

Aus der Klinik für Wiederkäuer mit Ambulanz und Bestandsbetreuung  
(Lehrstuhl für Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung: Prof. Dr. H. Zerbe)  
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

---

# **Funktionelle Untersuchungen zur Endotoxintoleranz bei der Mastitis des Rindes**

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

von  
Eva Monika Kalivoda  
geb. Kemeter  
aus Garmisch-Partenkirchen

München 2010

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Zerbe

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Hermanns

Tag der Promotion: 24. Juli 2010

Gefördert durch eine Sachmittelspende und ein Promotionsstipendium der  
H. WILHELM SCHAUMANN STIFTUNG

Meiner Familie

**INHALTSVERZEICHNIS**

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT .....</b>	<b>4</b>
<b>2.1</b>	<b>Die Mastitis des Rindes .....</b>	<b>4</b>
2.1.1	Bedeutung.....	4
2.1.2	Pathogenese .....	4
2.1.3	Wachstum Gram-negativer Mastitiserreger <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i> .....	5
<b>2.2</b>	<b>Immunologische Abwehrmechanismen in der bovinen Milchdrüse .....</b>	<b>7</b>
2.2.1	Zelluläre Abwehrmechanismen.....	8
2.2.2	Humorale Abwehrmechanismen .....	13
<b>2.3</b>	<b>Aktivierung und Toleranz des angeborenen Immunsystems nach LPS- Erkennung .....</b>	<b>20</b>
2.3.1	Lipopolysaccharid .....	20
2.3.2	Toll-like-Rezeptor 4 (TLR-4).....	22
2.3.3	Endotoxintoleranz .....	25
<b>2.4</b>	<b>In-vitro-Modelle für die bovine Mastitis.....</b>	<b>31</b>
2.4.1	Permanente Zelllinien .....	31
2.4.2	Primäre bovine Milchdrüsenepithelzelle.....	32
<b>3</b>	<b>GERÄTE, MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>35</b>
<b>3.1</b>	<b>Geräte .....</b>	<b>35</b>
3.1.1	Geräte .....	35
3.1.2	Geräte für die Zellkulturarbeit.....	36
<b>3.2</b>	<b>Material .....</b>	<b>36</b>
3.2.1	Klinikbedarf .....	36
3.2.2	Laborbedarf .....	37
3.2.3	Reagenzien .....	39
3.2.4	Kulturmedien, Puffer und Lösungen .....	40
3.2.4.1	Zellkulturmedien und Zusätze.....	40
3.2.4.2	Lipopolysaccharidlösung (LPS) für die Stimulationsversuche.....	43
3.2.4.3	Lösungen für die Bestimmung der chemoattraktiven Wirkung der Zellkulturüberstände (Transmigrationskammer).....	43

---

3.2.4.4	Material für die Bestimmung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS).....	43
3.2.4.5	Material für die Gewinnung von neutrophilen Granulozyten .....	44
3.2.4.6	Material für die Bestimmung der Phagozytosekapazität.....	45
3.2.4.7	Lösungen für die Durchflusszytometrie .....	46
3.2.4.8	Material für den Vitalitätsnachweis von Zellen .....	46
3.2.4.9	Material für die Zellidentifikation.....	46
3.2.4.10	Medien für die Bakterienkultivierung .....	47
3.2.5	Versuchstiere .....	47
3.2.5.1	Versuchstiere zur Untersuchung der Milch nach LPS-Vorbehandlung .....	47
3.2.5.2	Spendertiere für die Gewebegewinnung .....	47
3.2.5.3	Spendertiere zur Blutgewinnung.....	47
3.2.6	Modellbakterien .....	48
<b>3.3</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>48</b>
3.3.1	Methoden zur Untersuchung der Milch LPS-vorbehandelter Kühe auf wachstumshemmende Eigenschaften .....	48
3.3.1.1	Probanden und Modellbedingungen der Versuchstiere zur Gewinnung der Milch .....	49
3.3.1.2	Gewinnung des Milchsekretes .....	49
3.3.1.3	Milchpräparation für die Ex-vivo-Untersuchungen der Milch LPS- vorbehandelter Kühe .....	50
3.3.1.4	Präparation der In-vitro-Infektionsdosis .....	50
3.3.1.5	Erstellen der Wachstumskurven von <i>E. coli</i> in Vollmilch und zellfreier Magermilch .....	51
3.3.1.6	Bestimmung der somatischen Zellzahl der Milch.....	52
3.3.2	Methoden zur Kultivierung und Charakterisierung boviner Milchdrüsenepithelzellen (MEC).....	53
3.3.2.1	Präparation und Kryokonservierung der primären bovinen Milchdrüsenepithelzellen .....	53
3.3.2.2	Kollagenbeschichtung der Zellkulturplatten .....	55
3.3.2.3	Kultivierung und Passagieren der primären bovinen Milchdrüsenepithelzellen .....	56
3.3.2.4	Passagieren und Kryokonservieren der MAC-T (Mammary Alveolar Cell- large T antigen) .....	60
3.3.2.5	Kultivierung der MAC-T .....	61

---

3.3.2.6	Zellzahlbestimmung in der Zellkultur.....	62
3.3.2.7	Identifizierung der Milchdrüsenepithelzelle .....	62
3.3.2.8	Vitalitätsnachweis bei den Kulturzellen.....	65
3.3.3	Methoden für ein In-vitro-Modell zur LPS-Toleranz .....	66
3.3.3.1	Herstellen der LPS-Präparation für die Stimulationsversuche.....	66
3.3.3.2	In-vitro-Modell für den Nachweis einer LPS-Toleranz bei der pbMEC und der MAC-T.....	67
3.3.4	Methoden zur Charakterisierung von PMN-Funktionen.....	68
3.3.4.1	Blutentnahme .....	68
3.3.4.2	Gewinnung der polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) aus dem Blut .....	69
3.3.4.3	Zellzahlbestimmung der Granulozyten .....	69
3.3.4.4	Durchflusszytometrie .....	69
3.3.4.5	PMN-Transmigrationsassay .....	70
3.3.4.6	Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) durch PMN.....	73
3.3.4.7	Phagozytosekapazität der PMN .....	73
3.3.4.8	CXCL8 (IL-8) ELISA .....	74
3.3.5	Statistik.....	75
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>77</b>
<b>4.1</b>	<b>Einfluss einer intramammären LPS-Behandlung auf das <i>E. coli</i>-Wachstum <i>in vitro</i>.....</b>	<b>77</b>
4.1.1	Wachstum von <i>E. coli</i> in Vollmilch.....	77
4.1.2	Wachstum von <i>E. coli</i> in zellfreier Magermilch .....	80
4.1.3	Einfluss der Somatischen Zellzahl der Milch (SCC) auf das Wachstum von <i>E. coli in vitro</i> .....	81
<b>4.2</b>	<b>Etablierung eines In-vitro-Entzündungsmodells zur Untersuchung der LPS-Toleranz in der bovinen Milchdrüsenepithelzelle .....</b>	<b>84</b>
4.2.1	Methodische Vorarbeiten .....	84
4.2.1.1	Reinheit des pbMEC-Kultursystems.....	84
4.2.1.2	Vitalitätsnachweis der Kulturzellen .....	85
4.2.1.3	Ermittlung der wirksamen LPS-Dosis bei pbMEC und MAC-T zur Chemotaxisinduktion bei PMN.....	87
4.2.1.4	CXCL8 (IL-8)-Nachweis in Zellkulturüberständen LPS-stimulierter pbMEC .....	90

---

4.2.1.5	Einfluss LPS-stimulierter MEC auf die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) durch PMN.....	90
4.2.2	Einfluss LPS-stimulierter MEC auf die Phagozytosekapazität von PMN ..	92
4.2.3	Induktion einer LPS-Toleranz in Milchdrüsenepithelzellen <i>in vitro</i> .....	94
4.2.3.1	Induktion einer LPS-Toleranz in pbMEC .....	95
4.2.3.2	Induktion einer LPS-Toleranz in MAC-T .....	96
<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>98</b>
<b>5.1</b>	<b>Konzeptionelle Überlegungen .....</b>	<b>98</b>
<b>5.2</b>	<b>Einfluss einer intramammären LPS-Vorbehandlung auf das <i>E. coli</i>-Wachstum <i>in vitro</i> .....</b>	<b>100</b>
<b>5.3</b>	<b>Induktion einer LPS-Toleranz in der MEC.....</b>	<b>103</b>
<b>5.4</b>	<b>Schlussbetrachtung und Ausblick .....</b>	<b>113</b>
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>115</b>
<b>7</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>118</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>120</b>
<b>9</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>155</b>

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

°C	Grad Celsius
μ	mikro (x 10 <sup>-6</sup> )
μg	Mikrogramm (10 <sup>-6</sup> g)
μl	Mikroliter (10 <sup>-6</sup> l)
μm	Mikrometer (10 <sup>-6</sup> m)
<i>Aqua dest.</i>	Aqua destillata (destilliertes Wasser)
AOHA	Acyloxyacyl-Hydrolase
APS	Antibiotic-Antimycotic
AK	Antikörper
AUC	area under the curve
BHI	brain-heart-infusion-broth (Hirn-Herz-Bouillon)
BME-UV	permanente Zelllinie der bovinen Milchdrüsenepithelzelle
BNBD5	Bovines β-Defensin-5
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
C1q	Fragment der Komplementkomponente 1
C3b	opsonisierendes Fragment der Komplementkomponente 3b
C3bi	Fragment der Komplementkomponente 3
C5a	Fragment der Komplementkomponente 5
CD	Cluster of Differentiation
CFU	Colony forming units
cm	Zentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
COX	Cyclooxygenase
CXCL5, -6, -8, -9,	Interleukin (IL) -5, -6, -8, -9
CXCR4	Chemokinrezeptor 4
DD	Death Domain
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonucleinsäure

---

DMSO	Dimethylsulfoxid
DHR	Dihydrorhodamin
€	Euro
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EHS	Engelbert-Holm-Swarm (Sarkom-Zelllinie)
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Assay
et al.	et alii (lateinisch; und andere)
etc.	et cetera (lateinisch; und weiteres)
FACScan <sup>®</sup>	Fluorescence Activated Cell Scanner (Fluoreszenzaktiviertes Zellmessgerät der Firma Becton Dickinson, Heidelberg)
F <sub>c</sub>	fragment crystalline (kristallisierbarer Antikörperteil, carboxyl-terminales Fragment von Immunglobulinen nach Papain-Spaltung)
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
FL1, -2, -3	Messkanäle des Durchflusszytometers für emittierte Fluoreszenz FL1=Grünfluoreszenz, 530±15 nm FL2=Orangefluoreszenz, 585±21 nm FL3=Rotfluoreszenz, >650 nm
FSC	Forward Scatter (Vorwärtsstreulicht), Messparameter des FACScan <sup>®</sup>
g	Gramm
G-CSF	Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
GM-CSF	Granulozyten/Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
h	hora (lateinisch; Stunde)
H7	permanente Zelllinie der bovinen Milchdrüsenepithelzelle
HBSS	Hank's Buffered Salt Solution
HCl	Salzsäure
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-ethansulfonsäure

---

H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
H <sub>2</sub> S	Schwefelwasserstoff
hsp	heat shock protein (Hitze-Schock Protein)
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
I <sub>κ</sub> B	Inhibitor des nuclear factors kappa-B
IKK	I <sub>κ</sub> B-Kinase
IL	Interleukin
IL-1RA	Interleukin-1-Rezeptor-Antagonist
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid Synthetase
IRAK-1	Interleukin- IL-1-Rezeptor assoziierte Kinase 1
IRAK-4	Interleukin- IL-1-Rezeptor assoziierte Kinase 4
IRAK-M	Interleukin- IL-1-Rezeptor assoziierte Kinase M
IU	International Units
i.v.	intra venös
KBE	Kolonie bildende Einheit
kD	Kilodalton
kg	Kilogramm
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
KDO	Keto-desoxy-oktonat
l	Liter
L1	permanente Zelllinie der bovinen Milchdrüsenepithelzelle
LAP	Lingual Antimicrobial Peptide
LB-Medium	Luriant-Bertani-Medium
LBP	Lipopolysaccharide-Binding Protein
LF	Laktoferrin
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
LPS	Lipopolysaccharid
LTA	Lipoteichonsäure

---

m	milli ( $\times 10^{-3}$ )
MAC-T	Mammary Alveolar Cell-Large T antigen
MAL	MyD88 adapter-like protein
MAPK	Mitogen-aktivierende Protein-Kinase
mCD14	membranständiges CD14
M-CSF	Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor
MD	myeloid differentiation protein
MEC	Milchdrüsenepithelzelle
MHC	Major Histocompatibility Complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
min	Minute(n)
MIP	Makrophagen-inflammatorisches Protein
ml	Milliliter ( $10^{-3}l$ )
mM	Millimol ( $10^{-3}M$ )
mm	Millimeter
mRNA	Messenger Ribonucleinsäure
MW	arithmetischer Mittelwert
MyD88	Myeloider Differenzierungsfaktor 88
n	nano ( $\times 10^{-9}$ )
n=	Anzahl der Einzelbeobachtungen
NaCl	Natriumchlorid
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Natriumcarbonat
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumbicarbonat
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
NaN <sub>3</sub>	Natriumazid
NF <sub>κ</sub> B	nuclear factor-kappa B (Transkriptionsfaktor)
nm	Nanometer ( $10^{-9}m$ )
nmol	Nanomol ( $10^{-9}mol$ )
NO	Stickstoffmonoxid

---

OD	optische Dichte
P	pico (x 10 <sup>-12</sup> )
p=	Irrtumswahrscheinlichkeit bei der Analyse der Ähnlichkeit zweier Datengruppen
PAMP	Pathogen Associated Molecular Pattern (Molekulare Muster von Erregern)
pbMEC	primäre bovine Milchdrüsenepithelzelle
PBS	Phosphate Buffered Saline (phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PCR	Polymerase Chain Reaction
Pellet	Bodensatz; hier: durch Zentrifugation sedimentierte Zellen
pg	Picogramm (10 <sup>-12</sup> g)
pH	potentia hydrogenii (lateinisch; Wasserstoffionen-Exponent)
PJ	Propidiumjodid
PMA	Phorbol-Myristat-Acetat
PMN	Polymorphonuclear Neutrophils (polymorphkernige neutrophile Granulozyten)
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
PRR	Pattern Recognition Receptor (Erregererkennungsrezeptor)
R=	Korrelationskoeffizient
R-LPS	Rough-Lipopolysaccharid
rhIL-8	rekombinantes humanes Interleukin-8
ROS	Reactive Oxygen Species (Reaktive Sauerstoffspezies)
RT	Raumtemperatur
SAA	Serum Amyloid A
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SCC	Somatic Cell Count (Somatische Zellen in der Milch)
sCD14	soluble CD14 (lösliches CD14)
SD	Standardabweichung
SIRS	Systemisches inflammatorisches Response-Syndrom
S-LPS	Smooth-Lipopolysaccharid
s.o.	siehe oben

---

sog.	sogenannte(r)
<i>spp.</i>	Spezies
SSC	Side Scatter (Seitwärtsstreulicht), Messparameter des FACScan®
TGF- $\beta$	Transforming growth factor $\beta$
Th1	T-Helfer-Zelle Phänotyp 1
Th2	T-Helfer-Zelle Phänotyp 2
TICAM1	TIR-domain-containing adaptor inducing IFN- $\beta$
TICAM2	TIR-containing adaptor molecule 2
TIR	Toll-interacting-receptor
TIRAP	TIR-domain-containing adaptor protein
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TOLLIP	Toll interacting protein
TRAF	TNF receptor associated factor
TRAM	TIR-domain-containing adaptor inducing interferon- $\beta$ related adaptor molecule
TRAMP	TNF-receptor related apoptosis mediating protein
TRIF	TIR-domain-containing adaptor inducing IFN- $\beta$
TSB	trypticase-soy-broth (Trypton-Soya-Bouillon)
TXB <sub>2</sub>	Thromboxan B <sub>2</sub>
u.a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
v.a.	vor allem
VIP	Vasoaktives Intestinales Peptid
VRB-Agar	Violett-Red-Bile-Agar (Kristallviolett-Galle-Laktose-Agar)
$\tilde{x}$	Median
x g	multipliziert mit der Gravitationsbeschleunigung (9,81 m/s <sup>2</sup> )
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

## 1 Einleitung

Die Euterentzündung (Mastitis) des Rindes ist weltweit die teuerste Einzeltierkrankung in der Milchwirtschaft<sup>1</sup>. Sie wird fast ausschließlich durch bakterielle Erreger hervorgerufen. Abhängig von den beteiligten Erregern und der Empfänglichkeit des Wirts kann das klinische Bild der Erkrankung stark variieren. Schwerwiegende klinische Mastitiden werden häufig durch Gram-negative Bakterien, wie z.B. *Escherichia coli* (*E. coli*) hervorgerufen<sup>2</sup>. Hauptsächlich verantwortlich für den Verlauf akuter Mastitiden durch Gram-negative Bakterien ist das Lipopolysaccharid (LPS; syn. Endotoxin), das bei der Teilung und beim Absterben von *E. coli* im Euter freigesetzt wird<sup>3</sup>. LPS wird über entsprechende Rezeptoren der Wirtszellen erkannt und löst dadurch eine Immunreaktion aus. Derzeit basiert die medikamentelle Therapie wie auch die Prophylaxe bei Mastitiden überwiegend auf der Anwendung von Antibiotika. Neben oftmals unbefriedigenden Therapie-Erfolgen ist ihr Einsatz auch aufgrund von Resistenzentwicklungen und aus Sicht des Verbraucherschutzes zunehmend umstritten.

Die initialen Vorgänge, welche bei der Entstehung der Mastitis den anschließenden Schweregrad der Erkrankung beeinflussen, sind bislang nur unvollständig aufgeklärt. Wesentlich erscheint die Fähigkeit des Wirtes, den Erreger früh zu erkennen und eine angemessene Immunantwort einzuleiten. Diese sollte vorzugsweise den Erreger zügig eliminieren, dem Wirt aber nur minimalen Schaden zufügen. Die vorliegende Arbeit soll einen Beitrag zur Aufklärung der initialen Vorgänge bei der Mastitis leisten, so dass die Voraussetzungen für die Entwicklung neuer Therapie- und Prophylaxekonzepte geschaffen werden können.

Kernpunkt der vorliegenden Arbeit sind Untersuchungen zur Ausnutzung der Endotoxintoleranz als Grundlage für mögliche Prophylaxekonzepte hinsichtlich akuter klinischer Mastitiden. Die Endotoxintoleranz ist definiert als eine herabgesetzte Empfindlichkeit gegenüber LPS oder anderen Erregerbestandteilen aufgrund einer vorhergehenden Exposition gegenüber demselben. Die induzierte Toleranz kann vor letalen LPS-Dosen schützen, Entzündungen begrenzen und ischämische Gewebeschädigungen verhindern<sup>4</sup>. In der Vergangenheit versuchte man diesen Gewöhnungseffekt, insbesondere beim Menschen, zur Prophylaxe von

septischen Erkrankungen zu instrumentalisieren<sup>5</sup>.

In einem assoziierten Projekt der eigenen Arbeitsgruppe wurde im Rahmen eines Tiermodells gezeigt, dass eine intramammäre LPS-Behandlung bei einer nachfolgenden experimentellen *E. coli*-Infektion eine Mastitis verhinderte oder die klinischen Symptome stark abschwächte<sup>6</sup>. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, durch In-vitro-Studien Hinweise auf entscheidende Mechanismen der induzierbaren Endotoxintoleranz in der Milchdrüse zu erhalten.

In einem Teil des Dissertationsprojektes soll geprüft werden, ob die im Tiermodell festgestellte abgeschwächte Immunreaktion nach LPS-Vorbehandlung mit einer Veränderung der wachstumsregulierenden Effekte des Milchsekretes verbunden ist. Dafür wurde das Milchsekret der Kühe aus dem oben beschriebenen Tiermodell hinsichtlich seiner Wachstumseigenschaften für *E. coli* nach intramammärer LPS-Behandlung untersucht.

Der methodische Fokus der vorliegenden Arbeit richtet sich auf die Milchdrüsenepithelzelle (MEC). Ihr wird eine entscheidende Rolle im lokalen Abwehrgeschehen gegenüber Mastitiserregern beigemessen. Sie ist in der Lage, Pathogene zu erkennen und durch die Bildung sowie Freisetzung proinflammatorischer Zytokine die frühe Phase der Immunantwort zu beeinflussen. Für die vorliegenden Experimente wurde die Hypothese formuliert, dass eine Vorstimulation der MEC mit LPS zu einer nachfolgend abgeschwächten Immunreaktion führt. Hierfür soll ein In-vitro-Entzündungsmodell mit primären bovinen Milchdrüsenepithelzellen (pbMEC) und einer immortalisierten bovinen Milchdrüsenepithelzelllinie (MAC-T) entwickelt werden. Anhand dessen soll die Induzierbarkeit einer Endotoxintoleranz in der MEC geprüft werden. Im Vordergrund stehen Methoden, mit denen es möglich ist, modellhaft die Interaktionen der MEC mit relevanten Entzündungszellen (neutrophilen Granulozyten; PMN) funktionell *in vitro* zu untersuchen. Hierzu eignen sich insbesondere die Chemotaxis, die Bildung reaktiver Sauerstoffmetaboliten und die Phagozytosekapazität von PMN. Damit sollen Untersuchungen anderer Teilprojekte, welche die Immunkompetenz der MEC bereits auf RNA- und Protein-Ebene charakterisiert haben, um funktionelle Studien ergänzt werden<sup>7-8</sup>.

Die vorliegende Dissertationsarbeit ist Teil eines wissenschaftlichen Gesamtkonzeptes zur Erforschung der Mastitis-Pathogenese beim Rind. In

---

assoziierten und nachfolgenden Projekten werden insbesondere die lokalen und systemischen Immunmechanismen der frühen Erreger-Wirts-Interaktionen analysiert. Längerfristiges Ziel ist es, durch den gezielten prophylaktischen Einsatz von Immunmodulatoren die Milchkuh vor den Folgen schwerer Mastitiden zu schützen.

