargestellt ist der Expressionsunterschied (fold change) bezogen auf den Wert der Expression bei den keimfrei gehaltenen Tieren (=1). Negative Zahlen stehen für Gene, die bei der Keimfrei-Gruppe stärker exprimiert wurden, positive Zahlen stehen für eine x-fache Hochregulation der Gene in der jeweiligen Vergleichsgruppe. Statistisch relevante Expressionsunterschiede sind in Rot dargestellt (Student's T-Test, $P < 0,05$).

Organ	Tag nach dem Schlupf	Vergleichs- gruppe	Gen																
			IgA	CD4	CD8	IgG	TGFb	AID	PIGR	IgJ	chB6	TNFRSF13C	IL21	CD40L	Il6	CXCR5	Il1b	TACI	BAFF
Caecum	3	Konvent	-1	2	2	-1	-1	-1	-1	1	2	1	-1	-	-	-	-	-	-
	7		2	2	1	3	1	-1	10	4	-4	1	1	-	-	-	-	-	-
	14		31	-1	-2	14	-1	-1	8	3	-2	-1	-1	-	-	-	-	-	-
	21		36	1	1	6	-1	1	5	4	1	-1	1	-	-	-	-	-	-
	28		261	2	1	124	-1	3	4	32	1	2	4	1	-1	5	2	-1	1
		Mono	1027	2	1	218	-1	2	2	52	-	-	2	1	2	6	-1	-2	2
		Tetra	434	2	1	84	-2	2	2	26	-	-	4	1	1	5	-1	-1	1
CT	28	Konvent	6	2	2	135	2	14	1	12	1	2	68	3	4	5	2	1	2
		Mono	17	1	1	186	1	6	1	18	-	-	37	1	10	2	-1	2	2
		Tetra	35	2	3	253	2	16	1	19	-	-	129	3	54	3	5	-1	2

11. DANKSAGUNG

Als erstes möchte ich mich bei Prof. Dr. Bernd Kaspers für die Überlassung dieses spannenden Dissertationsthemas und die freundliche und exzellente wissenschaftliche und persönliche Unterstützung bedanken. Vielen Dank für die interessanten, informativen und humorvollen Diskussionen im Labor, Büro und während der langen Autofahrten nach Frankreich, die entscheidend zu meiner Freude am wissenschaftlichen Arbeiten und dem Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ein besonderer Dank gebührt Dr. Susanne Röhl für die Mitarbeit an dem Projekt, alle Arbeiten den Microarray betreffend und die hervorragende wissenschaftliche und persönliche Unterstützung besonders während der Phase des Zusammenschreibens. Danke für Deinen steten Zuspruch, deine große Hilfsbereitschaft und deine konstruktive Kritik. Das hat Vieles leichter gemacht.

Vielen Dank auch der Arbeitsgruppe Blum im Genzentrum, die es ermöglichten, die Microarray Experimente durchzuführen.

Bei Herrn Prof. Dr. M. Stangassinger und Herrn Prof. Thomas Göbel möchte ich mich für den am Institut zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz bedanken.

Für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die große Hilfsbereitschaft möchte ich Dr. habil. Sonja Härtle, Dr. Benjamin Schusser, Beatrice Scherer, Ingrid Riehl und Marina Kohn danken. Vielen Dank für eure Unterstützung in technischen Fragen und die aufmunternden Worte. Sonja, Marina, Beatrice und Ingrid danke ich außerdem ganz herzlich für die Unterstützung bei der Durchführung der ELISAs.

Ein herzlicher Dank geht auch an die AG Göbel, für die tolle Zusammenarbeit am Institut und die enge wissenschaftliche Kooperation.

Ganz besonderer Dank gilt außerdem den Projektpartnern am INRA Philippe Velge, Catherine Schouler und ihren Mitarbeitern für die gute Zusammenarbeit und die exzellente wissenschaftliche Unterstützung sowie die Bereitstellung der Keimfreieinrichtung und die großartige gemeinsame Durchführung der Keimfreiversuche, die diese Arbeit erst ermöglicht haben.

Für die Betreuung aller Verwaltungsangelegenheiten bedanke ich mich herzlich bei Frau Crass und Frau Summer. Für die Unterstützung in Computerangelegenheiten möchte ich mich bei Vanessa Alf bedanken.

Ein herzliches Dankeschön an meine Mitdoktoranden für die nette gemeinsame Zeit am Institut und die schönen Ausflüge. Julia, Melanie, Suse, Maria Z., Christian, Doro, Maria L., Larissa, Bernhard und Vanessa, es war schön mit Euch, vielen Dank für alles!

Einen lieben Dank an Jenny und Larissa für das fleißige Korrekturlesen und den persönlichen Zuspruch.

Für die emotionale Stütze und die mitunter willkommene Ablenkung möchte ich meinen Freunden Resi, Eike, Sophie, Stanzi, Nici, Angi, Nico und Katja danken.

Von ganzem Herzen danke ich Jess, für die liebevolle Unterstützung, die Mut machenden Worte, das viele Zuhören und dass Du immer an mich glaubst!

Für die regelmäßige finanzielle Unterstützung bin ich meiner Oma Anne besonders dankbar. Auch dem Rest meiner Familie möchte ich von Herzen danken.

Ich widme diese Arbeit meinen Eltern, die mich stets bedingungslos und liebevoll in allen Herausforderungen unterstützt haben, dafür gesorgt haben, dass es mir an nichts fehlt und mir gezeigt haben, wie stolz sie auf mich sind. Ihr wart mir damit die größten Motivatoren!