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Die Mastitis des Rindes

#### 2.1.1 Bedeutung

Die Mastitis des Rindes ist, wie bereits erwähnt, eine der häufigsten und teuersten Erkrankungen in der Milchwirtschaft. Finanzielle Einbußen entstehen durch die Therapie, den Produktionsverlust und durch die Remontierung von Tieren sowie durch die verschlechterte Milchqualität<sup>9</sup>. Laut einer neueren niederländischen Studie betragen die wirtschaftlichen Verluste in einem durchschnittlichen Milchviehbetrieb für eine klinische Mastitis 210€. Der finanzielle Schaden, der durch Euterentzündungen entsteht, liegt in den Niederlanden pro Kuh im Jahr zwischen 65€ und 182€ und ist abhängig von der Somatischen Zellzahl (SCC; engl.: somatic cell count) in der Tankmilch<sup>10</sup>. Eine Behandlung dieser Erkrankung wird zur Zeit überwiegend mit Antibiotika durchgeführt<sup>11</sup>. Trotz jahrzehntelanger Forschung ist bis heute für eine effektive Mastitisprophylaxe kein effizienter Impfstoff kommerziell erhältlich<sup>12</sup>.

#### 2.1.2 Pathogenese

Die Euterentzündung bei der Kuh entsteht als Reaktion auf eine intramammäre Infektion. Bakterien sind die häufigsten Mastitiserreger, aber auch Mykoplasmen, Pilze und Algen können Mastitiden verursachen. Die Entstehung einer Mastitis kann durch mechanische, chemische und thermische Gewebeschädigung begünstigt werden. Die Manifestation einer Mastitis hängt vom Wirt, dem Erreger und auch von Umweltfaktoren ab<sup>13</sup>. Pathogene, die sich aus der Milch von infizierten Eutervierteln isolieren lassen, werden in „Umweltkeime“ und kontagiöse oder „Kuh-assoziierte“ Erreger unterteilt. Letztere werden vor allem beim Melkvorgang übertragen. In der Gruppe der kontagiösen Mastitiserreger sind *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Streptococcus dysgalactiae* und *Streptococcus agalactiae* von besonderer Bedeutung. Zu den Umweltkeimen gehören v.a. *Streptococcus uberis* und eine Vielzahl Gram-negativer Bakterien<sup>13-14</sup>. Gram-negative Bakterien werden am häufigsten bei akuten klinischen Euterentzündungen isoliert. Zu den Gram-negativen *Enterobacteriaceae* zählen die Spezies *Escherichia*, *Klebsiella* und *Enterobacter*. Sie sind Verursacher der

sogenannten „Koliformen Mastitis“. Andere Gram-negative Mastitiserreger sind *Serratia*, *Pseudomonas* und *Proteus*. *Escherichia coli* (*E. coli*) ist der wichtigste Erreger akuter klinischer Mastitiden bei Milchkühen<sup>15</sup>. Sein natürliches Vorkommen ist der Gastrointestinaltrakt warmblütiger Tiere<sup>16</sup>. Eine Infektion der Milchdrüse mit *E. coli* führt fast immer zu einer akuten Mastitis, die oft mit einer hochgradigen Störung des Allgemeinbefindens einhergeht und Septikämie sowie Todesfällen zur Folge haben kann<sup>17</sup>. Es gibt auch Hinweise, dass *E. coli* persistierende intramammäre Infektionen verursacht<sup>14</sup>. Die Infektion des Euters mit *E. coli* erfolgt hauptsächlich, indem die Bakterien durch den Strichkanal eindringen. Der Strichkanal bildet die erste anatomische Abwehrbarriere der Milchdrüse. Nach dessen Passage müssen die Erreger die zellulären und humoralen Abwehrmechanismen überwinden, um sich im Inneren der Milchdrüse vermehren zu können<sup>18-19</sup>.

### 2.1.3 Wachstum Gram-negativer Mastitiserreger *in vivo* und *in vitro*

Die Bakterienvermehrung erfolgt ungeschlechtlich durch Zweiteilung. Bei Bakterien bedeutet Wachstum eine Zunahme der Bakterienzahl, die als Zellzahl/ml angegeben wird. Da die Bestimmung der lebenden Bakterien über die Ermittlung der Anzahl der Kolonien erfolgt, wird die Bakterienkonzentration als Kolonie bildende Einheit pro ml (KBE/ml oder engl.: colony forming units, CFU/ml) angegeben. Weitere Methoden sind z.B. Trübungsmessungen oder das Auszählen in der Zählkammer. Aus der Zunahme der Bakterienzahl pro Zeiteinheit lässt sich die Teilungsrate (oder auch die Generationszeit) berechnen. Diese ist bei den verschiedenen Bakterienspezies unterschiedlich und variiert von 20min bis hin zu mehreren Tagen. Die Generationszeiten *in vivo* und *in vitro* unterscheiden sich meistens. So beträgt die Generationszeit von *E. coli* 20min unter In-vitro-Bedingungen in Monokulturen bei ungestörter Vermehrung. Im Wirt kann sich die Generationszeit bis zu 40h verlangsamen. Gründe sind u.a. Nährstofflimitierung, anfallende Stoffwechselprodukte, Mangel an Adhäsionsmöglichkeiten, Bakterienantagonismus und Abwehrmaßnahmen von Seiten des Wirtes. Das Bakterienwachstum *in vitro* hängt von der Nährstoffzufuhr und der Abfuhr der toxisch wirkenden Stoffwechselprodukte ab. Findet kein Austausch des Kulturmediums statt, dann spricht man von einer statischen Kultur. In diesen Kulturen verläuft das Wachstum nach bestimmten Gesetzmäßigkeiten: Zunächst müssen sich die Bakterien an das neue Milieu gewöhnen (Latenzphase),

dann folgt die Akzelerationsphase, bei der die Bakterien größer werden und sich zu teilen beginnen. Hieran schließt sich die logarithmische Wachstumsphase, die schließlich in die stationäre Phase mündet, wo Nährstoffmangel und toxische Stoffwechselprodukte zu einem Stagnieren des Wachstums führen. Zelltod und Vermehrung von Keimen halten sich dabei die Waage. Gefolgt wird der Prozess von der Absterbephase<sup>20</sup>.

Für die Pathogenese der sogenannten „Koliformen Mastitiden“ spielt die Adhärenz der Erreger am Milchdrüsenepithel keine bedeutende Rolle, sondern die Vermehrungsgeschwindigkeit der Keime im Drüsensekret<sup>18-19</sup>. Je schneller sich die Erreger metabolisch an das Milchsekret adaptieren, desto schneller können sie sich vermehren und eine Entzündung herbeiführen. Es besteht eine direkte Korrelation zwischen der Schwere der klinischen Symptome und der Höhe der Keimzahl in der Drüse<sup>21</sup>. Bedeutend für die krankmachende Eigenschaft koliformer Mastitiserreger ist deren Fähigkeit, Laktose (hauptsächliches Kohlenhydrat der Milch) als Energiequelle zu nutzen und unter nahezu anaeroben Bedingungen (wie in der Milchdrüse vorherrschend) zu überleben. Im Gegensatz dazu können andere Gram-negative Bakterien, wie *Serratia spp.* und *Pseudomonas spp.*, keine Laktose fermentieren<sup>16</sup>.

Mit der Bestimmung der In-vitro-Wachstumsgeschwindigkeit von Mastitiserregern im Milchsekret kann die Etablierung einer intramammären Infektion bei der Kuh simuliert werden<sup>22</sup>. Es wurden in der Vergangenheit einige In-vitro-Studien über die Wachstumseigenschaften verschiedener euterpathogener Bakterien im Milchsekret durchgeführt und die Ergebnisse mit dem Wachstumsverhalten der Erreger im Euter verglichen. Die Autoren bewerten das Bakterienwachstum in der Milch während der frühen Phase der intramammären Infektion als einen wichtigen Faktor für den Verlauf der Erkrankung<sup>23-25</sup>. *In vitro* zeigte sich, dass die CFU/ml von *E. coli* in steril gewonnenen Vollmilchproben nach 6-stündiger Inkubation zwischen einzelnen Kühen um den Faktor 100 variierte. Ebenso ergaben sich Unterschiede zwischen verschiedenen Milchpräparationen. So war die Bakterienzahl nach einer 6-stündigen Inkubation in Milchserum signifikant höher als in Vollmilch oder zellreduzierter Magermilch<sup>26</sup>.

Kornalijnsliiper et al. (2003)<sup>26</sup> haben sowohl *in vivo* als auch *in vitro* das Wachstumsverhalten von *E. coli* in der Entstehungsphase einer Mastitis

untersucht. Ziel war es, den Einfluss des Bakterienwachstums auf den Schweregrad der Euterentzündung zu ermitteln. Dafür wurden Versuchstiere experimentell mit *E. coli* infiziert. Unmittelbar vor der Inokulation wurden Milchproben für die Zellanalyse und für die Bestimmung der Wachstumsgeschwindigkeit des Erregers im Milchsekret gewonnen. Das Wachstum *in vitro* korrelierte weder mit der Vermehrung der Bakterien im Euter nach der experimentellen intramammären Infektion noch mit dem Schweregrad der klinischen Symptome der *E. coli*-Mastitis. *In vivo* vermehrten sich die Erreger abhängig von der initialen SCC in der Milch. So bewirkte eine hohe Zellzahl im Milchsekret zu Beginn der experimentellen Mastitis eine verlangsamte Zunahme der Bakterienzahl. Der Schweregrad der experimentellen *E. coli*-Mastitis ist zum einen von der Vermehrungsgeschwindigkeit der Bakterien (positive Korrelation) in der frühen Phase der Infektion und zum anderen vom Influx der Entzündungszellen in das Milchsekret (negative Korrelation) abhängig<sup>21</sup>. Ob eine *E. coli*-Mastitis mild oder schwerwiegend verläuft, hängt stark von der individuellen Effizienz der Abwehrmechanismen des Wirtes ab. Der massive Influx von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) aus dem Blut in das Milchsekret und die effiziente Abtötung von Bakterien durch PMN bewirken eine Elimination der Erreger nach einer intramammären Infektion<sup>27</sup>.

In der Vergangenheit wurde bereits der Einfluss einer Vorbehandlung des Euters auf das Erregerwachstum untersucht. Hierzu wurden Kühe intramammär mit Lipopolysaccharid (LPS) von *E. coli* vorbehandelt. Verglichen wurde die Keimvermehrung in der Vollmilch und in der Magermilch vor und 18h nach LPS-Infusion. In der Vollmilch der vorbehandelten Euterviertel kam es hierbei zu einer Hemmung der Bakterienvermehrung *in vitro*. In diesem Modell wurde gleichzeitig gezeigt, dass die antibakterielle Kapazität der Magermilch von vorbehandelten Eutervierteln geringer ist als die der jeweiligen Vollmilchpräparation<sup>28</sup>.

## 2.2 Immunologische Abwehrmechanismen in der bovinen Milchdrüse

Neben den anatomischen Barrieren (äußere Haut, Strichkanal mit Keratinbildung) verfügt die Milchdrüse der Kuh über verschiedene Abwehrmechanismen gegen Pathogene. Hierbei spielen vor allem zelluläre und humorale Mechanismen des angeborenen Immunsystems eine entscheidende Rolle<sup>29</sup>.

### 2.2.1 Zelluläre Abwehrmechanismen

Die Milch klinisch gesunder Kühe hat einen Zellgehalt (SCC; engl.: somatic cell count) von 20.000 bis 100.000 somatischen Zellen/ml. Das Spektrum der Zellen umfasst Lymphozyten, polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN), Makrophagen und abgeschilferte Epithelzellen in variablen Anteilen. Die Angaben aus der Literatur gehen hier sehr stark auseinander. Während PMN im Sekret der entzündeten Milchdrüse dominieren, stellen Lymphozyten den überwiegenden Anteil an Zellen im Sekret der gesunden Milchdrüse dar. Granulozyten und Makrophagen sind die phagozytierenden Zellen der Milch. Makrophagen können Erreger erkennen und das Einwandern der PMN aus dem Blut in die Milch initiieren. Die eingewanderten Granulozyten sind für die Erregerelimination zuständig und gelten als Haupteffektorzellen im Rahmen einer Euterentzündung<sup>30</sup>. Neben den Immunzellen im Milchsekret spielen auch die gewebsständigen Entzündungszellen im Euter eine Rolle bei der Infektabwehr. Den Hauptanteil bilden die T-Lymphozyten, daneben sind einige Makrophagen und B-Lymphozyten im Gewebe zu finden. Des Weiteren lassen sich immunhistologisch wenige dendritische Zellen und Natürliche Killerzellen nach Verdauung des Gewebes nachweisen<sup>31-33</sup>.

#### *Polymorphkernige Neutrophile Granulozyten (PMN)*

Die PMN als Effektoren der angeborenen Immunität spielen im Bezug auf die Erregerelimination eine bedeutende Rolle bei der Mastitis des Rindes<sup>34</sup>. Sie entwickeln sich unter dem Einfluss von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren aus myeloischen Stammzellen des Knochenmarks und werden in die Blutbahn freigesetzt<sup>35</sup>. Beim erwachsenen Rind beträgt der Anteil der zirkulierenden PMN ca. 25-45% der 5.000-10.000 Gesamtleukozyten/ $\mu$ l im Blut<sup>36</sup>. Bovine neutrophile Granulozyten haben einen Durchmesser von 10-12 $\mu$ m<sup>37</sup>. Die Lebensdauer der PMN wird bei Mensch und Ratte mit 2-3 Tagen angegeben<sup>35</sup>. Kennzeichnend für PMN sind die zytoplasmatischen Granula, welche sich nicht anfärben lassen. Im Zytoplasma befinden sich neben Glykogenspeichern zahlreiche Granula mit antibakteriellen Inhaltsstoffen. Die azurophilen primären Granula enthalten ein H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Myeloperoxidase-System, wodurch die Halogenisierung essentieller Bakterienbestandteile möglich ist. Darüber hinaus können sie im Rahmen des „oxidative burst“ hochreaktive Sauerstoffradikale bilden. Des Weiteren enthalten

sie Lysozym, ein wichtiges bakterizides Enzym. PMN verfügen auch über sekundäre Granula, welche Laktoferrin und Gelatinasen als antibakterielle Substanzen enthalten. Eine Besonderheit bei Kühen, Schafen und Ziegen sind die großen Peroxidase-negativen Granula. Bei gereiften PMN dieser Spezies bilden sie den Hauptanteil der Granula. Sie enthalten die Mehrheit der antibakteriell aktiven Proteine wie Laktoferrin, Bactenectin, Proteasen und  $\beta$ -Defensine<sup>29,34,38</sup>.

Die neutrophilen Granulozyten haben verschiedene Funktionen, die sie zur Erregerbekämpfung im Euter befähigen. Für eine effiziente Bekämpfung eingedrungener Pathogene im Euter ist der rasche Influx von PMN in das Milchsekret entscheidend. Dieser bestimmt zusammen mit der Geschwindigkeit der Bakterienvermehrung in der Milch den Schweregrad der Mastitis<sup>21</sup>. Während der akuten Phase einer Mastitis liegt der Anteil der PMN an den Milchzellen bei 90%<sup>39-40</sup>. Die zirkulierenden PMN in den kleinen Blutgefäßen müssen im ständigen Kontakt mit dem Gefäßendothel stehen, damit sie Entzündungen im umliegenden Gewebe erkennen können. Dieser Vorgang wird als „Margination“ bezeichnet. Auf biochemischer Ebene sind hierfür Selektine (Adhäsionsmoleküle) verantwortlich. So besitzen die PMN das L-Selektin auf ihrer Oberfläche, über welches sie den initialen Kontakt zum Endothel herstellen und in der Folge abgebremst werden. E- und P-Selektine werden unter dem Einfluss von Entzündungsmediatoren (wie z.B. CXCL8/IL-8, TNF- $\alpha$  oder C5a) von den Endothelzellen exprimiert. Dies führt dazu, dass die marginierten PMN am Endothel anhaften und zwischen den Endothelzellen und durch die Basalmembran das Blutgefäß verlassen. Dieser Vorgang wird als „Diapedese“ bezeichnet. Nachdem die neutrophilen Granulozyten das Blutgefäß verlassen haben, wandern diese gezielt zum Ort der Entzündung. Ein Konzentrationsgradient chemoattraktiver Faktoren dient hierbei als Wegweiser<sup>29</sup>. Stimulatoren für die Granulozytenwanderung sind u.a. pathogene Bestandteile von Bakterien (z.B. LPS), Chemokine (z.B. CXCL8) oder die Spaltprodukte des Komplementsystems C3a und C5a<sup>41-42</sup>.

Während der Migration und unter dem Einfluss der Entzündungsmediatoren kommt es zur Aktivierung von Granulozyten. Sie erlangen die Fähigkeit zur Phagozytose. Sobald die PMN über Rezeptoren Kontakt mit dem Pathogen hergestellt haben, wird dieses durch „Umfließen“ in das Zellinnere aufgenommen. Dort befindet es sich in einer Membran-umgebenen Vakuole, dem sog.

Phagosom. Dieses fusioniert mit dem Lysosom zum Phagolysosom<sup>38</sup>. Nach der erfolgten Phagozytose wird im Rahmen des "oxidative burst" die Freisetzung von Sauerstoffradikalen ausgelöst, welche zusammen mit den antibakteriell wirksamen Enzymen und Proteinen der degranulierten Granula zum Abtöten der Bakterien führt. Bei der Phagozytose wird die nicht-opsonisierte Form, bei der allgemeine Molekülstrukturen der Bakterienwand erkannt werden, von der opsonisierten Form unterschieden. Hier werden lösliche Faktoren des Immunsystems wie z.B. Immunglobuline und Komplementkomponenten, die an die Bakterien gebunden sind, von den phagozytierenden Zellen erkannt<sup>29</sup>.

Beim Rind exprimieren PMN in der Milch auf ihrer Oberfläche den LPS-Rezeptor CD14, welcher gewöhnlich nur von Makrophagen/Monozyten exprimiert wird<sup>43</sup>. Die meisten bovinen Blut-PMN haben zunächst keine membranständigen CD14-Rezeptoren, erst durch die Migration werden die zuvor in cytoplasmatischen Granula gespeicherten Rezeptoren an der Oberfläche präsentiert<sup>44</sup>. CD14 ist insbesondere bei der Opsonin-unabhängigen Phagozytose Gram-negativer Erreger ein wichtiger Bindungsfaktor von PMN in der Milch<sup>29</sup>.

Die in die Milch migrierten Granulozyten haben eine geringere Phagozytosekapazität und reduzierte antibakterielle Eigenschaften im Vergleich zu den im Blut zirkulierenden Zellen<sup>45-46</sup>. Als Ursache für die herabgesetzte Effizienz der Milch-PMN wird die vorherige Aufnahme von MilCHFettkügelchen und Kasein-Mizellen angenommen, die die verbleibende Phagozytosekapazität der PMN einschränkt<sup>47-48</sup>.

### ***Makrophagen***

Makrophagen entwickeln sich aus myeloischen Stammzellen des Knochenmarks, ihre Vorstufen zirkulieren im Blut als Monozyten. Die Ausdifferenzierung zu Makrophagen erfolgt bei der Migration ins Gewebe<sup>49</sup>. Sie stellen sich lichtmikroskopisch als zytoplasmareiche, stark granulierte Zellen dar und zeigen elektronenmikroskopisch die Ausbildung von Pseudopodien dar. Mit einem Durchmesser von ca. 20µm sind Makrophagen deutlich größer als Granulozyten oder Lymphozyten<sup>50</sup>.

Makrophagen besitzen als bedeutsame Struktur auf ihrer Zellmembran sog. MHC-Klasse-II-Moleküle, deren Expression vom Aktivierungszustand der Zelle abhängt. MHC-Klasse-II-Moleküle dienen der Präsentation von Antigenen und

der Interaktion mit T-Helfer-Zellen. Daneben präsentieren die Makrophagen MHC-Klasse-I-Moleküle wie auch Komplementenrezeptoren, Rezeptoren für Antikörper (Fc-Rezeptoren) und Rezeptoren für Adhäsionsmoleküle (z.B. CD18)<sup>51-52</sup>. Des Weiteren besitzen Makrophagen auf ihrer Zelloberfläche bestimmte Moleküle zur Erkennung häufig auftretender bakterieller Bestandteile. Zu diesen zählen CD14, Mannose-Rezeptoren, Scavenger-Rezeptoren und Toll-like-Rezeptoren<sup>51-54</sup>. Die Bindung der Pathogen-Bestandteile an Toll-like-Rezeptoren führt zur Synthese und Freisetzung proinflammatorischer Zytokine (siehe auch 2.3.2).

Makrophagen gehören wie die Granulozyten zu den phagozytierenden Zellen<sup>55</sup>. Sie vermögen ebenso wie PMN Pathogene ins Zellinnere aufzunehmen, wo sie durch bakterizide Enzyme, toxische Sauerstoffspezies, antimikrobielle Peptide und Kompetitoren unschädlich gemacht werden<sup>56-57</sup>. In gleicher Weise wie die PMN können sie nicht-opsonisierte Pathogene phagozytieren, jedoch ist die Phagozytose opsonisierter Pathogene effizienter.

Makrophagen bilden während des „respiratory burst“ toxische Sauerstoffmetaboliten<sup>58-59</sup>, aber in geringerem Umfang als PMN<sup>60</sup>. Darüber hinaus können sie große Mengen an toxischem Stickstoffoxid (NO) bilden, welches schnell weiter in reaktive Stickstoffverbindungen umgesetzt wird. Verantwortlich für die NO-Bildung ist die induzierbare Stickstoffoxid-Synthetase (iNOS). Sie wurde auch beim Rind nachgewiesen<sup>61-63</sup>. Eine zytotoxische oder zumindest eine zytostatische Wirkung der reaktiven Stickstoffverbindungen gegen verschiedene Stadien von Bakterien, Viren, Pilzen, Parasiten und gegen entartete Zellen wurde bei verschiedenen Spezies nachgewiesen<sup>64</sup>.

Makrophagen wirken vor allem gegenüber großen extrazellulären Pathogenen durch Freisetzung zytotoxischer Substanzen<sup>57</sup>. Der Kontakt mit Bakterien führt zur Bildung von verschiedenen, vor allem proinflammatorischen Zytokinen wie z.B. TNF- $\alpha$ , das Makrophagen-inflammatorische Protein (MIP), IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12 und Transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ). Diese sind für die Eigenstimulation, das Anlocken weiterer Leukozyten, die Aktivierung bestimmter Immunzellen wie auch für die Entstehung von Fieber verantwortlich. So werden PMN durch Zytokine stimulierter Makrophagen (z.B. IL-8, syn. CXCL8) zum Ort der Entzündung gelockt. Dies wurde bereits für bovine Makrophagen gezeigt<sup>57,65-</sup>

### ***Milchdrüsenepithelzelle (MEC)***

Die Milchdrüsenepithelzelle ist grundsätzlich für die Synthese der Milch zuständig. Darüber hinaus ist sie ein wichtiger Sensor und Effektor bei der Bekämpfung von Mastitiden. Jedoch sind die genauen Mechanismen hierfür noch nicht vollständig aufgeklärt. Klassischerweise gelten gewebsständige Makrophagen nach stattgefundenem Pathogen-Kontakt als Initiatoren der PMN-Rekrutierung. Mehrere Studien deuten darauf hin, dass Epithelzellen auf bakteriellen Kontakt hin ebenfalls eine Immunantwort in Gang setzen können und somit eine bedeutende Rolle bei der Infektabwehr spielen. So ist z.B. bekannt, dass respiratorische und intestinale Epithelzellen fähig sind, nach Pathogenkontakt PMN anzulocken<sup>67-68</sup>. Es gibt zahlreiche Hinweise darauf, dass die Milchdrüsenepithelzelle bakterielle Infektionen erkennen kann und entsprechende Signale für eine Immunantwort aussendet<sup>69</sup>.

Der Einsatz von In-vitro-Zellmodellen ermöglichte es, die Immunreaktion der pbMEC (primäre bovine Epithelzelle) zu prüfen. In diesen Modellen wurden die pbMEC oder aus ihr generierte permanente Zelllinien mit pathogenen Bestandteilen von hitzeinaktivierten oder auch lebenden Bakterien stimuliert. Anschließend wurde die Expression von Entzündungsmediatoren und Effektormolekülen gemessen (siehe auch 2.4.2). Nach der In-vitro-Stimulation der pbMEC mit *S. aureus* konnte eine gesteigerte Expression der proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und CXCL8 auf mRNA-Ebene festgestellt werden<sup>69</sup>. Interessanterweise stimulierten unterschiedliche *S. aureus*-Stämme unterschiedlich stark. Eine Stimulation der pbMEC mit *E. coli* bewirkte ebenfalls eine gesteigerte Expression von IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und CXCL8. In den Zellkulturüberständen der stimulierten pbMEC konnten darüber hinaus proinflammatorische Zytokine auf Proteinebene mittels ELISA nachgewiesen werden: Als Reaktion auf die Stimulation mit *S. aureus* konnte nach einer 3-stündigen Inkubation eine 2-fach erhöhte Konzentration an TNF- $\alpha$  ermittelt werden, welche anschließend wieder auf das Niveau nichtstimulierter Zellen absank. Die Sekretion von TNF- $\alpha$  in der Kokultur mit *E. coli* trat erst zu einem späteren Zeitpunkt (10-24h) auf und stieg im Vergleich zu naiven pbMEC auf das 3-fache an. Sowohl nach der Stimulation mit *S. aureus* als auch mit *E. coli* erfolgte die Ausschüttung des Chemokins CXCL8. Die durch *S. aureus* induzierte Sekretion erreichte die höchsten Werte nach 3h. Die Stimulation mit *E. coli* führte

erst nach 24h zu einer maximalen Sekretion von CXCL8<sup>69</sup>. Diese deutlichen Unterschiede in der Reaktion auf eine Stimulation mit *E. coli* und *S. aureus* lassen unterschiedliche Aktivierungspfade der angeborenen Immunantwort in der pbMEC vermuten.

Diese Erkenntnisse aus Entzündungsmodellen mit lebenden Bakterien werden in zahlreichen In-vitro-Studien mit PAMPs (engl.: pathogen-associated molecular patterns) bestätigt. Von Bedeutung sind hier das Lipopolysaccharid (LPS) von *E. coli* und die Lipoteichonsäure (LTA) von Staphylokokken. So konnte nach einer zeit- und dosisabhängigen Stimulation der pbMEC mit LPS eine gesteigerte Abgabe von CXCL8 an das Kulturmedium gezeigt werden<sup>8</sup>. Okada et al. (1999)<sup>70</sup> demonstrierten eine zeitabhängige Sekretion von IL-1 und IL-6 nach Stimulation der pbMEC mit unterschiedlichen LPS-Konzentrationen. Aus PCR-Analysen ist bekannt, dass die pbMEC vermittelt durch die genannten Zytokine mRNA für IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und GM-CSF bildet<sup>71</sup>.

Laktoferrin, ein bakteriostatisch wirkendes Protein, wird von der MEC auch *in vitro* basal sezerniert<sup>72</sup>. Wellnitz und Kerr (2004)<sup>8</sup> konnten eine konzentrationsabhängig gesteigerte Produktion von Laktoferrin nach LPS-Stimulation feststellen. Des Weiteren führt ein Kontakt der pbMEC mit LPS zu einer gesteigerten Expression von  $\beta$ -Defensin, einem bakteriziden Peptid<sup>7,73</sup>.

Serum Amyloid A (SAA) ist ein Akute-Phase-Protein, das primär in der Leber gebildet wird. Mit seiner proinflammatorischen und immunregulierenden Funktion ist es Bestandteil der Abwehr im Euter<sup>74</sup>. In-vitro-Stimulationsversuche mit LPS weisen darauf hin, dass die pbMEC SAA synthetisiert. So scheint die pbMEC Hauptbildungsort des SAA bei der Mastitis in der bovinen Milch zu sein<sup>8</sup>.

Insbesondere wegen der Sekretion chemotaktischer Zytokine, wie CXCL8, nach der Aktivierung der pbMEC mit LPS kann den Milchdrüsenepithelzellen eine Funktion als Initiator der Immunantwort durch die Rekrutierung von PMN zugeschrieben werden.

## 2.2.2 Humorale Abwehrmechanismen

### *Komplementsystem*

Das Komplementsystem ist wichtiger Bestandteil der unspezifischen Abwehr. Es besteht aus im Plasma enthaltenen Proteasen und zellulären Rezeptoren. Das

Komplementsystem ist für die Opsonisierung von infektiösen Erregern und anderen Fremdstoffen verantwortlich. Damit werden die Bindung an Phagozyten, die Aktivierung von Entzündungszellen, die Chemotaxis sowie die Zellyse verbessert. Die Aktivierung des Komplementsystems erfolgt auf klassische Weise oder auf dem alternativen Weg<sup>38,43</sup>. In der Milch spielt vor allem die alternative Aktivierung durch direkten Kontakt der Komplementkomponenten mit dem Erreger eine entscheidende Rolle. Für die klassische Aktivierung fehlt hier die Komplementkomponente C1q<sup>75-76</sup>. C5a stellt den biologisch aktivsten Komplementfaktor in der Milch dar. Es ist an der Entstehung einer Immunantwort beteiligt und kann als chemotaktisches Fragment die Migration von PMN durch das Milchdrüsenepithel *in vivo* und *in vitro* auslösen<sup>77-78</sup>. Es ist erregersabhängig, ob es zu einem Anstieg an C5a in der Milch kommt und damit auch zum Influx von PMN. So bewirkte eine intramammäre Infektion mit *E. coli* einen Anstieg an C5a in der Milch, wohingegen eine Infektion mit *S. aureus* keine Zunahme an C5a und damit auch keinen Influx der PMN bewirkte<sup>78-79</sup>. In der Milch ist neben C5a die Komplementkomponente C3b ein wichtiger Opsonisierungsfaktor. Werden Mikroorganismen mit einer großen Menge solcher Komplementkomponenten opsonisiert, so wird die Phagozytose durch PMN stark gefördert<sup>80-81</sup>.

### **Laktoferrin**

Laktoferrin (LF) ist ein eisenbindendes Protein, welches aufgrund seiner funktionellen Kompetenzen der angeborenen Immunität zugeordnet werden kann. Seine eisenbindende Eigenschaft stellt die Basis für die bakteriostatische Wirkung dar und gibt einen Schutz vor Sauerstoffradikalen durch die Bindung von freiem Eisen<sup>82</sup>. Das in der Milch enthaltene LF wird hauptsächlich von der MEC gebildet. Geringe oder keine Expression von LF erfolgt in den Alveolen, wohingegen die Epithelzellen der Milchgänge und der Zitzenzisterne größere Mengen bilden können. Im Vergleich zur humanen Milch enthält bovine Milch sehr geringe Mengen an LF. Die höchsten Konzentrationen werden in der Trockenstehzeit gemessen. PMN sind die Quelle für 5% des in der Milch enthaltenen LF bei einer akuten Mastitis. Sie enthalten Laktoferrin in ihren sekundären Granula und in den bei Rind, Schaf und Ziege vorkommenden Peroxidase-negativen Granula<sup>83-84</sup>. Bakterien, die einen hohen Eisenanspruch haben, sind für die bakteriostatische Wirkung des LF empfindlich. Unter den

Mastitiserregern ist *E. coli* am empfindlichsten, gefolgt von *S. aureus*: Streptokokken sind resistent gegenüber einer LF-Wirkung<sup>85</sup>. Des Weiteren wirkt LF über ein N-Terminales Fragment, das als Lactoferricin bezeichnet wird, zusätzlich bakteriostatisch. Dessen halb polarer und halb nicht-polarer Charakter ist mit dem von kationischen Peptiden vergleichbar und kann Zellmembranen von Bakterien zerstören<sup>86</sup>. Es besteht die Hypothese, dass während der akuten Phase der Mastitis, bioaktive Fragmente des LF proteolytisch abgespalten und so trotz eines hohen Eisengehalts in der Milch eine bakteriostatische Wirkung gegenüber *E. coli* besteht<sup>87</sup>. Humanes LF ist in der Lage, das Lipid A von LPS zu binden und dieses so zu neutralisieren. Somit kann das LPS über die Bindung an LBP (Lipopolysaccharid-Binding-Protein), sCD14 (soluble CD14) und mCD14 (membranständiges CD14) keine Immunreaktion auslösen<sup>82</sup>. Es wurde gezeigt, dass bovines LF auch in der Lage ist, eine LPS-induzierte Immunantwort der Entzündungszellen zu reduzieren<sup>88</sup>. Jedoch ist dieser Effekt für die *E. coli*-Mastitis noch nicht bestätigt worden.

### ***Lysozym***

Lysozym ist ein bakterizides Enzym, das die Peptidoglykane der Zellwand von Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien zerstört. Da es in der Milch des Rindes im Vergleich zur Milch der Frau in wesentlich geringeren Konzentrationen vorkommt, wird dem Lysozym keine besondere Bedeutung bei der Mastitisabwehr des Rindes zugesprochen<sup>89</sup>. Als verantwortlich für die Lysozym-Synthese in der bovinen Milchdrüse werden derzeit vor allem einwandernde Entzündungszellen diskutiert<sup>90</sup>.

### ***Laktoperoxidase***

Die Laktoperoxidase kann in Anwesenheit von Thiocyanaten und Wasserstoffperoxid die meisten Mastitiserreger hemmen oder töten<sup>91</sup>. Jedoch ist diese Wirkung aufgrund der geringen Sauerstoffspannung im Euter beschränkt.

### ***Xanthinoxidase***

Xanthinoxidase ist ein Enzym der Membran von Milchfettkügelchen. Es katalysiert die Bildung von Nitritoxiden aus anorganischem Nitrit zu stark wirksamen bakteriostatischen Substanzen<sup>92</sup>.

### ***Beta-Defensine***

Defensine sind bakterizide und fungizide Peptide, die reich an Cystein und Arginin sind<sup>93-94</sup>. Sie werden in die drei Untergruppen der  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\theta$ -Defensine eingeteilt. Die  $\beta$ -Defensine sind bakterizide Moleküle mit kationischem, amphiphilen Charakter, der es ihnen ermöglicht, die äußere Membran von Bakterien zu zerstören. Dieser sauerstoffunabhängige Mechanismus spielt vor allem bei der Erregerabwehr im Euter eine entscheidende Rolle, da dort eine niedrige Sauerstoffspannung herrscht. Ihre Synthese erfolgt in Epithelzellen und neutrophilen Granulozyten<sup>95-96</sup>. Einige  $\beta$ -Defensine werden permanent exprimiert<sup>97</sup>, während die Expression anderer durch eingewanderte Pathogene induziert wird<sup>98-100</sup>. Bei humanen tracheobronchialen Epithelzellen konnte eine gesteigerte Expression der mRNA für  $\beta$ -Defensin-2 nach LPS-Stimulation gezeigt werden<sup>101</sup>. Während einer Mastitis steigt die Konzentration an  $\beta$ -Defensin-5 (BNBD5) im Eutergewebe bis auf das 10-fache an. Hauptquelle für dessen Synthese ist die MEC<sup>102</sup>. In In-vitro-Stimulationsversuchen der pbMEC mit LPS konnte eine erhöhte Expression von  $\beta$ -Defensinen auf mRNA gezeigt werden<sup>7</sup>.

### ***Zytokine und Chemokine***

Zytokine sind zellregulatorische Botenstoffe. Meist sind es Glykoproteine mit einem Molekulargewicht von unter 60 Kilodalton (kD) (meist unter 25 kD). Sie werden lokal produziert, haben nur eine sehr kurze Halbwertszeit (Sekunden bis Minuten) und sind in pikomolaren Konzentrationen wirksam. Je nach ihrem Synthesort werden z.T. Synonyme wie z.B. Monokine (Makrophagen/Monozyten) oder Lymphokine (Lymphozyten) verwendet. Als Interleukine bezeichnet man Zytokine, die Zell-Zell-Interaktionen regulieren. Zytokine können parakrin (d.h. in der Nähe des Produktionsortes) wirken oder die produzierende Zelle ist gleichzeitig Zielzelle (autokrin). Durch Interaktion mit hochspezifischen Rezeptoren induzieren sie zellspezifische und allgemeine Effekte wie die Freisetzung von weiteren Mediatoren, die Expression von Differenzierungsmolekülen und die Regulation bestimmter Zelloberflächenmoleküle. Zytokine haben vielfältige Wirkungen: So können sie entzündungsfördernd oder entzündungshemmend, hämatopoese-fördernd, immunregulatorisch, antiinfektiös oder antiproliferativ sein. Einzelne Zytokine haben meist mehrere Wirkungen (Pleiotropie), was ihren therapeutischen Nutzen erschwert. Chemokine sind eine gesonderte Gruppe von Zytokinen: Sie sind als

chemoattraktive Zytokine an der Anlockung von Entzündungszellen (z.B. PMN) in das entzündete Gewebe beteiligt<sup>38</sup>.

Zytokine spielen aufgrund ihrer immunmodulatorischen Eigenschaften (zusammengefasst in Tabelle 1) eine große Rolle bei der Mastitisabwehr<sup>103</sup>. Es konnte gezeigt werden, dass eine reduzierte Konzentration von IL-2 im Kolostrum, welches zwei Wochen vor Kalbung gewonnen wurde, mit einer erhöhten Anfälligkeit für Mastitiden aufgrund einer herabgesetzten Immunkompetenz korreliert<sup>89</sup>. Bei experimentellen Mastitiden mit *E. coli* und *S. aureus* konnte eine gesteigerte Menge an IFN- $\gamma$ , IL-1 und IL-12 in der Milch festgestellt werden. Des Weiteren führte eine Infektion mit *E. coli* zur vermehrten Bildung von CXCL8 und TNF- $\alpha$ <sup>104</sup>.

Da die MEC im Fokus der vorliegenden Arbeit steht, gilt es an dieser Stelle, ihre immunmodulatorische Wirkung durch Zytokine zu betrachten. Auf Kontakt mit pathogenen Bestandteilen von Erregern (wie z.B. LPS) sezerniert sie u.a. CXCL8 und IL-1 $\beta$ , welche für die Rekrutierung von PMN verantwortlich sind, sowie TNF- $\alpha$ , welches die Expression von Adhäsionsmolekülen an den Gefäßendothelien steigert und somit die Migration der PMN erleichtert<sup>7,105-106</sup>. Deshalb ist naheliegend, dass die MEC als Sensor für pathogene Strukturen fungiert und mit der Produktion von proinflammatorischen Zytokinen reagieren kann, wodurch eine Immunantwort initiiert wird.

**Tabelle 1: Zytokine und ihre Wirkung im Euter (modifiziert nach Sordillo und Streicher<sup>89</sup>)**

Zytokine	Quelle	Funktion
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Makrophagen und MEC	Vermittelt Akute-Phase-Immunantwort, Rekrutierung von PMN, verstärkt Phagozytose und bakterizide Wirkung der PMN
<b>IL-2</b>	CD4+-T-Lymphozyten	Steigert die Proliferation monoklonaler Zellen, Zunahme von Plasmazellen, verbessert zytotoxische und bakterizide Wirkung von Lymphozyten, aktiviert natürliche Killerzellen
<b>CXCL8</b>	Makrophagen, Monozyten, T-Lymphozyten, MEC und Endothelzellen	Rekrutierung von PMN in die Milchdrüse
<b>G-CSF</b>	Makrophagen, T-Lymphozyten	Steigerung der Anzahl von Blut- und Milch-PMN, Steigerung der SCC, fördert Phagozytose und bakterizide Wirkung der Neutrophilen, reduziert die PMN-Migration
<b>GM-CSF</b>	Makrophagen, T-Lymphozyten	Steigerung der Anzahl an Phagozyten, steigert chemotaktische und bakterizide Wirkung von PMN, steigert cytotoxische Aktivität
<b>M-CSF</b>	Makrophagen	Regulation und Differenzierung der Makrophagen, chemoattraktiv für Makrophagen
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	CD4+-T-Lymphozyten, CD8+-T-Lymphozyten und NK-Zellen	Steigert die phagozytotische und bakterizide Leistung der PMN, wirkt immunsuppressiven Effekten in der Milchdrüse entgegen
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Makrophagen, PMN und MEC	Vermittelt Akute-Phase-Immunantwort, steigert Phagozytose und bakterizide Wirkung der PMN, fördert die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen

IL = Interleukin, G-CSF = Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor, GM-CSF = Granulozyten/Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor, M-CSF = Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor, IFN- $\gamma$  = Interferon- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  = Tumor Nekrose Faktor  $\alpha$ , SCC = somatische Zellzahl.

### ***Antikörper (AK)***

Die Bindung von AK an Bakterien mit oder ohne Beteiligung von Komplementkomponente (C3b) ist für die Opsonisierung von Pathogenen notwendig<sup>81,107</sup>. Die opsonisierenden AK im Serum und in der Milch gehören zu den IgG<sub>2</sub>- und IgM-Isotypen<sup>108</sup>. Einige Autoren beschreiben IgM als ein wichtiges Opsonin für PMN<sup>109-112</sup>. Jedoch benötigen IgM-AK zusätzlich Komplementkomponenten, um eine effektive Opsonisierung zu ermöglichen<sup>113</sup>. Es ist nicht geklärt, wie wichtig die komplementenvermittelte Opsonisierung ist, da in der Milch die Konzentration der Komplement-Komponenten gering ist<sup>80-81,87,114-115</sup> und zudem IgM nicht den Hauptanteil der AK in der Milch ausmachen<sup>116-117</sup>. Im Gegensatz zu den IgM-AK benötigen AK des IgG<sub>2</sub>-Isotyps kein Komplement für die Opsonisierung<sup>109,118-120</sup>. Somit ist IgG<sub>2</sub> das bedeutendste Opsonin für PMN bei einer Infektion der Milchdrüse<sup>111,118,120-122</sup>. Von Bedeutung ist hier, dass PMN aufgrund der Migration in das Euter Fc-Rezeptoren für IgG<sub>2</sub> aufregulieren, aber keine Expression von Fc-Rezeptoren für IgA und IgG<sub>1</sub> aufweisen und sie die Rezeptoren für IgM während der Migration verlieren<sup>123</sup>.

### ***Lösliches CD14 (sCD14, soluble CD14)***

CD14 ist ein Rezeptor für LPS und wird vor allem auf Monozyten, Makrophagen und Granulozyten exprimiert<sup>43</sup>. Durch Proteasen wird er als lösliches CD14 (sCD14) freigesetzt. In der Milch und im Kolostrum kommt sCD14 in großen Mengen vor<sup>124-125</sup>. Bovine Makrophagen sind potente Quellen für sCD14<sup>44,126</sup>. sCD14 beschleunigt die Neutralisation von freiem LPS und Lipoproteinen, welche durch Teilung und Absterben von Bakterien freigesetzt werden<sup>127</sup>. Bereits geringe Mengen von sCD14 können nach intramammärer Inokulation an LPS binden und dadurch eine rasche Immigration von PMN in die Milch begünstigen<sup>128</sup>. An LPS gebundenes sCD14 kann die akute Entzündungsreaktion der MEC verstärken. Infolgedessen kommt es zur Rekrutierung der PMN in die Milch. Auf diese Weise kann sCD14 eine schnelle Elimination Gram-negativer Erreger begünstigen und verhindert somit schwerwiegende Störungen des Allgemeinbefindens. Aufgrund seiner protektiven Effekte wäre ein therapeutischer Einsatz von sCD14 denkbar<sup>29</sup>.

## 2.3 Aktivierung und Toleranz des angeborenen Immunsystems nach LPS-Erkennung

PAMPs (engl.: pathogen associated molecular patterns), zu denen unter anderem auch das Lipopolysaccharid (LPS) zählt, sind phylogenetisch hochkonservierte molekulare Struktur motive auf mikrobiellen Erregern, welche durch Erregererkennungsrezeptoren (PRRs; engl.: pattern recognition receptors) erkannt werden. Insbesondere die Toll-like-Rezeptoren (TLRs) spielen eine zentrale Rolle bei der Erkennung von bakteriellen Bestandteilen wie dem LPS.

### 2.3.1 Lipopolysaccharid

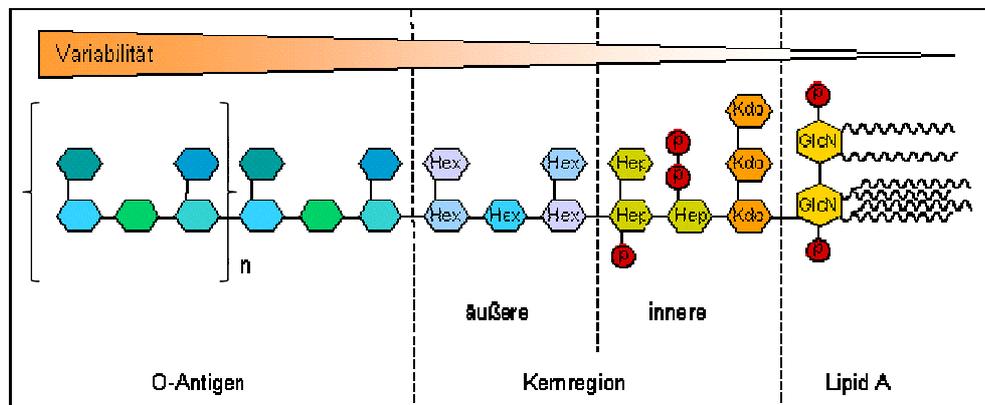
LPS (syn. Endotoxin) ist eine hitzestabile Komponente der Zellwand, welche mit gleicher Grundstruktur bei allen Gram-negativen Bakterien zu finden ist (siehe auch Abbildung 1). Dieser entwicklungsgeschichtlich hoch-konservierte Zellwandbestandteil besteht aus drei Komponenten: dem O-Antigen, einem Kernpolysaccharid und dem Lipid A<sup>129</sup>.

Das amphiphile Lipid A ist für die toxische Eigenschaft des Moleküls verantwortlich. Es ist der kovalent gebundene Lipidanteil des Endotoxins und verankert dieses in der Bakterienmembran. Die Kopfgruppe ist hydrophil und besteht aus zwei  $\beta$ 1-6-glykosidisch gebundenen N-Acetyl-Glucosamin-Molekülen, welche zusätzlich zwei Phosphorylgruppen an verschiedenen Positionen (1' oder 4') tragen. Der hydrophobe Teil des Lipid A besteht aus 4 Hydroxyfettsäureresten. An Position 6' ist das Lipid A immer über eine 2-Keto-3-desoxyoctansäure (KDO) mit dem Polysaccharidanteil (Kernpolysaccharid) des Endotoxins verbunden<sup>130-131</sup>.

Das Lipid A ist vor allem für die Interaktion zwischen LPS und dem Lipopolysaccharid-Binding-Protein (LBP) sowie für die Aktivierung des Komplementsystems verantwortlich<sup>132</sup>. Den extrazellulären Anteil von LPS bildet das O-Antigen. Hierbei handelt es sich um ein Polymer aus sich wiederholenden Oligosacchariden, gegen das häufig Antikörper gebildet werden. Fehlt das Antigen, so bezeichnet man das LPS als „rough-LPS“ (R-LPS). Ist es vorhanden, spricht man von „smooth-LPS“ (S-LPS). Das Kernpolysaccharid schließt sich proximal dem O-Antigen an und ist als konservierter Teil bei vielen Gram-negativen Bakterien gleich<sup>131</sup>. Es besteht aus einem inneren und einem

äußeren Anteil. Im Inneren der Kernpolysaccharidregion findet sich das KDO, welches  $\alpha$ -glykosidisch an Lipid A gebunden ist<sup>130</sup>. Fehlt es, sind die Bakterien nicht mehr lebensfähig<sup>131</sup>. Auch der Polysaccharidanteil spielt für die Endotoxizität von LPS eine Rolle: So besitzt Lipid A, welches an zwei KTO-Moleküle gebunden ist, eine höhere biologische Aktivität als isoliertes Lipid A. Ursächlich hierfür ist eine Konformationsänderung aufgrund der gebundenen Zucker<sup>133-135</sup>. Generell wird die biologische Aktivität des LPS durch die Anwesenheit von Substituenten beeinflusst und hängt somit von der räumlichen Struktur ab<sup>136</sup>.

Bei der *E. coli*-Mastitis des Rindes gilt LPS als Schlüsselmolekül für die Pathogenese<sup>137</sup>. Es wird bei der Vermehrung, dem Absterben und der Lyse der Bakterien freigesetzt und bewirkt lokale (gesteigerte Gefäßpermeabilität, Influx von Entzündungszellen) sowie systemische (Fieber, Leukopenie, Endotoxinschock) Reaktionen<sup>3</sup>. Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass nach der LPS-Infusion in die Milchdrüse die SCC, die elektrische Leitfähigkeit sowie die Konzentration an Natrium- und Chloridionen in der Milch anstieg<sup>138</sup>.



**Abbildung 1: Schematische Darstellung der Struktur von LPS (modifiziert nach Alexander und Rietschel (2001))<sup>139</sup>**

GlcN = Glucosamin; Kdo = 2-Keto-3-desoxyoctansäure; Hex = Hexose;  
 Hep = Heptose; P = Phosphatgruppe

### 2.3.2 Toll-like-Rezeptor 4 (TLR-4)

Zum ersten Mal wurden Toll-Rezeptoren bei der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* nachgewiesen<sup>140</sup>. Diese Rezeptoren sind für die Erkennung von Pathogenen verantwortlich und aktivieren das angeborene Immunsystem. Rezeptoren, die in Struktur und Gensequenz den Toll-Rezeptoren ähnlich sind, wurden beim Mensch und bei der Maus identifiziert. Sie werden als Toll-like-Rezeptoren (TLRs) bezeichnet. Mittlerweile wurden mindestens 13 verschiedene TLRs identifiziert<sup>141</sup>.

TLRs sind Transmembranrezeptoren mit einer extrazellulären Leucin-reichen Struktur, einer transmembranen Struktur und einem intrazellulären Anteil, der dem IL-1-Rezeptor ähnlich ist und als TIR (Toll/Interleukin-1-Rezeptor) bezeichnet wird<sup>140</sup>. Sie befinden sich überwiegend auf der Zelloberfläche, mit Ausnahme der endosomal gelegenen TLRs (TLR-7,-8,-9)<sup>142-143</sup>. Nach der

Bindung der Liganden (PAMPs) kommt es zur Aktivierung einer intrazellulären Signalkaskade. Dies führt zur Freisetzung von Entzündungsmediatoren und zur Modulation von Oberflächenmolekülen<sup>144</sup>.

LPS wird über TLR-4 erkannt und löst eine intrazelluläre Signalkaskade aus. Neben einer direkten Aktivierung kann es auch als Komplex mit LBP und CD14 an TLR-4 binden<sup>145-146</sup>. CD14 ist ein Glykosyl-Phosphatidylinositol-verankertes Membranprotein (mCD14), welches auch als lösliche Form (sCD14) in Blut und Milch vorkommt<sup>147</sup> (siehe auch 2.2.2).

Zunächst bindet LPS an CD14. Als Komplex mit LBP (CD14-LPS-LBP-Komplex) wird die Bindung am Rezeptor beschleunigt. LBP ist ein von den Hepatozyten gebildetes Akute-Phase-Protein. Seine Expression kann durch die proinflammatorischen Zytokine IL-1 und IL-6 verstärkt werden<sup>148-149</sup>. Es vermittelt die Monomerisierung der LPS-Aggregate und katalysiert den Transfer dieser Monomere an den CD14-Rezeptor. Somit wird der stabile CD14-LPS-LBP-Komplex geformt, welcher anschließend dem TLR-4-MD (engl.: myeloid differentiation protein )-2-Komplex präsentiert wird<sup>150</sup>.

Die Bindung des CD14-LPS-LBP-Komplexes an den TLR-4-MD-2-Komplex bewirkt die Rekrutierung des Adapterproteins myeloider Differenzierungsfaktor 88 (MyD88) zum intrazellulären Teil des TLR-4. Seit kurzem ist bekannt, dass MyD88 an das TIR-Domain-Containing-Adapterprotein (TIRAP) bindet, welches auch als MyD88 adapter-like Protein (MAL) bekannt ist. Dieses interagiert direkt mit der TIR-Domäne des TLR-4<sup>151</sup>. Bei Abwesenheit von MyD88 ermöglicht TIRAP den NF- $\kappa$ B-Signalweg auf einem MyD88 unabhängigen Weg<sup>152-153</sup>. MyD88 besitzt zusätzlich als weitere Domäne die Death Domain (DD). Über diese kann MyD88 mit anderen DD-enthaltenden Signalmolekülen, darunter auch mit der IL-1-Rezeptor assoziierten Kinase (IRAK-4), interagieren<sup>154</sup>. Die Aktivierung von MyD88 begünstigt die Phosphorylierung von IRAK-1, welche durch IRAK-4 katalysiert wird. Im phosphorylierten Zustand interagiert IRAK-1 mit dem TNF- $\alpha$  Rezeptor assoziierten Faktor-6 (TRAF-6) und initiiert damit die Aktivierung einer Kinase-Kaskade, mitunter auch der I $\kappa$ B-Kinase (IKK)<sup>155-158</sup>. Über diese Kaskade wird der NF- $\kappa$ B Inhibitor (I $\kappa$ B) phosphoryliert und abgebaut. Somit ist es für NF- $\kappa$ B möglich, in den Zellkern zu gelangen und dort die Transkription proinflammatorischer Gene zu initiieren.

Die Aktivierung von NF- $\kappa$ B ist nicht nur über den TIRAP- und MyD88-vermittelten Weg möglich. So kann nach LPS-Stimulation des TLR-4 auch das TIR-Containing Adapter Molekül-2 (TICAM-2), welches auch als TIR domain-containing adaptor-inducing IFN- $\beta$  related adapter Molekül (TRAM) bezeichnet wird, zur intrazellulären Domäne des Rezeptors rekrutiert werden<sup>159-161</sup>. Nach der Rekrutierung durch TICAM-2 induziert TICAM-1 (auch bekannt als TIR-domain-containing adaptor-inducing IFN- $\beta$ ; TRIF) über TRAF-6 und/oder RIP-1 die NF- $\kappa$ B-Aktivierung<sup>162-163</sup>. Die gewebeschädigende, durch LPS ausgelöste Immunantwort wird zum großen Teil durch die Aktivierung von NF- $\kappa$ B verursacht<sup>164-167</sup>.

Neben der NF- $\kappa$ B-Aktivierung werden Aktivierungskaskaden über das TLR-4-Signal in Gang gesetzt, die zum aktivierten Protein-1, zur mitogen-aktivierten Protein Kinase (MAPK) und zu p38 führen. Alle beschriebenen Signalkaskaden führen zur Zellaktivierung und zur Bildung von proinflammatorischen Zytokinen (TNF- $\alpha$ , IL-1, CXCL8, IL-6, IL-12), Sauerstoffradikalen, Stickoxid (NO), Gewebefaktoren sowie den antiinflammatorischen Zytokinen, wie IL-10 und TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor- $\beta$ ). LPS verursachte biologische Effekte werden primär durch TNF- $\alpha$  und IL-6 vermittelt, die für den septischen Schock verantwortlich sind<sup>168-169</sup>. Auch CXCL8, das chemoattraktiv auf PMN wirkt, sowie weitere Granulozyten-aktivierende Zytokine sind für Effekte im Wirt verantwortlich<sup>170</sup>.

Über den TLR-4 werden auch Signale vermittelt, die zum Zelltod führen. Innerhalb der Signalkaskade sind hier unter anderem MyD88, TIRAP, IRAK-1, TICAM-1, TICAM-2 und TRAF-6 beteiligt<sup>171-174</sup>.

LPS wird nicht nur durch einen einzelnen Rezeptor erkannt, sondern durch das Zusammenwirken vieler Rezeptoren, die sich auf sogenannten Lipid-Rafts befinden<sup>175</sup>. Dabei handelt es sich um periphere Ansammlungen von Lipiden, welche bei der Rekrutierung von Signalmolekülen eine Rolle spielen<sup>176</sup>. Auf humanen Monozyten befinden sich unter anderem die Signalmoleküle CD14, hsp70 und hsp90 als feste Einrichtungen der Lipidrafts<sup>175-176</sup>. Andere Signalmoleküle (TLR-4, CXCR4, MyD88) werden erst durch den LPS-Kontakt rekrutiert<sup>175,177-178</sup>. Durch dieses Zusammenspiel werden die einzelnen Rezeptormoleküle zusammengeführt, wodurch die Interaktion der Signalmoleküle begünstigt wird<sup>179</sup>.

Die Expression der TLRs an der Zelloberfläche unterliegt einer gesteuerten Regulation. So konnte im Zusammenhang mit der bovinen Mastitis in Feldstudien und Tiermodellen eine gesteigerte Expression der mRNA von TLR-2 und TLR-4 gezeigt werden<sup>102,180</sup>. Die Induzierbarkeit der bovinen TLR wurde auch *in vitro* für die Milchdrüsenepithelzelle gezeigt<sup>181-182</sup>.

Bei humanen Monozyten kommt der TLR-4 sowohl auf der Zellmembran als auch im Golgiapparat vor und pendelt zwischen diesen Orten<sup>177</sup>. Als möglicher Mechanismus wird angenommen, dass der TLR-4-Pool im Golgiapparat als Steady-state-Pool fungiert und die Oberflächenexpression der Rezeptoren über deren Migration von und zur Zellmembran reguliert wird<sup>129</sup>.

### 2.3.3 Endotoxintoleranz

Die Endotoxintoleranz beschreibt ein Phänomen, bei dem Zellen oder Patienten auf die wiederholte Gabe von LPS (syn. Endotoxin) in geringerem Maße reagieren als bei der ersten Applikation. Die Endotoxintoleranz wird auch als „LPS-Reprogrammierung“ oder „Discordant Adaption“ bezeichnet. Nicht nur das Endotoxin von Gram-negativen Bakterien kann einen Toleranzeffekt auslösen, sondern auch andere PAMPs wie Peptidoglykan<sup>183</sup>, Lipoarabinomannan<sup>184</sup> oder Lipoteichonsäuren<sup>185</sup>. Die Endotoxintoleranz kann bei üblicherweise letalen LPS-Dosen schützend wirken, Infektionen vorbeugen und ischämische Gewebeschädigung verhindern<sup>4</sup>. Der Begriff „Cross-Tolerance“ beschreibt ein Phänomen, bei dem sich der Toleranzeffekt auch gegenüber unterschiedlichen TLR-Liganden einstellt. Bei Monozyten von Sepsis-Patienten, die mit dem synthetischen TLR-2 Agonist Pam3CysSK4 stimuliert wurden, konnte gegenüber diesem eine Toleranz festgestellt werden<sup>186</sup>.

Bereits 1947 wurde dieser Effekt an Kaninchen beschrieben, die bei wiederholter Injektion des thyphoiden Endotoxins mit einer verminderten Fieberreaktion reagierten<sup>187</sup>. Später wurde gezeigt, dass mit dem Plasma von Endotoxin-toleranten Kaninchen die Toleranz an andere Tiere weitergegeben werden konnte<sup>188</sup>.

Der erste Kontakt mit LPS wird als „priming“, „preexposure“ oder als „pretreatment“ im Sinne einer Vorbehandlung bezeichnet. Der darauffolgende Kontakt wird „activation“, „stimulation“ oder „rechallenge“ genannt. Mit diesen

Begriffen werden Systeme beschrieben, bei denen zwei zeitlich getrennte Expositionen mit Pathogenen oder deren Bestandteilen erfolgen.

Bei In-vitro-Untersuchungen an Makrophagen wurde gezeigt, dass eine Vorbehandlung mit LPS in niedriger Dosis nach wiederholter Stimulation zu einer verminderten TNF- $\alpha$ -Sekretion führt. Dies wird von vielen Autoren als Charakteristikum einer Endotoxintoleranz angesehen<sup>189-191</sup>. Der *in vitro* festgestellte Toleranzeffekt bei Makrophagen ist mit einer veränderten Expression vieler Entzündungsmediatoren verbunden (siehe Tabelle 2).

**Tabelle 2: Reaktionsweise von Makrophagen nach wiederholter LPS-Stimulation (modifiziert nach West und Heagy<sup>192</sup>)**

Mediator	1. Stimulation	2. Stimulation	Referenzen
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	erhöht	vermindert	193-197
<b>IL-1</b>	erhöht	erhöht	198-200
		vermindert	
<b>IL-6</b>	erhöht	erhöht	201
<b>Nitrat/Nitrit</b>	erhöht	stärker erhöht	198
<b>PGE<sub>2</sub></b>	erhöht	stärker erhöht	197,202
<b>TXB<sub>2</sub></b>	erhöht	vermindert	198,200,203
<b>CXCL8</b>	erhöht	stärker erhöht	204-205
		vermindert	206-207

TNF- $\alpha$  = Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$ ; IL = Interleukin; PGE<sub>2</sub> = Prostaglandin E<sub>2</sub>; TXB<sub>2</sub> = Thromboxan B<sub>2</sub>.

Learn et al. (2000)<sup>208</sup> beschreiben eine verminderte Cyclooxygenase-2 (COX-2)-Aktivität und eine verstärkte Bildung des löslichen IL-1-Rezeptorantagonisten in endotoxintoleranten Zellen. Bei LPS-geprägten humanen Blutmonozyten wurde eine Herabregulation des MHCII-Komplexes und von CD86 an der Zelloberfläche gefunden<sup>209</sup>.

Der exakte Mechanismus der Endotoxintoleranz ist derzeit noch ungeklärt. Es

handelt sich nicht um eine globale Herunterregulation der Aktivität, sondern eine komplex regulierte Antwort auf die wiederholte Stimulation mit LPS<sup>203,210-211</sup>.

### ***Desensibilisierende Faktoren***

Deaktivierende oder immunsuppressive Faktoren im Blut begünstigen die Hyporeaktivität zirkulierender Leukozyten<sup>212</sup>. Prins et al. (1995)<sup>213</sup> zeigten, dass Sera von Sepsis-Patienten die TNF-Produktion bei aktivierten Monozyten von gesunden Spendern herunterregulieren können. Interessanterweise wurde dieser immunsuppressive Effekt reduziert, wenn das Plasma gefiltert wurde und mit anti-IL-10-Antikörpern inkubiert wurde<sup>214</sup>. Im Plasma von Patienten mit septischem Schock wurde IL-10 als ein bedeutender Deaktivator eines überschießenden proinflammatorischen Geschehens identifiziert<sup>215</sup>. Die Endotoxintoleranz bei septischen Patienten lässt sich jedoch nicht alleine über eine IL-10-vermittelte Wirkung erklären. Ein Hinweis hierfür sind IL-10-Knock-Out-Mäuse, bei denen erfolgreich eine Toleranz induziert werden konnte<sup>216</sup>.

In Tiermodellen zur Sepsis wurde gezeigt, dass TGF- $\beta$  die Immunantwort von Splenozyten herunterreguliert<sup>217</sup>. Als Quelle für TGF- $\beta$  werden Monozyten und absterbende T-Zellen angesehen<sup>218</sup>.

Es gibt Hinweise für die Interaktion von Komponenten des Nervensystems mit dem Immunsystem. Einige Neurotransmitter fungieren als Immunsuppressoren. Katecholamine, die unter Stresssituationen in höheren Konzentrationen vorkommen, unterdrücken die Aktivität der Entzündungszellen, hemmen die TNF-Produktion und begünstigen die Freisetzung von IL-10<sup>219</sup>. Ebenso induziert das Alpha-Melanozyten-stimulierende Hormon die IL-10-Produktion bei humanen Monozyten<sup>220</sup>. Die Endotoxin-abhängige proinflammatorische Zytokinsekretion wird direkt vom Vasoaktiven-Intestinalen-Peptid (VIP) und dem Hypophysären-Adenylatcyclase-aktivierenden-Peptid unterdrückt<sup>221</sup>. Beim Systemischen-Inflammatorischen-Response-Syndrom (SIRS) kommt es zur Aktivierung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse, wodurch Glukokortikoide freigesetzt werden<sup>222</sup>. Hierdurch kann gegenregulatorisch die Sekretion von Zytokinen begrenzt werden. Ähnliches wird für Prostaglandine (PGE<sub>2</sub>)<sup>223</sup> und Hitze-Schock-Proteine (hsp70)<sup>224</sup> postuliert.

Ubiquitin ist ein Protein, das sowohl intra- als auch extrazellulär vorkommt. Es dient der Modifikation bereits translatierter Proteine und ist beim Protein-Abbau

und der Signaltransduktion beteiligt. Im Serum von Sepsis-Patienten wurden um 5-7-fach erhöhte Werte an freiem Ubiquitin gemessen. Es konnte gezeigt werden, dass Ubiquitin die Sekretion von TNF- $\alpha$  bei Blutmonozyten nach LPS-Stimulation hemmt<sup>225</sup>.

### ***Endotoxinneutralisierende Faktoren***

Plasma von SIRS-Patienten besitzt eine hohe Konzentration an sCD14 und LBP. Sie können die LPS-induzierte TNF-Produktion aufgrund der schnellen Neutralisation von LPS hemmen<sup>4</sup>. Ebenso können Plasma-Lipoproteine das LPS neutralisieren<sup>226</sup>. Die Bindung von LPS an Plasma-Lipoproteine läuft im Serum endotoxintoleranter Patienten beschleunigt ab<sup>227</sup>.

### ***NF- $\kappa$ B-Inhibition***

NF- $\kappa$ B ist entscheidend für die Expression von Zytokinen, die bei der Induktion einer Entzündung beteiligt sind. Die Aktivierung und Regulation von NF- $\kappa$ B wird über eine Gruppe von Hemmproteinen (I $\kappa$ B) reguliert. Die Zusammensetzung der Untereinheiten von NF- $\kappa$ B ist bei endotoxintoleranten Zellen verändert. Blackwell et al. (1997)<sup>228</sup> haben anhand der Bestimmung von Zytokinen in Alveolarmakrophagen die Endotoxintoleranz untersucht. Sie stellten fest, dass diese mit einer reduzierten Aktivierung von NF- $\kappa$ B und dem reduzierten Verbrauch seiner beiden Untereinheiten (p50p50/p50p65) verbunden war. Somit sehen sie die Ursache der Toleranz in einer geringeren Menge von NF- $\kappa$ B und der damit herabgesetzten Gentranskription.

In den Untersuchungen von Ziegler-Heitbrock et al. (1994)<sup>229</sup> wurde demonstriert, dass die Endotoxintoleranz mit einer Zunahme der inaktiven p50p50 Homodimere des NF- $\kappa$ B und einer Abnahme der aktiven p50p65 Heterodimere verbunden war.

In In-vitro-Versuchen, bei denen mononukleäre Blutzellen von überlebenden Sepsis-Patienten mit LPS stimuliert wurden, konnte eine niedrigere Expression der aktiven p50p65- und der inaktiven p50p50-Untereinheit festgestellt werden, bei nichtüberlebenden dagegen eine Dominanz der inaktiven p50p50-Untereinheit und ein niedriges p50p65 : p50p50 Verhältnis<sup>229-230</sup>. In der Gruppe der nichtüberlebenden Patienten wurde eine umgekehrte Korrelation von Plasma-IL-10 mit dem p50p65 : p50p50-Verhältnis nach LPS-Stimulation gefunden. Da der Inhibitor I $\kappa$ B $\alpha$  in Monozyten ebenfalls erniedrigt war, scheint er

nicht die Ursache für die herabgesetzte NF- $\kappa$ B-Aktivität zu sein<sup>231</sup>.

### ***Herunterregulation des TLR-assozierten Signalweges***

Einige Studien an humanen Leukozyten von Sepsis- oder SIRS-Patienten zeigen den Zusammenhang zwischen einer herabgesetzten Empfindlichkeit gegenüber LPS und einer Modifikation der TLR-4-Signalkaskade. In den vergangenen Jahren wurden zahlreiche intrazelluläre Moleküle entdeckt, die den LPS-aktivierten MyD88-abhängigen Signalweg negativ regulieren:

IRAK-M unterdrückt die Dissoziation der IRAK-1 und IRAK-2 von MyD88 und die Formation des IRAK-TNF Rezeptor assoziierten Faktors (TRAF) 6 Komplexes. Interessant ist, dass IRAK-M-defiziente Mäuse eine signifikant geringere Endotoxintoleranz entwickeln<sup>232</sup>. Monozyten von Sepsis-Patienten zeigten bei einer Ex-vivo-LPS-Stimulation eine schnellere IRAK-M-mRNA-Expression als Monozyten gesunder Menschen<sup>233</sup>.

Phosphatidylinositol-3-Kinase ist ein früher Inhibitor der TLR-Signalkaskade<sup>234</sup>. Learn et al. (2001)<sup>235</sup> berichten über eine reduzierte Produktion von IL-1 $\beta$  und eine selektive Steigerung von IL-1Ra (IL-1-Rezeptorantagonist) als Antwort auf eine LPS-Stimulation. Vermutlich ist dies mit einer Änderung der IRAK-abhängigen Signalkaskade und der Erhaltung eines effizienten Phosphatidylinositol-3-Kinase-Signalweges verbunden.

Eine Splice-Variante von MyD88, die als MyD88s (MyD88 short) bezeichnet wird, könnte eine Rolle bei der Endotoxintoleranz spielen. Ihre Bildung wird durch LPS-Stimulation induziert. MyD88s kann im Gegensatz zu MyD88 weniger effektiv IRAK phosphorylieren, wodurch der TLR-Signalweg gehemmt wird<sup>236</sup>. In Monozyten von Sepsis-Patienten ist die mRNA-Expression von MyD88s signifikant im Vergleich zu denen gesunder Menschen erhöht<sup>186</sup>.

Darüber hinaus gibt es noch andere Moleküle, die in die TLR-4-induzierte MyD88-abhängige Signalkaskade hemmend eingreifen (siehe Tabelle 3).

**Tabelle 3: Moleküle, die hemmend in den TLR-4-Signalweg eingreifen**

<b>Molekül</b>	<b>Wirkung</b>	<b>Referenzen</b>
<b>A20</b>	entfernt Ubiquitin-Teile vom Signalmolekül TRAF6	237
<b>ABIN-3</b>	verhindert die NF- $\kappa$ B-Aktivierung, in der Signalkaskade nach TRAF6, aber vor IKK	4
<b>Bcl-3</b>	induziert durch IL-10, inhibiert die NF- $\kappa$ B-Bindung an seine Promotorstelle	238
<b>Dok-1, Dok-2</b>	negative Regulatoren des Ras-Erk-Signalweges	239
<b>DUSP1</b>	kontrolliert p38 MAP-Kinase-Aktivierung	240
<b>Flightless I homolog</b>	interagiert mit MyD88, interferiert mit der Formation des TLR-4-MyD88-Komplexes	241
<b>FLN29</b>	enthält ein TRAF-6-bezogenes Zinkfinger-Motiv, das NF- $\kappa$ B und die mitogenaktivierte Proteinkinase-Aktivierung in der Signalkaskade nach TRAF6 unterdrückt	242
<b>Monarch-1</b>	assoziiert mit IRAK-1, Blockade der IRAK-1-Hyperphosphorylierung ist die Folge	243
<b>MKP-1</b>	kontrolliert p38 MAP-Kinase-Aktivierung	244
<b>RanGTPase</b>	reduziert NF- $\kappa$ B-Akkummulierung im Kern	245
<b>RP105</b>	hemmt die TLR-4/MD2-Aktivierung	246
<b>SIGIRR</b>	hemmt den Signalweg, der durch IL-1 oder TLR-Liganden aktiviert wird	247
<b>SHIP</b>	wird produziert als Antwort auf TGF $\beta$ , inhibiert über Hydrolyse der Phosphatidylinositol 3-Kinasen	248
<b>SOCS-1</b>	ist ein negativer Regulator des JAK-STAT-Signalweges	249
<b>ST2</b>	interagiert und inhibiert MyD88 und MAL/TIRAP	250
<b>Tollip (engl.: Toll interacting protein)</b>	tritt mit der zytoplasmatischen TIR-Domäne von IL-1R, TLR-2 und -4 in Verbindung und hemmt IRAK	251
<b>TRAF4</b>	interagiert mit und wirkt TRAF6- und TRIF-Molekülen entgegen	252
<b>Triad3A</b>	fördert die Ubiquitylation von TLR-4 und unterstützt den Abbau über die Proteosomen	253

Bei endotoxintoleranten Makrophagen von Mäusen wurde eine herabgesetzte Expression von TLR-4 an der Zelloberfläche beschrieben<sup>254-255</sup>. Dies wurde bereits eine Stunde nach LPS-Kontakt beobachtet und hielt über 24h an. Diese Zellen zeigten ebenso eine reduzierte Sekretion proinflammatorischer Zytokine<sup>254</sup>.

Der endotoxintolerante Zustand scheint zwischen wenigen Tagen bei Kindern mit *Haemophilus influenzae*-Meningitis<sup>256</sup> und mehreren Wochen bei peripheren

Blutmonozyten von Sepsis-Patienten anzuhalten<sup>257</sup>. Für die Aufhebung der Toleranz ist die Acyloxyacyl-Hydrolase (AOHA) verantwortlich, die LPS durch Abspaltung von sekundären Fettsäureresten vom Lipid A inaktiviert<sup>258</sup>.

Es bestehen seit einiger Zeit Überlegungen, die Endotoxintoleranz therapeutisch im Sinne einer Immunmodulation auszunutzen. Als Konsequenz einer Behandlung mittels TLR-Agonisten sollen inflammatorische Geschehen eingegrenzt und abgemildert werden<sup>259-261</sup>.

## **2.4 In-vitro-Modelle für die bovine Mastitis**

Durch die Entwicklung von In-vitro-Modellen sind Studien zur Erforschung der Immunmechanismen der Mastitis unter standardisierten Bedingungen möglich. So kann anhand von primären Zellkulturen oder permanenten Zelllinien z.B. die Beteiligung bestimmter Zellen besser studiert werden. Die Versuchsbedingungen sind zudem reproduzierbar. Hierdurch können zu einzelnen Fragestellungen aufwändige Tierversuche reduziert werden.

### **2.4.1 Permanente Zelllinien**

Permanente Zelllinien sind Zellen einer Gewebeart, die sich in Kultur unbegrenzt fortpflanzen können. Die meisten Zellen besitzen eine eingeschränkte Lebensdauer. Anders verhält es sich bei immortalisierten Zelllinien: Sie sind durch zufällige Mutation (z.B. in Tumorzellen) entstanden, werden direkt aus einem Tumor gewonnen oder entstehen durch gezielte Veränderung (Transfektion)<sup>262</sup>. Für die Milchdrüsenepithelzelle (MEC) der Kuh wurden bisher folgende permanente Zelllinien etabliert: MAC-T (Mammary Alveolar Cells-Large T antigen), BME-UV, L1 und H7<sup>263-265</sup>. Die MAC-T ist die am häufigsten verwendete permanente Zelllinie. Sie ist durch Transfektion mit der tsA Mutante des Simian Virus 40 Gens entstanden<sup>264</sup>. Die BME-UV wurde auf die gleiche Weise immortalisiert<sup>263</sup>.

Die auf Plastik gewachsene MAC-T hat wie andere Epithelzellen eine charakteristische Kopfsteinpflaster-Morphologie. Durch die Zell-Zell-Interaktion und unter Prolaktineinfluss differenziert sie aus und kann alle Milchproteine sezernieren<sup>264</sup>. Die MAC-T wächst schneller in Kultur als eine primäre bovine Milchdrüsenepithelzelle (pbMEC) und erreicht früher die Konfluenz. Die Verdopplungszeit der MAC-T liegt in den ersten 24h bei 8h, wohingegen die

pbMEC dafür 12h benötigt. Anschließend haben beide eine Verdopplungszeit von etwa 20h<sup>266</sup>. Bei der MAC-T Zelle kann selbst nach 350-facher Passage keine Alterung festgestellt werden<sup>264</sup>. Wie bei der pbMEC, konnte bei der MAC-T das Cytokeratin, ein hoch spezifischer Zellmarker von Epithelzellen, nachgewiesen werden<sup>7</sup>.

Der Einsatz von Zelllinien ist deutlich günstiger und weniger aufwändig als die Verwendung von pbMEC. Studien von Strandberg et al. (2005)<sup>7</sup> haben jedoch gezeigt, dass die Aussagekraft von Experimenten mit MAC-T beschränkt ist. Es wurde die Expression immunrelevanter Gene zwischen MAC-T und pbMEC nach Stimulation mit LPS verglichen: Bei beiden Zellen konnte eine gesteigerte Expression der mRNA für CXCL8, CXCL6 und TNF- $\alpha$  nachgewiesen werden, jedoch war diese bei der pbMEC um ein Vielfaches höher. Sehr deutliche Unterschiede zeigten sich bei der Expression von IL-1 $\beta$  und  $\beta$ -Defensinen: Die pbMEC reagierte auf die LPS-Stimulation mit einer 500-fach stärkeren Expression, wohingegen die MAC-T nur eine 4,26-fache (IL-1 $\beta$ ) bzw. 2,75-fache ( $\beta$ -Defensin) Steigerung der mRNA-Expression zeigte. Die LBP-Expression wurde nur geringgradig bei der pbMEC aufreguliert und fehlt bei der MAC-T ganz. Als Ursache für die Unterschiede werden die vielfache Passagierung der MAC-T und der Immortalisierungsprozess vermutet. Darüber hinaus hat die MAC-T einen höheren DNA-Gehalt, der auf die eingeschleuste Fremd-DNA zurückzuführen ist<sup>266</sup>.

Die Modulation immunologischer Prozesse bei der MAC-T wurde in früheren Studien zur Sekretion von Zytokinen (wie z.B. CXCL8 und TNF- $\alpha$ ) nach LPS-Stimulation bestätigt<sup>267-268</sup>.

#### **2.4.2 Primäre bovine Milchdrüsenepithelzelle**

Ebner et al. haben zum ersten Mal 1961 die Milchdrüsenepithelzelle *in vitro* kultiviert<sup>269</sup>. Seitdem wurde die pbMEC von zahlreichen Forschungsgruppen als Zellkultur<sup>266,270-271</sup> oder Organkultur<sup>272-273</sup> etabliert. Für die Gewinnung boviner Milchdrüsenepithelzellen sind bislang zwei unterschiedliche Methoden beschrieben worden. Eine Methode beruht auf der Gewinnung von somatischen Zellen aus der Milch, die anschließend in der Zellkulturschale angezüchtet werden. Die somatischen Zellen der Milch enthalten neben den Leukozyten auch abgeschilferte Epithelzellen. Durch die Kultivierung haften die Epithelzellen an

und vermehren sich, wohingegen sich die Leukozyten nicht weiter teilen können. Leukozyten und Debris werden durch den Medienwechsel entfernt<sup>274</sup>. Für die zweite Methode muss Gewebe aus dem Euter gewonnen werden. Dies ist durch Biopate am lebenden Tier möglich<sup>272,275-276</sup> oder durch Exzision des Gewebes unmittelbar nach der Schlachtung<sup>270,273,275,277-278</sup>. Die Gewinnung der pbMEC erfolgt anschließend durch enzymatische Verdauung aus dem Gewebe. Heutzutage werden, wie auch in der vorliegenden Arbeit, die pbMEC häufig mit der Methode nach Cifrian et al. (1994)<sup>266</sup> in modifizierter Weise gewonnen. Cifrian et al. (1994)<sup>266</sup> verdauten das Eutergewebe mit Kollagenase und kultivierten die Zellen anschließend unter verschiedenen Bedingungen. Ebenso haben sie die Funktion und die Morphologie der pbMEC in Kultur beschrieben: So bilden MEC auf einer Kollagen-, Laminin- und Fibronectinmatrix runde oder polygonale Zellen, die am Rand der Zellinseln eher eine gestreckte Form einnehmen. Auf dem unbeschichteten Kulturgefäß aus Polystyrol wachsen nur subkultivierte Zellen, die sich jedoch langsamer vermehren und flacher sind. Bei Kultivierung der gewonnenen Zellen oder Zellaggregate auf einer rekonstruierten Basalmembran aus der murinen Engelberth-Holm-Swarm (EHS) Sarkom-Zelllinie formieren sich die Zellen zu größeren dreidimensionalen Strukturen, welche den sekretorischen Alveoli der Milchdrüse gleichen. Die pbMEC synthetisiert  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kasein,  $\alpha$ -Laktalbumin,  $\beta$ -Laktoglobulin, Laktose und Laktoferrin<sup>266,279</sup>. Die produzierte Menge an Laktoferrin in der Kultur wird von der extrazellulären Matrix und dem Fetalen Kälberserum (FKS) reguliert: So sezernierten die Zellen die größten Mengen bei Kultivierung auf Kollagen mit FKS im Medium<sup>72</sup>. Dies zeigt, dass die Kulturbedingungen entscheidend für die Funktionalität der pbMEC sind. Die Identifizierung der Milchdrüsenepithelzellen gelang durch Färbung des Cytokeratins<sup>266,280</sup>. Cytokeratin ist Bestandteil des Zellskeletts und kommt nur bei Epithelzellen vor.

Die pbMEC bilden in Kultur ein typisches kopfsteinpflasterartiges Muster. Innerhalb von 3 Tagen entstehen Epithelinseln, die nach weiteren 4 Tagen eine dichte Zellmasse in einem konfluenten Monolayer repräsentieren<sup>7</sup>.

Die gewonnenen Zellen können mit Zusatz von Dimethylsulfoxid (DMSO) in flüssigem Stickstoff konserviert werden<sup>71,266</sup>. Wellnitz und Kerr (2004)<sup>8</sup> postulieren, dass die Zellen für eine bessere Vergleichbarkeit vor der Kultivierung eingefroren werden sollten. Bei der Aufarbeitung der Milchdrüse können pbMEC

nicht alleine gewonnen werden. Fibrozyten, Fettzellen und Myoepithelzellen sind kontaminierende Zellen. Okada et al. (1997)<sup>71</sup> separierten die pbMEC nach dem Auftauen mit Percoll<sup>®</sup> (Separationslösung) mittels Dichtegradientenzentrifugation und erhielten so hauptsächlich pbMEC. Kontaminierende Bindegewebszellen können auch im Zellkulturgefäß mittels Trypsin entfernt werden oder einzeln unter dem Mikroskop abgeschabt werden<sup>280</sup>.

Die pbMEC verlieren im Laufe der Kultivierung ihre zell-spezifischen Funktionen. So sind die pbMEC nach 40 Passagen nicht mehr in der Lage,  $\alpha$ -Kasein und Laktoferrin zu bilden<sup>281</sup>. Das Passagieren der pbMEC führt zum Verlust ihrer immunologischen Kapazität. Gunther et al. (2009)<sup>280</sup> zeigten, dass pbMEC bereits nach der dritten Passage und folgender Stimulation mit hitzeinaktivierten *E. coli* keine mRNA-Expression des Lingual Antimicrobial Peptide (LAP) mehr zeigen. Somit sind nur kurzzeitig kultivierte Zellen für immunologische In-vitro-Studien geeignet. Neben den einfachen Zellmodellen haben Smits et al. (1996)<sup>78</sup> ein komplexeres Zellkultursystem entwickelt, um die Funktion migrierter PMN zu untersuchen: Sie kultivierten die pbMEC auf Fibroblasten, die mit Kollagen beschichtet waren. Die Fibrozyten lagerten auf einer Porenmembran eines Einsatzes für einzelne Vertiefungen einer Kulturplatte. Hierdurch erhielt das System zwei Kompartimente. Somit konnte die Diapedese der PMN direkt *in vitro* untersucht werden. Dieses System hat Smits et al. (1999)<sup>282</sup> ebenfalls in vereinfachter Form (ohne Fibrozyten) verwendet, um die Funktion migrierter PMN zu untersuchen.

### 3 Geräte, Material und Methoden

#### 3.1 Geräte

##### 3.1.1 Geräte

Autoklav „D65“	(Systec, Wettenberg)
Automatisches Hämatologiegerät „Sysmex pocH-100iV Diff“	(Sysmex Corporation, Kobe, Japan)
Automatisches Kolonienzählgerät „flash&go“	(IUL Instruments, Königswinter)
Brutschrank „Incucell“	(MMM Medcenter, Planegg)
Bunsenbrenner mit automatischer Zündung	(Wartewig, Göttingen)
Eismaschine „ZBE 70-35“	(Ziegra, Isernhagen)
Fluoreszenz-Durchflusszytometer, Modell FACScan <sup>®</sup> , mit angeschlossener Computereinheit	(Becton Dickinson, Heidelberg)
Heißluftsterilisator „Typ ST5050“	(Heraeus, Hanau)
Heizblock „Thermostat 5320“	(Eppendorf, Hamburg)
Kühlschrank mit Gefrierfach (-20°C)	(Einzelhandel)
Kühlzentrifuge „Rotina 420 R“	(Hettich, Tuttlingen)
Laborwaage „SBC22“	(Scaltec Instruments, Heiligenstadt)
Mikroskop „Aristoplan“	(Leitz, Wetzlar)
Minishaker „MS 1“	(IKA, Staufen)
Multipette	(Eppendorf, Hamburg)
Orbitalschüttler „WiseShake <sup>®</sup> “ SHO-2D	(Wisd Laboratory Instruments, Wertheim)
Photometer „Spectra Classic“	(Tecan, Crailsheim)
Pipette, einstellbar „Transferpette <sup>®</sup> “ (2-20µl)	(Brand, Wertheim)
Pipetten, einstellbar (1-10µl, 10-100µl, 20-200µl, 100-1000µl, 1-5ml)	(Biohit, Köln)
Pipettierhilfe „accu-jet <sup>®</sup> “	(Brand, Wertheim)
Reinstwassersystem „GenPure“	(TKA, Niederelbert)
Rüttler für Mikrotiterplatten „MTS 4“	(IKA, Staufen)
Schüttler „Vortex Genius 3“	(IKA, Staufen)

Spiralplater „Eddy Jet“	(IUL Instruments, Königswinter)
Tischzentrifuge „Universal 32 R“	(Hettich, Tuttlingen)
Tischzentrifuge „Mikro 200“	(Hettich, Tuttlingen)

### 3.1.2 Geräte für die Zellkulturarbeit

CO <sub>2</sub> Brutschrank „Forma 3121“	(Thermo Electron, Dreieich)
Gefriertruhe -80°C „Forma ULT Freezer“	(Thermo Electron, Dreieich)
Heiztisch „HT 50“	(Minitüb, Tiefenbach)
Mikroskop „DM IL mit Kamera DFC 320, Software Imagic 500 und UV-Filter	(Leica Microsystems, Wetzlar)
Petrischale aus Glas	(Zefa Laborservice, Harthausen)
Pinzette	(Aesculap, Tuttlingen)
Rundsiebe aus rostfreiem Stahl	(Zefa Laborservice, Harthausen)
Schüssel	(Zefa Laborservice, Harthausen)
Sicherheitswerkbank „Biowizard 130 GL“	(Kojair, Vilppula, Finnland)
Siebturm, Siebe mit Maschenweite 95, 150, 300, und 500µm	(Retsch, Haan)
Skalpell	(Bayha, Tuttlingen)
Transmigrationskammer, 10-Well mit Polycarbonatmembran 25 x 80mm, Porengröße 3µm	(NeuroProbe, Gaithersburg, USA)
Trichter 150mm	(Zefa Laborservice, Harthausen)
Vakuumpumpe „KNF LAB Laboport N920“	(KNF Neuberger, Trenton, USA)
Wasserbad „WBU-45“	(Mettler, Schwabach)
Zellzählkammer „Bürker“	(Roth, Karlsruhe)

## 3.2 Material

### 3.2.1 Klinikbedarf

Kanülen 1,80 x 40mm, steril „TSK STERIJECT“	(TSK-Supra, Tochigi, Japan)
Serumröhrchen 10ml	(Sarstedt, Nümbrecht)
Vacutainerröhrchen, 10ml, Na-Heparin (170IU)	(Becton Dickinson, Heidelberg)

Vacutainer Brand Luer Adapter	(Becton Dickinson, Heidelberg)
<b>3.2.2 Laborbedarf</b>	
Becherglas, 250ml	(Roth, Karlsruhe)
Becherglas, 1000ml	(Zefa Laborservice, Harthausen)
Einmal-Küvetten 2,5ml makro PMMA	(Brand, Wertheim)
Einmal-Pasteurpipetten aus Pe-Ld.	(Merck, Darmstadt)
Eppendorf-Reaktionsgefäß, 0,5ml	(Sarstedt, Nümbrecht)
Eppendorf-Reaktionsgefäß, 1,5ml	(Greiner, Frickenhausen)
Erlenmeyer-CAP-Kappen	(Zefa Laborservice, Harthausen)
Drigalski-Glasspatel	(Roth, Karlsruhe)
Kryoboxen aus Karton	(Zefa Laborservice, Harthausen)
Kulturkolben in Erlenmeyerform, 250 ml	(Zefa Laborservice, Harthausen)
Cellstrainer, 100µm	(Becton Dickinson, Heidelberg)
Cryotubes 3,5ml	(Roth, Karlsruhe)
Labocap-Kappen rot und silber 15/16	(Zefa Laborservice, Harthausen)
Laborflaschen mit Gewinde, 250ml, 1000ml	(Roth, Karlsruhe)
Mikrobank-System Cryobank™	(Mast Diagnostika, Reinfeld)
Multipetteneinsatz	(Eppendorf, Hamburg)
Pasteurpipetten, 22,5mm aus Glas	(Brand, Wertheim)
Pipettenspitzen, weiß, gelb und blau	(Sarstedt, Nümbrecht)
Pipettenspitzen 200µl	(Brand, Wertheim)
Pipettenspitzen, 100µl-5000µl	(Biohit, Köln)
Reagenzgläser, starkwandig 16 x 160mm	(Zefa Laborservice, Harthausen)
Reaktionsgefäße, 2ml	(Zefa Laborservice, Harthausen)
Röhrchen, 15ml Polypropylen	(Greiner, Frickenhausen)
Röhrchen, 50ml Polypropylen	(Greiner, Frickenhausen)
Röhrchen für die Durchflusszytometrie, 5ml	(Becton Dickinson, Heidelberg)
Rundboden-Mikrotiterplatten mit Abdeckung; steril, 96-Well	(Gechno Plastic Products TPP®, Trasadingen/Schweiz)
Saugpipetten, 10ml	(Sarstedt, Nümbrecht)
DyNA Chill, portable cooler	(Cole-Parmer, Veron Hills, Illinois, USA)
Serologische Pipetten, 10ml, 25ml	(Roth, Karlsruhe)

---

Spatel	(Roth, Karlsruhe)
TruCount tubes, 5ml	(Becton Dickinson, Heidelberg)
Wägeschiffchen, einmal	(Zefa Laborservice, Harthausen)
Weithalsgewindeflaschen „Duran GLS 80“	(Roth, Karlsruhe)
Zellkulturschalen, 9cm Durchmesser	(Greiner, Frickenhausen)
Zellkulturplatten, 6-Well	(Greiner, Frickenhausen)

### 3.2.3 Reagenzien

Antibiotic-Antimycotic (APS), Antibiotikum und Antimykotikum	(Invitrogen, Karlsruhe)
Biocoll <sup>®</sup>	(Biochrom, Berlin)
Bovines Serum Albumin (BSA)	(Sigma-Aldrich, Steinheim)
Columbia Schafblut-Agar	(Oxoid, Wesel)
Dihydrorhodamin 123 (DHR 123)	(Sigma-Aldrich, Steinheim)
DMSO (Dimethylsulfoxid)	(Sigma-Aldrich, Steinheim)
Ethanol 70%	(Roth, Karlsruhe)
FACS Clean	(Becton Dickinson, Heidelberg)
FACS Flow	(Becton Dickinson, Heidelberg)
FACS Rinse	(Becton Dickinson, Heidelberg)
Fetales Kälberserum (FKS), F7524	(Sigma-Aldrich, Steinheim)
FITC markierter monoklonaler Anti-Cytokeratin AK , F3418	(Sigma-Aldrich, Steinheim)
Fluorescein Isocyanate (FITC), F7250	(Sigma-Aldrich, Steinheim)
HBSS (HANK Salt Solution)	(Biochrom, Berlin)
HEPES, 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin- ethansulfonsäure , Puffer	(Biochrom, Berlin)
Hirn-Herz-Bouillon, brain-heart-infusion-broth (BHI)	(Oxoid, Wesel)
Hydrocortison	(Sigma-Aldrich, Steinheim)
Insulin	(Sigma-Aldrich, Steinheim)
Interleukin-8, human, rekombinant	(CellConcept, Umkirch)
Kristallviolett-Galle-Lactose-Agar (VRB-Agar)	(Oxoid, Wesel)
Kollagenase NB <sup>®</sup>	(Serva, Heidelberg)
Kollagen R <sup>®</sup>	(Serva, Heidelberg)
L-Glutamin	(Biochrom, Berlin)
L-Methionin	(Sigma-Aldrich, Steinheim)
Luriant-Bertani (LB) Medium	(Sigma-Aldrich, Steinheim)
L-Lysin	(Sigma-Aldrich, Steinheim)
Lipopolysaccharid von <i>E. coli</i> , L2630	(Sigma-Aldrich , Steinheim)
Methanol, 99,8%ig	(Merck, Darmstadt)
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> ), 10%ig	(Sigma-Aldrich, Steinheim)

Natriumbicarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	(Biochrom, Berlin)
Natriumchlorid (NaCl)	(Sigma-Aldrich, Steinheim)
Pansorbin <sup>®</sup> cells, inaktivierte Staphylokokken	(Calbiochem-Novabiochem, Bad Soden)
Penicillin-G-Streptomycin (10.000IU/ml)	(Biochrom, Berlin)
Percoll <sup>®</sup>	(Biochrom, Berlin)
PMA, Phorbol-12-Myristat-13-Acetat	(Sigma-Aldrich, Steinheim)
Prolaktin	(Sigma-Aldrich, Steinheim)
Propidiumjodid (PI)	(Calbiochem, Bad Soden)
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)	(Biochrom, Berlin)
Dulbecco, ohne Ca <sup>++</sup> /Mg <sup>++</sup>	
Quantikine, CXCL8 ELISA	(R&D Systems, Minneapolis, USA)
RPMI 1640	(Biochrom, Berlin)
Salzsäure (HCl), 37%ig	(J.T. Baker, Deventer, Holland)
Sheath-fluid für Durchflusszytometrie	(Becton Dickinson, Heidelberg)
Sodium pyruvat solution, 100mM	(Biochrom, Berlin)
Streptomycin	(Biochrom, Berlin)
Sybr <sup>®</sup> 14, Component A Sperm Viability Kid	(Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA)
Trypton-Soja-Bouillon, trypticase-soy-broth (TSB)	(Sigma-Aldrich, Steinheim)
Trypsin/EDTA, 0,25%/0,02%	(Biochrom, Berlin)

### 3.2.4 Kulturmedien, Puffer und Lösungen

#### 3.2.4.1 Zellkulturmedien und Zusätze

Substanzen, die als Trockensubstanz zur Verfügung standen wurden gelöst und anschließend steril filtriert. Bereits gelöste Zusätze wurden portioniert. Die aliquotierten Zusätze wurden jeweils bei -20°C gelagert und bei Gebrauch bei 37°C im Wasserbad aufgetaut. Das fetale Kälberserum (FKS) wurde bei 56°C über eine Stunde im Wasserbad inkubiert, um eine Komplementenaktivität auszuschließen und eventuell vorhandene Mykoplasmen abzutöten. Das inaktivierte FKS wurde in 50ml Aliquots abgefüllt und ebenfalls bei -20°C gelagert.

***Medien für die Präparation der pbMEC****Waschmedium*

HBSS (HANK Salt Solution)	500ml
HEPES-Puffer	8,5ml
Antibiotic-Antimycotic (APS)	10ml (bei den Waschschritten)

*Verdauungslösung*

Kollagenase NB<sup>®</sup> (1g) wurde chargenabhängig in Waschmedium ohne APS gelöst und eine Stammlösung mit 20.000Units/ml hergestellt. Die Lagerung der Stammlösung erfolgte bei -20°C im Gefrierschrank. Zum Gebrauch war ein langsames Auftauen im Kühlschrank erforderlich, damit die Enzymaktivität nicht beeinträchtigt wurde. Für die Arbeitslösung wurde die Stammlösung 1:100 in Waschmedium ohne APS verdünnt.

*Gefriermedium*

FKS mit 10% DMSO final: Für die Präparation war eine doppelt-konzentrierte Lösung erforderlich, da die Zellen bereits in FKS aufgenommen wurden:

FKS	8ml
DMSO	2ml

***Medium für die pbMEC- und die MAC-T-Kultivierung****Wachstumsmedium*

RPMI 1640	450ml
L-Methionin	250µl (200mM)
L-Lysin	200µl (1M)
Natriumpyruvat	50µl (100mM)
Prolaktin	100µl (5mg/ml)
Hydrocortison	500µl (1mg/ml)
Insulin	100µl (5mg/ml)
L-Glutamin	5ml (200mM)

FKS	50ml (10% final)
Antibiotic-Antimycotic (APS)	5ml

Das Kulturmedium wurde nicht länger als 14 Tage im Kühlschrank aufbewahrt. Lediglich das APS musste immer frisch zugesetzt werden, da es nur für drei Tage im gelösten Zustand stabil war.

#### *Kollagen für die Kulturplattenbeschichtung*

Für die Beschichtung der Kulturplatten wurde mittels Kollagen R<sup>®</sup> und sterilem *Aqua dest.* eine 10%ige Lösung hergestellt.

#### *Trypsinlösung*

Zum Ablösen der Fibrozyten vom Boden der Kulturgefäße wurde aus Trypsin/EDTA und PBS eine 10%ige Lösung hergestellt.

Trypsin/EDTA (0,25%/0,02%)	1ml
PBS	9ml

Die 10%ige Trypsin/EDTA-Lösung wurde immer unmittelbar vor Gebrauch hergestellt.

Zum kompletten Ablösen der Zellen von der Kulturplatte wurde unverdünntes Trypsin/EDTA (0,25%/0,02%) verwendet.

#### *Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)*

Die PBS-Trockensubstanz wurde mit *Aqua dest.* gelöst. Die Bestandteile lagen in den folgenden Konzentrationen vor:

NaCl	8,0g
KCl	1,24g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,2g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2g
<i>Aqua dest. ad</i>	1000ml

Der Puffer hatte einen pH-Wert von 7,4. Die Lagerung erfolgte bei 4°C im Kühlschrank.

### 3.2.4.2 Lipopolysaccharidlösung (LPS) für die Stimulationsversuche

LPS-Trockensubstanz wurde in PBS zu einer Stammlösung (1000 $\mu$ g/ml) gelöst. Diese wurde in aliquoten Anteilen von 1ml bei -20°C konserviert. Für den Gebrauch wurde die Stammlösung in serumfreiem Kulturmedium entsprechend der im Versuch verwendeten Dosis verdünnt (siehe auch 4.2.1.3). Für das MAC-T-Entzündungsmodell waren vergleichsweise hohe LPS-Konzentrationen erforderlich. Hier musste das LPS (Trockensubstanz) in serumfreiem Kulturmedium gelöst werden, damit es zu keiner starken Ausdünnung des Wachstumsmediums kam.

### 3.2.4.3 Lösungen für die Bestimmung der chemoattraktiven Wirkung der Zellkulturüberstände (Transmigrationskammer)

#### *Percoll*<sup>®</sup>

Damit im unteren Well der Transmigrationskammer keine migrierten PMN an der Kammer haften blieben, wurden sowohl die Zellkulturüberstände als auch die Positiv- und Negativkontrollen mit unverdünntem Percoll<sup>®</sup> unterschichtet. Bei Percoll<sup>®</sup> handelt es sich um ein synthetisches Sol aus Polyvinyl-Pyrolidon-beschichteten Silikateilchen mit einem spezifischen Gewicht von 1,130g/ml. Gewöhnlich wird es zur Separation von Leukozyten verwendet.

#### *Rekombinantes, humanes Interleukin-8 (rhIL-8)*

Als Positivkontrolle für die In-vitro-Transmigration wurde rhIL-8 in ein Well jeder Bodenplatte der Transmigrationskammer pipettiert. CXCL8 (syn. IL-8) ist ein Chemokin, welches eine primär chemotaktische Wirkung für neutrophile Granulozyten hat. Rekombinantes, humanes, lyophilisiertes IL-8 wurde in sterilem PBS mit 1% BSA (Bovines Serum Albumin) auf eine Konzentration von 1 $\mu$ g/ml verdünnt und in aliquoten Teilen bei -20°C gelagert. Vor Gebrauch wurde die Lösung auf die gewünschte Endkonzentration von 0,1 $\mu$ g/ml mit Wachstumsmedium ohne FKS eingestellt.

### 3.2.4.4 Material für die Bestimmung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)

#### *Zellkulturmedium: R10F<sup>+</sup> als Kulturmedium für die PMN*

RPMI 1640 mit folgenden Zusätzen:

---

HEPES-Puffer	15mmol/l
L-Glutamin	2mmol/l
NaHCO <sub>3</sub>	18mmol/l
FKS	10%
Penicillin	10IU/ml
Streptomycin	100µg/ml

#### ***Phorbol-Myristat-Acetat (PMA)***

PMA greift ohne Beteiligung von Rezeptoren in die Enzymkaskade ein, die an der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies<sup>283</sup> beteiligt ist. Durch PMA wird die Proteinkinase C aktiviert und dadurch wird indirekt die NADPH-Oxidase aktiviert, welche für die ROS-Bildung wichtig ist. PMA ist somit ein Trigger für die ROS-Bildung. Die Stammlösung von 1mM/l PMA in DMSO wurde bei -100°C gelagert. Zum Gebrauch wurde diese in PBS auf eine Konzentration von 100µM/l verdünnt und in aliquoten Portionen bei -20° gelagert.

#### ***Dihydrorhodamin 123 (DHR)***

Das in die Zellen aufgenommene nicht fluoreszierende Dihydrorhodamin wird durch Peroxidasen in Anwesenheit von Sauerstoffmetaboliten (ROS) zum grünfluoreszierenden Rhodamin 123<sup>283</sup> umgesetzt. Dieser Farbstoff bindet an die Zellmembran und ist im Durchflusszytometer darstellbar. Die Fluoreszenzintensität ist somit ein Maß für die ROS-Bildung.

Eine Stammlösung aus der Trockensubstanz wurde in DMSO hergestellt (1,5mg/l) und in aliquoten Teilen bei -100°C gelagert. Für die Gebrauchslösung wurde die Stammlösung 1:100 verdünnt und bei -20°C gelagert.

### **3.2.4.5 Material für die Gewinnung von neutrophilen Granulozyten**

#### ***Biocoll<sup>®</sup>***

Die PMN wurden im Rahmen der Dichtegradientenzentrifugation mit unverdünntem Biocoll<sup>®</sup>, einer Separationslösung mit der Dichte von 1,077g/ml, von den Leukozyten getrennt.

***PBS, doppelt konzentriert***

Bei der Herstellung von doppelt konzentriertem PBS wurde die doppelte Menge an Trockensubstanz in *Aqua dest.* gelöst (siehe auch 3.2.4.1).

**3.2.4.6 Material für die Bestimmung der Phagozytosekapazität*****FITC-markierte Staphylokokken***

FITC-Puffer:

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	10,6g
NaCl	5,9g
<i>Aqua tridest. ad</i>	1.000ml
HCl (37%), zum Ansäuern ad	pH 9.2
FITC	9,4mg

Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

Damit die Kompetenz der PMN zur Partikel-Phagozytose im Durchflusszytometer erfasst werden konnte, mussten die Partikel (Bakterien) fluoreszenzmarkiert werden. Dafür wurden 3ml einer standardisierten Staphylokokkensuspension (Pansorbin<sup>®</sup>, siehe 3.2.3) mit 7ml FITC-Puffer (siehe oben, Endkonzentration 0,00066%) und 50µl 10%igem Natriumazid (Endkonzentration 0,05%) in lichtgeschützten Eppendorf-Reaktionsgefäßen für 20h bei Raumtemperatur (RT) durchmischt. Danach wurde die Suspension dreimal mit PBS gewaschen (14000 x g; 1min; RT) und auf eine Dichte von  $2 \times 10^8$  Bakterien/ml eingestellt.

Die Suspension wurde aliquotiert und bei -20°C gelagert.

***Serum zur Opsonisierung der FITC-markierten Staphylokokken***

Für die Bestimmung der Phagozytosekapazität in der vorliegenden Arbeit wurde wie folgt hergestelltes Poolserum verwendet: Aus dem Blut von drei klinisch gesunden Kühen wurde natives Serum gewonnen. Das steril gewonnene Blut wurde bei RT stehen gelassen, bis es deutlich koaguliert war. Mit einer Pasteurpipette wurde das Koagulat vom Blutröhrchen getrennt. Anschließend wurde das Gefäß zentrifugiert (2000 x g; 15min; RT). Daraufhin wurden die Überstände für eine weitere Zentrifugation (3500 x g; 10min; RT) gewonnen,

damit noch verbliebene Koagelreste entfernt werden konnten. Danach wurde das Serum aller drei Tiere gepoolt und in aliquoten Teilen bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Für den Gebrauch wurde es 1:10 mit PBS verdünnt.

#### **3.2.4.7 Lösungen für die Durchflusszytometrie**

Zur Reinigung des Gerätes wurde das Messkanalsystem nach den Messungen mit sterilfiltriertem *Aqua dest.*, FACS Clean<sup>®</sup> und FACS Rinse<sup>®</sup> gespült.

##### ***Trägerflüssigkeit***

Als Trägermedium für die Durchflusszytometrie wurde unverdünntes FACS Flow<sup>®</sup> verwendet.

#### **3.2.4.8 Material für den Vitalitätsnachweis von Zellen**

##### ***Propidiumjodid (PJ)***

PJ ist ein rotfluoreszierendes Fluorochrom, das nur bei Membrandefekten in das Zellinnere gelangt und mit der doppelsträngigen DNA interkaliert. Somit ist es ein Marker für die Integrität der Zelle. Dadurch kann die Vitalität der Zellen durchflusszytometrisch erfasst werden. Für die PJ-Gebrauchslösung wurden 11,11mg PJ-Trockensubstanz in 5555 $\mu\text{l}$  *Aqua dest.* gelöst. Diese hatte eine Molarität von 2,99mM PJ. Die Lagerung erfolgte in aliquoten Teilen bei  $4^{\circ}\text{C}$  im Kühlschrank unter Lichtausschluss.

##### ***Sybr<sup>®</sup> 14***

Sybr<sup>®</sup> 14 ist ein membranpermeabler fluoreszierender Nukleinfarbstoff aus dem kommerziell erhältlichen Live/Dead<sup>®</sup> Sperm Viability Kit. Sybr<sup>®</sup> 14 ist ein grüner Fluoreszenzfarbstoff, der an Nukleinsäure bindet, eine maximale Absorbtion bei 488nm hat und nach Bindung an die DNA lebender Zellen Licht mit 518nm emittiert. Mit ihm können die grünfluoreszierenden lebenden Zellen im Durchflusszytometer auf dem FL-1-Kanal erfasst werden. Der Farbstoff ist in der Konzentration 1mM in DMSO gelöst. Gelagert wurde er im Kühlschrank bei  $4^{\circ}\text{C}$  unter Lichtausschluss.

#### **3.2.4.9 Material für die Zellidentifikation**

Für die Zellidentifizierung wurde ein FITC-konjugierter Anti-Cytokeratin-Antikörper 1:100 in PBS verdünnt eingesetzt. Die Stammlösung wurde in

geeigneten Aliquoten von 5µl bei -20°C unter Lichtausschluss gelagert.

### **3.2.4.10 Medien für die Bakterienkultivierung**

#### ***LB Medium***

Als Kontrolle für das Bakterienwachstum wurde Luriant-Bertani Medium (LB-broth) verwendet. Die Trockensubstanz wurde in *Aqua dest.* (20g/l) gelöst und nach Abfüllen in Laborflaschen bei 121°C für 15min autoklaviert. Die Lagerung erfolgte im Kühlschrank bei 4°C.

#### ***Medien für die Bakterienanzüchtung***

Für die Anzucht von *E. coli* 1303 wurden Fertigboullions verwendet: Hirn-Herz (brain-heart-infusion-broth, BHI) und Trypton-Soja (trypticase-soy-broth, TBS), die bei 4°C gelagert wurden.

### **3.2.5 Versuchstiere**

#### **3.2.5.1 Versuchstiere zur Untersuchung der Milch nach LPS-Vorbehandlung**

Dabei handelt es sich um Tiere der Rasse Holstein-Friesian, die nach den Kriterien eines standardisierten Tiermodelles ausgewählt und im Rahmen des Promotionsprojektes von Herrn Tobias Pfister angekauft wurden<sup>6</sup>.

#### **3.2.5.2 Spendertiere für die Gewebegewinnung**

Gewebe für die Präparation der primären bovinen Milchdrüsenepithelzellen (pbMEC; siehe 3.3.2.1) wurde unmittelbar nach der Schlachtung von Kühen der Rasse Fleckvieh am Schlachthof Fürstenfeldbruck gewonnen. Die Tiere waren allgemein- und eutergesund.

#### **3.2.5.3 Spendertiere zur Blutgewinnung**

Als Spendertiere für die Blutgewinnung zur Präparation der neutrophilen Granulozyten (PMN; siehe 3.3.4.2) wurden klinikeigene, gesunde Holstein-Friesian-Kühe aus der Klinik für Wiederkäuer der LMU München herangezogen.

Die Blutproben für die an der Stiftung Tierärztliche Hochschule in Hannover durchgeführten Untersuchungen wurden dort an gesunden, institutseigenen Tieren der Arbeitsgruppe Immunologie genommen.

### 3.2.6 Modellbakterien

Der verwendete Bakterienstamm *E. coli* 1303 wurde aus dem Eutersekret einer an klinischer Mastitis erkrankten Kuh in der Klinik für Rinder der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover isoliert. Die biochemische Charakterisierung und Stammhaltung der Bakterien in Glycerinstocks erfolgte freundlicherweise im Institut für Mikrobiologie der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover unter der Leitung von Prof. Valentin-Weigand.

**Tabelle 4: Biochemisches Reaktionsspektrum des verwendeten *E. coli*-Stamms 1303**

-	Kligler (H <sub>2</sub> S-Nachweis)	+	Methylrot
+	Indolbildung	-	Voges-Proskauer-Reaktion
-	Citrat	+	Glukose
-	Urease	+	Gasbildung
-	Malonat	+	Laktose
-	Phenylalanindecaboxylase	-	Saccharose
+	Lysindecaboxylase	+	Adonit
-	Ornithindecaboxylase	+	Rhamnose
-	Gelatinase	+	Oxidativer Glukoseabbau
-	Motilität	+	Fermentativer Glukoseabbau

+ = positiver Nachweis; - = kein Nachweis

Die Bakterien wurden in Einheiten von 20 Cryoballs pro 1ml Cryotube mittels „Cryobank™“-System bei -80°C in der Tiefkühltruhe gelagert. Für jede Versuchsreihe wurden die kryokonservierten Bakterien immer neu aufgetaut und angezüchtet.

## 3.3 Methoden

### 3.3.1 Methoden zur Untersuchung der Milch LPS-vorbehandelter Kühe auf wachstumshemmende Eigenschaften

Dieser Teil des vorliegenden Promotionsprojektes beschreibt die Methoden zur Bestimmung der Wachstumsbedingungen für *E. coli* in den verschiedenen Milchpräparationen der durch intramammäre LPS-Applikation vorbehandelten

Tiere.

### **3.3.1.1 Probanden und Modellbedingungen der Versuchstiere zur Gewinnung der Milch**

Probanden für die Gewinnung der Milchproben waren Versuchstiere aus dem Promotionsprojekt von Herrn Tobias Pfister<sup>6</sup>, genehmigt durch die Regierung von Oberbayern mit dem Aktenzeichen 55.2-1-54-2531-108-05. Für dieses Tiermodell wurden Tiere der Rasse Holstein-Friesian eingesetzt, die sich in der ersten Laktation befanden, klinisch allgemein- und eutergesund und vorberichtlich noch nie an einer Euterezündung erkrankt waren. Die Milch aller vier Euterviertel musste bei zweimaliger Beprobung im Abstand von 2-4 Wochen frei von Bakterien sein und der Zellgehalt der Milch (SCC; engl.: somatic cell count) durfte 50.000 nicht überschreiten.

Nach der Milchprobenentnahme für die Erstellung der Basiswerte (Nullwert) wurden die Kühe nach Injektion von 2ml Oxytocin i.v. ausgemolken und erhielten anschließend eine intramammäre Infusion mit LPS. Dafür wurde das LPS aus dem *E. coli*-Stamm 1303 verwendet, welches am Lehrstuhl für Biochemische Pharmakologie im Fachbereich Biologie der Universität Konstanz unter der Leitung von Fr. Dr. Sonja von Aulock hergestellt wurde. Pro Viertel wurden 5ml einer sterilen 0,9%igen NaCl-Lösung, in der LPS in einer Konzentration von 0,2µg/ml LPS gelöst war, mit einer Einmalspritze über eine Zitzenkanüle in die Zitzenzisterne appliziert. Damit eine gleichmäßige Verteilung des LPS in der Drüse gewährleistet war, wurde diese nach der Applikation gründlich durchmassiert. Die Tiere wurden wie vor Versuchsbeginn zweimal täglich gemolken. Dabei wurden die Milchproben für die Ex-vivo-Untersuchung des Eutersekretes LPS-vorbehandelter Kühe gewonnen.

### **3.3.1.2 Gewinnung des Milchsekretes**

Die Probenentnahme erfolgte unmittelbar vor dem Melken am Morgen jeweils aus dem LPS-behandelten Euterviertel. Als Basiswert (Nullwert) wurde die erste Milchprobe unmittelbar vor der LPS-Infusion gewonnen. Um den Effekt der LPS-Behandlung auf die wachstumshemmenden Eigenschaften der Milch zu untersuchen, wurden weitere Proben 24h, 72h und 240h nach der LPS-Infusion genommen.

Das Vorgemelk (ca. 2ml) wurde in eine Schale gemolken und nach makroskopischer Beurteilung unschädlich beseitigt.

Nach trockener Reinigung der Zitze mit Haushaltspapier oder bei starker Verschmutzung mit einem feuchten Euterlappen folgte eine gründliche Desinfektion der Zitze mit einem Haushaltspapier, das mit 70%igem Ethylalkohol getränkt war. Nach Verwerfen der etwa ersten 5ml des Milchsekretes wurden ca. 250ml in eine sterile Laborflasche gemolken, die anschließend sofort verschlossen wurde. Weitere 50ml wurden für die Analyse von Milchinhaltsstoffen in ein Probengefäß des Milchprüfringes Bayern gemolken, wo u.a. die Bestimmung der Milchzellzahl (SCC) erfolgte. Die Proben wurden umgehend zur weiteren Aufarbeitung auf Eis verpackt und in das hauseigene Bakteriologische Labor gebracht.

### **3.3.1.3 Milchpräparation für die Ex-vivo-Untersuchungen der Milch LPS-vorbehandelter Kühe**

Die weitere Verarbeitung der steril gewonnenen Milchproben erfolgte unter der Sterilarbeitsbank. Zur Untersuchung des Wachstumsverhaltens von *E. coli* 1303 in Vollmilch, wurden zunächst 100ml der Milch in einen sterilen Erlenmeyerkolben überführt und bis zur Weiterverarbeitung auf Eis gelagert.

Für die Präparation der zellfreien Magermilch zur Untersuchung nichtzellulärer bakterienwachstumshemmender Mechanismen wurde die restliche Milch auf 50ml-Röhrchen verteilt und bei 4°C und 4500 x g für 25min zentrifugiert. Anschließend wurde die sich an der Oberfläche befindende Fettschicht vorsichtig unter der Sterilarbeitsbank mit einem abgeflammt Metallspatel entfernt. Ohne das Zellpellet im Röhrchen aufzuwirbeln, wurden nun 100ml der zellfreien Magermilch in einen Erlenmeyerkolben pipettiert und dieser bis zur Inkubation mit Bakterien auf Eis gelagert.

### **3.3.1.4 Präparation der In-vitro-Infektionsdosis**

Der für die Wachstumskurven eingesetzte *E. coli*-Stamm 1303 wurde aus dem Milchsekret einer an klinischer Mastitis erkrankten Kuh (Patient der Klinik für Rinder der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover) isoliert (siehe 3.2.6). Die Bakterien standen kryokonserviert zur Verfügung (Mikrobanksystem „Cryobank<sup>TM</sup>“). Für die Anzüchtung wurde ein Aliquot mit einer Öse über einen

Columbia Schafblut-Agar gestrichen. Anschließend folgte eine Inkubation bei 37°C. Nach 24h wurden ca. 5 Kolonien in 10ml BHI überführt, auf dem Schüttler durchmischt und für 6h bei 37°C inkubiert. Nach erneutem intensiven Mischen wurden 100µl dieser Suspension in 9,99ml TSB überführt, gut durchmischt und über 18h bei 37°C inkubiert. Um eine definierte Anzahl Kolonie-bildender Einheiten (CFU; engl.: colony forming units) zu erlangen, wurde die photometrisch bestimmte optische Dichte (OD) einer Bouillon mit der Keimzahlbestimmung durch das Spatelverfahren verknüpft. Dazu wurde zunächst eine Verdünnungsreihe in Zehnerschritten in 0,9%iger NaCl-Lösung bis zu einer Stufe von 1:10<sup>8</sup> hergestellt. 100µl der Verdünnungsstufen 1:10<sup>4</sup> bis 1:10<sup>8</sup> wurden anschließend zur Keimzahlbestimmung als Triplikate auf Columbia Schafblut-Agar-Platten mit einem Drigalski-Glasspatel ausgestrichen. Die Platten wurden bei 37°C über 24h inkubiert. Nur Platten mit einer Koloniezahl zwischen 3 und 300 Kolonien wurden ausgezählt. Diese Zahl wurde nun ins Verhältnis mit der photometrisch bestimmten optischen Dichte (OD) der ersten Verdünnungsstufe (1:10) gesetzt. Nach Ausplattieren von drei reproduzierbaren Werten konnte eine Kalibrierkurve erstellt werden, die es ermöglichte, durch Ermittlung der OD der ersten Verdünnungsstufe bei einer Wellenlänge von 623nm auf die Zahl der CFU in der Bouillon zu schließen. Mit ihrer Hilfe wurde danach durch Bestimmung der OD in der Bouillon die entsprechende Bakterienkonzentration in CFU errechnet. Die angestrebte *E. coli*-Infektionsdosis von 1 x 10<sup>6</sup> CFU/ml wurde durch Verdünnung der Bouillon mit steriler 0,9%iger NaCl-Lösung hergestellt. Zur Kontrolle wurden 100µl der Infektionsdosis auf Violett-Red-Bile-Agar (VRB-Agar) ausplattiert und bei 37°C für 24h inkubiert. Um das Volumen der Inokulationsdosis möglichst gering zu halten, wurde eine hohe Konzentration an Bakterien gewählt (1 x 10<sup>6</sup> Bakterien/ml).

### **3.3.1.5 Erstellen der Wachstumskurven von *E. coli* in Vollmilch und zellfreier Magermilch**

Um die wachstumshemmenden Eigenschaften des Milchsekretes aus mit LPS vorbehandelten Eutervierteln zu untersuchen, wurden Wachstumskurven von *E. coli*<sub>1303</sub> in der Vollmilch und in der zellfreien Magermilch erstellt. Als Kontrolle wurde zu jedem Versuchsansatz jeweils eine Wachstumskurve von *E. coli*<sub>1303</sub> in LB-Medium angefertigt.

Die vor sowie 24h, 72h und 240h nach der LPS-Behandlung gewonnenen Milchproben wurden wie beschrieben zu zellfreier Magermilch präpariert oder als Vollmilch belassen (siehe 3.3.1.3). Davon befanden sich jeweils 100ml in einem Erlenmeyerkolben. Das für die Kontrolle verwendete LB-Medium (100ml) wurde ebenfalls unter der Sterilbank in einen sterilen Erlenmeyerkolben überführt. Zu den 100ml Vollmilch, zellfreier Magermilch und LB-Medium wurden 10 $\mu$ l des Inokulates ( $10^6$  Bakterien/ml; siehe 3.3.1.4) pipettiert und anschließend gut durchmischt. Somit sollte zu Beginn in dem jeweiligen Ansatz eine Bakterienkonzentration von 100 CFU/ml vorliegen. Dies wurde mit der Bestimmung der Kolonienzahl unmittelbar nach der Inokulation von *E. coli* 1303 in die Erlenmeyerkolben überprüft. Dieser Wert (in CFU) gilt als Basiswert für die erstellte Wachstumskurve und entspricht hier dem Zeitpunkt 0h. Die Erlenmeyerkolben wurden auf einem Flachbettschüttler im Brutschrank bei 37°C inkubiert und nur zur Probenentnahme unter der Sterilarbeitsbank alle 2h herausgenommen. Durch die konstante Bewegung der Bakteriensuspension wird eine gleichmäßige Nährstoffverteilung sichergestellt.

Die Keimzahlbestimmung zu den Zeitpunkten 0h, 2h, 4h, 6h und 8h wurde durch Ausplattieren mit einem Spiralplater auf VRB-Agar bestimmt. Dafür wurde jeweils 1ml der Bakteriensuspension in ein spezielles Probengefäß des Spiralplaters pipettiert und dieses in die Aufnahmevorrichtung des Gerätes gestellt. Der Spiralplater brachte anschließend die Probenlösung spiralförmig auf dem Agar auf. Je nach erwarteter Bakteriendichte wurde das Gerät so eingestellt, dass entweder 100 $\mu$ l linear (niedrige Dichte) oder 50 $\mu$ l logarithmisch (hohe Dichte) auf dem Agar aufgetragen wurden. Nach 6 und 8h war eine Vorverdünnung der Proben (1:10 und 1:10<sup>2</sup>) nötig, da sonst die Anzahl an Kolonien wegen zu hoher Dichte nicht mehr auswertbar war. Die Platten wurden daraufhin bei 37°C im Brutschrank bis zum nächsten Morgen bebrütet. Die dunkelgefärbten Kolonien wurden mit Hilfe eines computergestützten Ablesegerätes ausgezählt. Alle Proben wurden in Triplikaten ausplattiert.

### **3.3.1.6 Bestimmung der somatischen Zellzahl der Milch**

Die Zellzahlbestimmung (SCC; engl.: somatic cell count) der Milch wurde im Milchprüfing Bayern e.v. in Wolnzach durchgeführt. Die Milchproben wurden in spezielle Gefäße mit dem Konservierungsmittel Acidiol gefüllt und an den

Milchprüfring gesandt. Die SCC-Bestimmung in der Rohmilch wurde dort mittels fluoreszenzoptischer Zählung mit dem Fossomatic® 5000 durchgeführt.

### **3.3.2 Methoden zur Kultivierung und Charakterisierung boviner Milchdrüsenepithelzellen (MEC)**

#### **3.3.2.1 Präparation und Kryokonservierung der primären bovinen Milchdrüsenepithelzellen**

Die Gewinnung der primären bovinen Milchdrüsenepithelzellen (pbMEC) erfolgte nach der modifizierten Methode von Cifrian et al. (1994)<sup>266</sup>.

##### *Gewinnung von Milchdrüsenewebe*

Die Zellen wurden aus dem Eutergewebe gesunder Tiere bei der Schlachtung am Schlachthof Fürstenfeldbruck gewonnen. Hier wurde unmittelbar nach dem Ausbluten der Tiere das Gewebe entnommen: Das Euter wurde gründlich mit Wasser gereinigt und anschließend mit 70% Alkohol oberflächlich desinfiziert. Die Zitzen mit der umliegenden Haut wurden daraufhin mit einem Messer abgetrennt. Anschließend wurde mit Hilfe einer chirurgischen Pinzette und eines sterilen Messers aus jedem Euterviertel ein etwa 5x5cm großes Stück Gewebe aus der Milchdrüse oberhalb der Drüsenzisterne geschnitten. Hierbei sollte nur Gewebe um die Drüsenzisterne mit zahlreichen Milchgängen genommen werden. Die Gewebestücke wurden in eine Weithalslaborflasche mit vorgelegtem 37°C warmen Waschmedium gegeben, dem APS (Antibiotikum und Antimykotikum) zugefügt war. Anschließend erfolgte der rasche Transport dieser Flaschen in einer Styroporbox zur weiteren Verarbeitung in das Zelllabor der Klinik für Wiederkäuer der LMU München.

##### *Gewebeaufarbeitung*

Vor der weiteren Bearbeitung unter der Sterilarbeitsbank wurden die Gewebestücke nochmals in ein Becherglas mit frischem Waschmedium mit APS gegeben, um die Milch und eventuelle Verschmutzungen zu beseitigen. Bis zu diesem Schritt wurden die einzelnen Viertel getrennt behandelt. Falls grobsinnlich verändertes Gewebe gefunden wurde, konnte das entsprechende Viertel verworfen werden.

Unter der Sterilarbeitsbank wurde das Gewebe zunächst mit einer Schere unter

Zuhilfenahme einer chirurgischen Pinzette und einer Glaspetrischale in 4-5cm lange Gewebestreifen geschnitten. Diese wurden anschließend in einem Becherglas mit 37°C warmem Waschmedium mit APS gesammelt.

Damit für die spätere Verdauung des Gewebes eine größere Oberfläche entstand, wurden die Streifen mit einem Skalpell mehrfach kammartig eingeschnitten. Diese wurden anschließend auf 11-Laborflaschen aufgeteilt, in denen ca. 300ml 37°C warmes Waschmedium mit APS vorgelegt waren.

Um die in den Hohlräumen des Gewebes der Drüse und in den Milchgängen befindliche Milch zu entfernen, mussten die Gewebestreifen mehrfach gewaschen werden. Dafür wurden die Flaschen kräftig für 5min geschüttelt und anschließend die Überstände durch ein Küchensieb abgeseibt. Das Gewebe wurde mit einem Trichter in die Flasche zurückgefüllt und mit ca. 300ml 37°C warmem Waschmedium mit APS aufgefüllt. Dies wurde so oft wiederholt, bis der Überstand klar war.

Anschließend folgte der Gewebeaufschluss mit Kollagenase: Nach dem letzten Waschschrift wurden je Laborflasche, in der sich ca. 400ml Gewebebrei befanden, 75ml Kollagenaselösung (siehe 3.2.4.1) gegeben. Die verschlossenen Flaschen wurden daraufhin im 37°C warmen Schüttelwasserbad für 45min inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Überstände des ersten Kollagenaseschrittes mit einem Küchensieb abgeseibt und verworfen. Die zuerst gewonnenen Überstände enthielten keine geeigneten Milchdrüsenepithelzellen. Der Gewebebrei wurde mit Hilfe eines Trichters in die Flaschen zurückgegeben. Es folgte der 2. Kollagenaseschritt, bei dem die doppelte Menge an Kollagenaselösung (150 ml je 400 ml Gewebebrei) eingesetzt wurde. Nach weiterer Inkubation im Schüttelwasserbad für 45min wurden die Überstände ebenfalls mit dem Küchensieb abgeseibt, jedoch nicht verworfen, sondern in einem Becherglas mit vorgelegtem 37°C warmen Waschmedium gesammelt. Damit möglichst alle gelösten Zellen gewonnen werden konnten, wurde der Gewebebrei mit Waschmedium kräftig im Sieb gespült. Das Gewebe wurde wieder in die Flaschen zurückgegeben. Es folgte der 3. und 4. Kollagenaseschritt entsprechend dem zweiten.

Die verdünnten Überstände aus dem 2. Kollagenaseschritt wurden zur Aufreinigung durch einen Siebturm gegeben, der von oben nach unten aus Sieben

mit immer feinerer Maschenweite aufgebaut war. Die durchgesiebten Überstände wurden in 50ml-Röhrchen abgefüllt und bei 250 x g für 10min ohne Bremse bei Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend wurden die Überstände vorsichtig dekantiert. Das Sediment aus den einzelnen Röhrchen wurde mit Waschmedium resuspendiert und in einem Röhrchen gepoolt. Nach einer weiteren Zentrifugation (250 x g; 5min; RT und Bremse Stufe 1) wurde der Überstand nochmals verworfen und die Zellen im frischen Medium resuspendiert. Bei sichtbarer Verunreinigung wurden die Zellen nochmals durch einen Zellstrainer (Maschenweite 100µm) gefiltert und entsprechend zentrifugiert. Anschließend wurden die Überstände abgekippt und die Zellen in einem 50ml-Röhrchen mit RPMI 1640 mit 10% FKS und HEPES-Puffer bis zum Abschluss der Präparation gesammelt und im Inkubator bei 37°C warm gehalten.

Die Überstände aus den Kollagenaseschritten 3 und 4 wurden entsprechend aufgereinigt.

#### *Kryokonservierung*

Die gesammelten Zellen wurden abschließend noch einmal zentrifugiert (250 x g; 5min; RT und Bremse Stufe 1) und ungezählt pauschal in 3ml FKS aufgenommen. Eine Auszählung der Zellen ist wenig sinnvoll, da man erst in der Kultur die pbMEC von den kontaminierenden Zellen (v.a. Fibroblasten) unterscheiden kann.

Für die Kryokonservierung musste das Volumen der in FKS aufgenommenen Zellen ermittelt werden. Anschließend wurde das gleiche Volumen an doppelt konzentriertem Gefriermedium (FKS mit 20% DMSO, siehe auch 3.2.4.1) hinzugegeben und mit der Pipette gut durchmischt. Die Zellen wurden jeweils als 1ml-Aliquots in Kryotubes eingefroren. Um ein langsames und gleichmäßiges Herunterkühlen sicherzustellen, wurden die Tubes in der Dyna-Chill<sup>®</sup> Box bei -80°C eingefroren. Nach drei Tagen konnten sie in die Kühltruhe umgelagert werden.

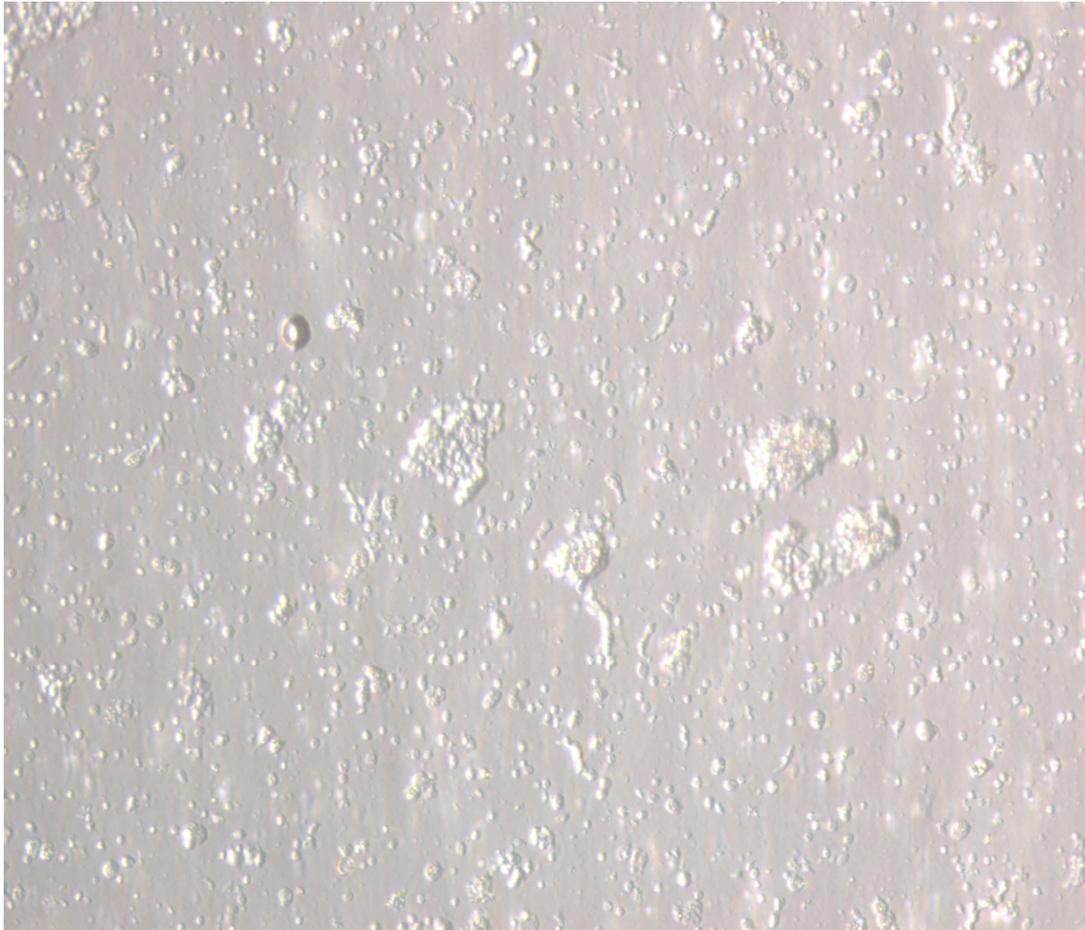
#### **3.3.2.2 Kollagenbeschichtung der Zellkulturplatten**

Die Kulturgefäße für die Anzucht der pbMEC wurden mit Kollagen beschichtet. Dafür wurden sterile Zellkulturplatten mit einer 10%igen Kollagenlösung beschickt und unter der Sterilarbeitsbank getrocknet. Für die Kulturschalen

(Durchmesser 9cm) waren 5ml Lösung erforderlich, für die kleineren Wells der 6-Well-Kulturplatte reichte 1ml. Die getrockneten Platten wurden anschließend noch 20min mit UV-Licht bestrahlt. Die beschichteten Platten waren steril verpackt 4 Wochen im Kühlschrank haltbar.

### **3.3.2.3 Kultivierung und Passagieren der primären bovinen Milchdrüsenepithelzellen**

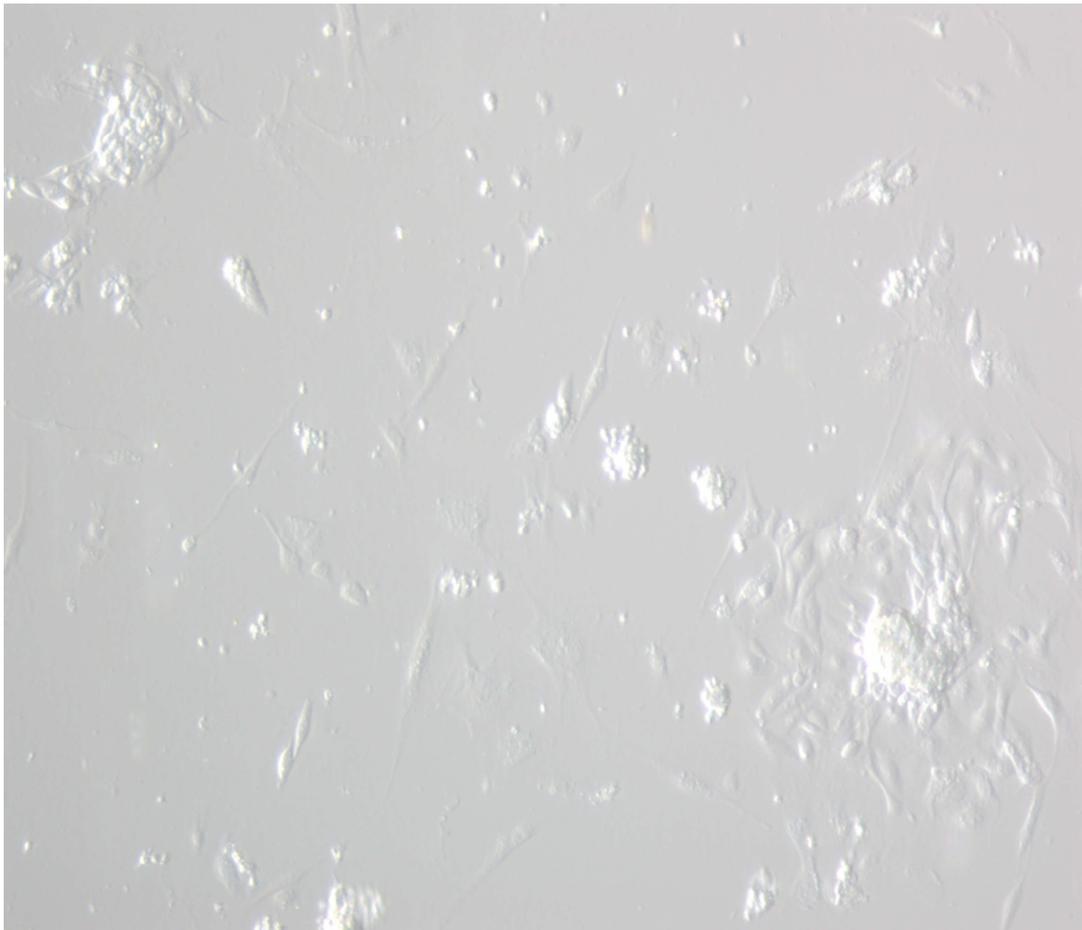
Zur Aufreinigung der kryokonservierten pbMEC wurden die präparierten Zellen in großen kollagenbeschichteten Zellkulturschalen mit einem Durchmesser von 9cm angezüchtet. Die kryokonservierten Zellen wurden rasch im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und je Aliquot von 1ml in einem 50ml-Röhrchen mit vorgewärmtem Zellkulturmedium aufgenommen, damit das sonst toxisch wirkende Gefriermedium entfernt werden konnte. Anschließend wurden die Zellen bei 250 x g für 5min bei RT und mit eingestellter Bremse auf Stufe 1 zentrifugiert. Zwischenzeitlich wurden in jede der kollagenbeschichteten Zellkulturschalen 15ml vorgewärmtes Zellkulturmedium mit Antibiotikum (APS) vorgelegt. Ein Aliquot von 1ml kryokonservierter Zellen wurde für die Anzuchtung auf vier großen Kulturschalen verteilt. Nach der Zentrifugation wurden die Überstände vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgesaugt, die an eine Vakuumpumpe angeschlossen war. Das Pellet wurde in 400µl Zellkulturmedium mit APS aufgenommen und gut resuspendiert. Es hat sich als günstig erwiesen, das gelöste Pellet nochmals unmittelbar vor Aussaat durch einen Zellstrainer (100µm Maschenweite) zu filtrieren, um möglichen Zelldetritus zu entfernen. Anschließend wurden jeweils 100µl der Zellsuspension in das Medium einer Kulturplatte pipettiert und durch vorsichtiges kreuzförmiges Schwenken in der Schale verteilt (siehe Abbildung 2).



**Abbildung 2: Lichtmikroskopische Vergrößerung einer pbMEC-Kultur unmittelbar nach Aussaat (Vergrößerung 100-fach)**

Die Inkubation erfolgte im Inkubator bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Nach 24h Inkubation hafteten die Zellen an der Kollagenschicht und die toten Zellen sowie der Zelldetritus konnten durch kräftiges Abspülen mit PBS-Pufferlösung entfernt werden. Anschließend wurden die Zellen mit frischem Medium weiter inkubiert. Der Medienwechsel erfolgte im 2-tägigen Rhythmus.

Am 5. Kulturtag hatten sich Inseln aus Milchdrüsenepithelzellen gebildet, welche von Fibroblasten umgrenzt waren (siehe Abbildung 3).

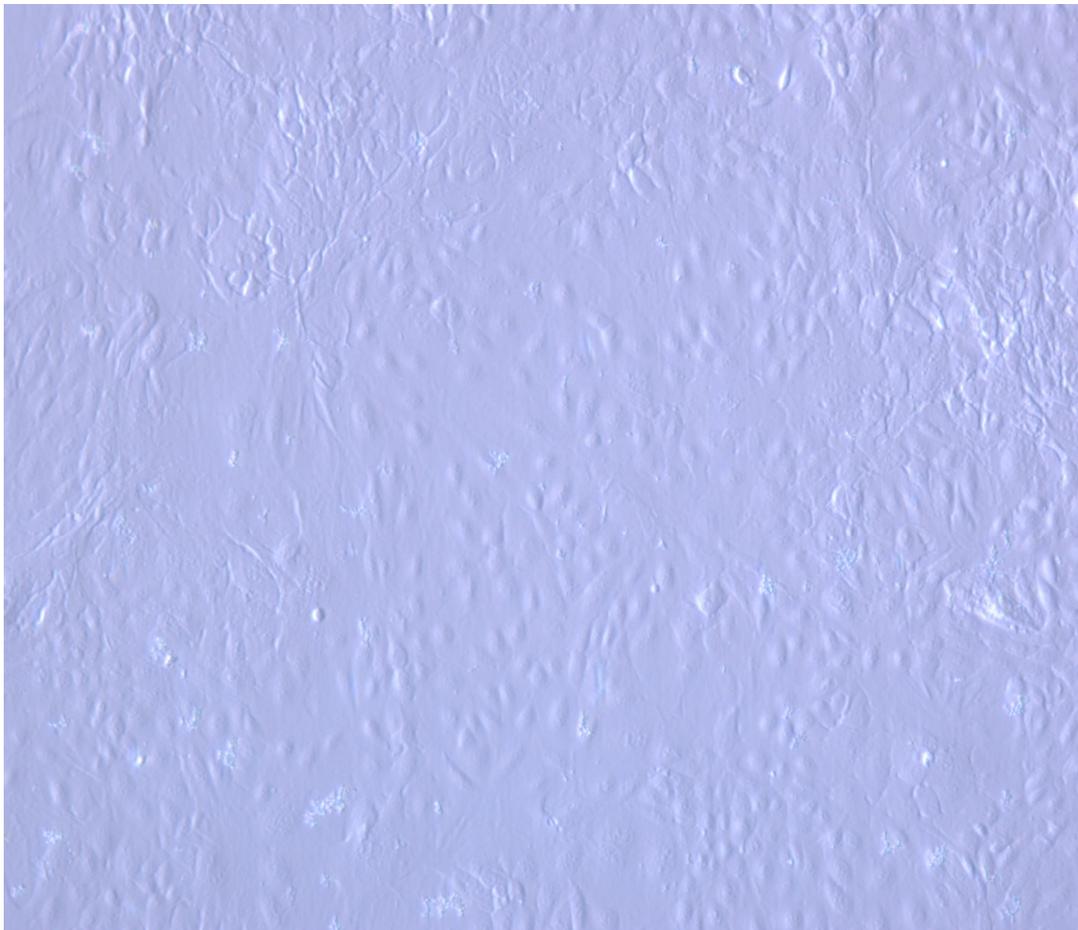


**Abbildung 3: Lichtmikroskopische Vergrößerung (100-fach) der pbMEC-Kultur an Tag 5: Bildung von Epithelzellinseln, die von Fibroblasten umlagert werden.**

Für das In-vitro-Modell der vorliegenden Arbeit waren Fibroblasten als kontaminierende Zellen unerwünscht und mussten durch vorichtiges „Abtrypsinieren“ entfernt werden. Dafür wurde das serumhaltige Kulturmedium abgesaugt, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit einer 10%igen Trypsin/EDTA-Lösung behandelt. Durch mikroskopische Kontrolle musste der Zeitpunkt abgepasst werden, an dem sich möglichst alle Fibroblasten gelöst hatten, aber die Epithelzellen noch hafteten. Die Trypsinlösung wurde sofort mit PBS verdünnt und mit der an den Sauger angeschlossenen Pasteurpipette gründlich abgesaugt. Anschließend wurden die pbMEC mit frischem Kulturmedium in den Inkubator zurückgestellt.

Am 7. Tag in Kultur war die Platte zu ca. 90% bewachsen. Um gleiche Versuchsbedingungen zu gewährleisten, mussten die Zellen komplett von der

Kulturschale gelöst werden und auf eine ebenfalls mit Kollagen beschichtete 6-Well-Platte umgesetzt werden. Dies gelang nach zweimaligem Waschen mit PBS und Lösen der Zellen mit 100%iger Trypsin/EDTA-Lösung für 10min im Inkubator. Die gelösten Zellen einer großen Kulturschale wurden in einem 50ml-Röhrchen mit 37°C warmem Kulturmedium gesammelt. Nicht gelöste Zellen wurden vorsichtig mit einem Zellschaber geerntet. Wie bei der Aussaat wurden die Zellen herunterzentrifugiert und das Pellet in 600µl Medium resuspendiert. Davon wurden jeweils 100µl in ein Well einer 6-Well-Platte überführt. Durch diese dichte Aussaat der Zellen konnte sichergestellt werden, dass die Zellen am 8. Kulturtag einen konfluenten Monolayer bildeten (siehe Abbildung 4).



**Abbildung 4: Lichtmikroskopische Vergrößerung der konfluent im Monolayer wachsenden pbMEC zu Versuchsbeginn (8. Kulturtag; Vergrößerung 100-fach)**

### 3.3.2.4 Passagieren und Kryokonservieren der MAC-T (Mammary Alveolar Cell-large T antigen)

Die Vermehrung dieser Zelllinie erfolgte durch Anzucht auf unbeschichteten Kulturschalen (Durchmesser 9cm). Ein 1ml-Aliquot der kryokonservierten Zellen (entspricht der Anzahl an Zellen einer konfluenten 9cm-Kulturschale) wurden rasch im Wasserbad aufgetaut, welches auf 37°C temperiert war. Um das toxisch wirkende Gefriermedium von den Zellen zu entfernen, wurden die Zellen sofort nach dem Auftauen in 50ml 37°C warmem Zellkulturmedium gewaschen. Nach der Zentrifugation mit 250 x g für 10min bei RT wurde der Überstand mit einer Pasteurpipette abgesaugt, die an eine Vakuumpumpe angeschlossen war. Das Zellpellet wurde in 400µl Medium resuspendiert und auf vier Zellkulturschalen (Durchmesser 9cm), in denen 15ml Medium mit Antibiotikum und Antimykotikum (APS) vorgelegt waren, durch kreuzförmiges Schwenken verteilt. Die Zellen wurden im Inkubator bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> angezüchtet. Der Medienwechsel fand im 2-tägigen Rhythmus statt.

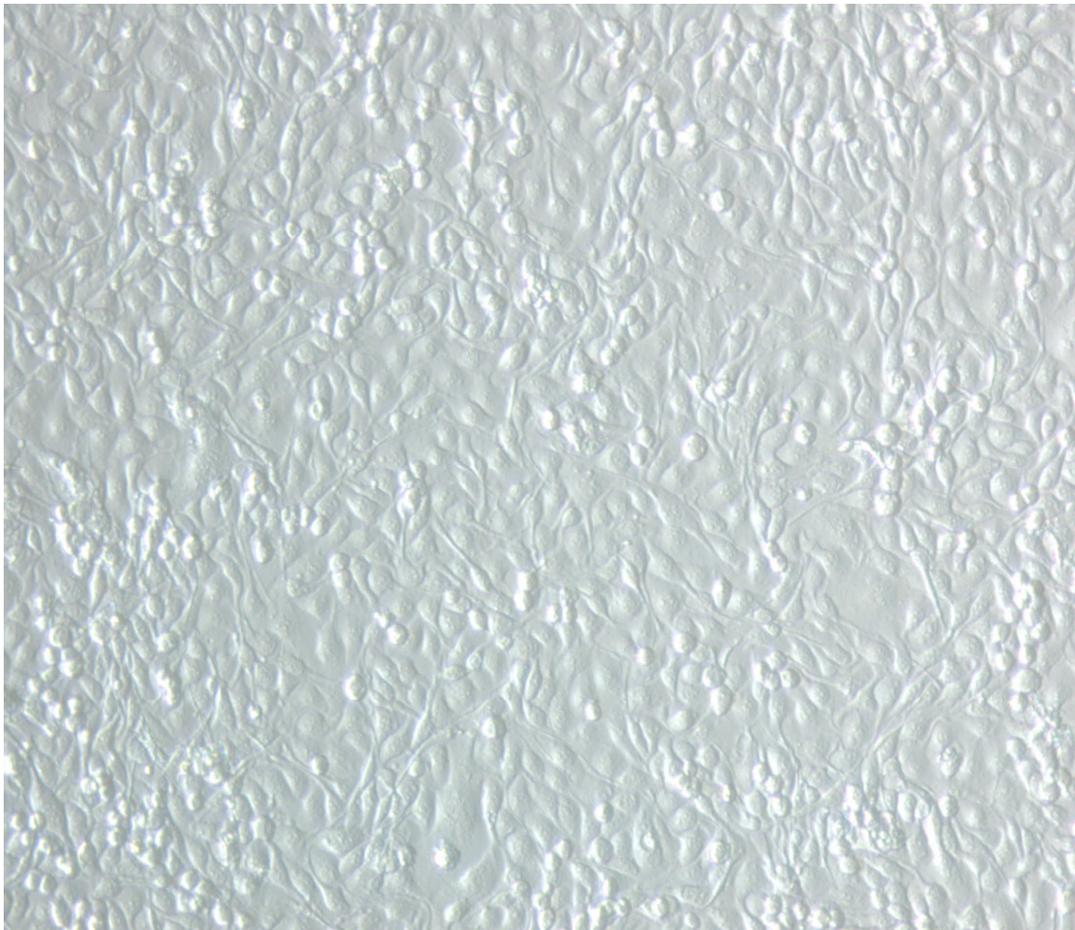
Nach Erreichen eines konfluenten Monolayers wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, damit das serumhaltige Medium mit hemmender Wirkung auf das Trypsin entfernt wurde. Anschließend wurden die Zellen mit ca. 3ml unverdünnter Trypsinlösung für 10min inkubiert. Nach Kontrolle unter dem Lichtmikroskop wurden die gelösten Zellen in 37°C warmes Zellkulturmedium aufgenommen. Nicht gelöste Zellen wurden vorsichtig mit einem Zellschaber von der Kulturschale entfernt. Um eine größere Ausbeute zu erhalten, wurden die MAC-T mehrfach passagiert, bevor sie eingefroren wurden. Dafür wurde die Zellsuspension nach jeder Passage im Verhältnis 1:4 geteilt und entsprechend der Aussaat angezüchtet.

Für die Kryokonservierung wurde das Pellet nach dem Zentrifugieren (250 x g; 10min; RT) in FKS (500µl je abgelöste Platte) aufgenommen und resuspendiert. Anschließend wurde das gleiche Volumen doppelt konzentrierter Gefrierlösung hinzugegeben. Die Zellen wurden gut durchmischt und als 1ml-Aliquots in Kryotubes bei -80°C konserviert. Damit ein gleichmäßiges Herunterkühlen gewährleistet war, wurden die Tubes in einer Dyna-Chill<sup>®</sup> Box verpackt. Nach drei Tagen wurden sie in die Gefriertruhe umgelagert (-80°C). Eine Lagerung über flüssigem Stickstoff wäre vorteilhafter, stand aber nicht zur Verfügung.

### 3.3.2.5 Kultivierung der MAC-T

Die Anzucht der MAC-T erfolgte auf unbeschichteten Zellkulturschalen (9cm-Kulturschalen und 6-Well-Platten). Um die Vergleichbarkeit mit dem Zellmodell der pbMEC zu optimieren, wurden die gleichen Medien wie für die primäre Milchdrüsenepithelzelle verwendet (siehe Abbildung 5).

Für die Kultivierung der MAC-T wurden die Zellen eines kryokonservierten 1ml-Aliquots (entspricht der Anzahl an Zellen einer konfluenten 9cm-Kulturschale) auf vier Zellkulturschalen mit einem Durchmesser von 9cm ausgebracht. Die Vorgehensweise erfolgte analog zu der Passagierung der MAC-T (siehe 3.3.2.4). Nachdem die Zellen einen Bewuchs von  $>90\%$  aufwiesen, konnten sie für den Versuch entsprechend weiterbehandelt werden.



**Abbildung 5: Lichtmikroskopische Vergrößerung der konfluent im Monolayer wachsenden MAC-T (Vergrößerung 100-fach)**

Für das Zellmodell wurden die MAC-T analog zur pbMEC von der großen

Kulturschale auf eine 6-Well-Platte umgesetzt. Dafür wurden die Zellen zweimal gründlich mit PBS gewaschen und mit 100%igem Trypsin (ca. 3ml) für 10min im Inkubator gelöst. Die gelösten Zellen einer Platte wurden in einem 50ml-Röhrchen gesammelt und bei Bedarf die noch haftenden Zellen mit dem Zellschaber gelöst. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation mit  $250 \times g$  für 5min bei RT. Nach Absaugen der Überstände wurde das Pellet mit 600 $\mu$ l Kulturmedium resuspendiert und anschließend auf die einzelnen Wells der unbeschichteten 6-Well-Platte verteilt. Die 6-Well-Platte wurde bis zum nächsten Tag inkubiert. Aufgrund der hohen Zelldichte hatte sich nach 24h ein konfluenten Monolayer gebildet.

### **3.3.2.6 Zellzahlbestimmung in der Zellkultur**

Die Quantifizierung der enzymatisch abgelösten pbMEC und MAC-T erfolgte mit einer Bürker-Zählkammer. Dafür mussten 10 $\mu$ l der Zellsuspension in die Kammer gefüllt werden. Bei einer hohen Zelldichte war eine Vorverdünnung erforderlich. Die Auszählung erfolgte unter dem Lichtmikroskop. Die Zellen von mindestens 16 Quadraten (Volumen 0,004mm<sup>3</sup>) wurden ausgezählt und anschließend der Mittelwert berechnet. Dies wurde dreimal wiederholt. Der Mittelwert aus allen drei Zählungen wurde in die entsprechende Umrechnungsformel für die Kammer eingesetzt und die Zellzahl/ml berechnet.

### **3.3.2.7 Identifizierung der Milchdrüsenepithelzelle**

Mit der Anfärbung des Cytokeratins, welches nur in Epithelzellen vorkommt, können diese von anderen Zellen, wie z.B. Fibroblasten oder Myoepithelzellen, unterschieden werden.

Der Nachweis von Epithelzellen wurde an angezüchteten und von Fibroblasten aufgereinigten pbMEC durchgeführt. Der Nachweis erfolgte an Zellen, wie sie zu Versuchsbeginn vorlagen.

Die abgelösten pbMEC wurden nach dem Zentrifugieren in PBS aufgenommen und auf eine Zelldichte von  $5 \times 10^6$ /ml eingestellt.

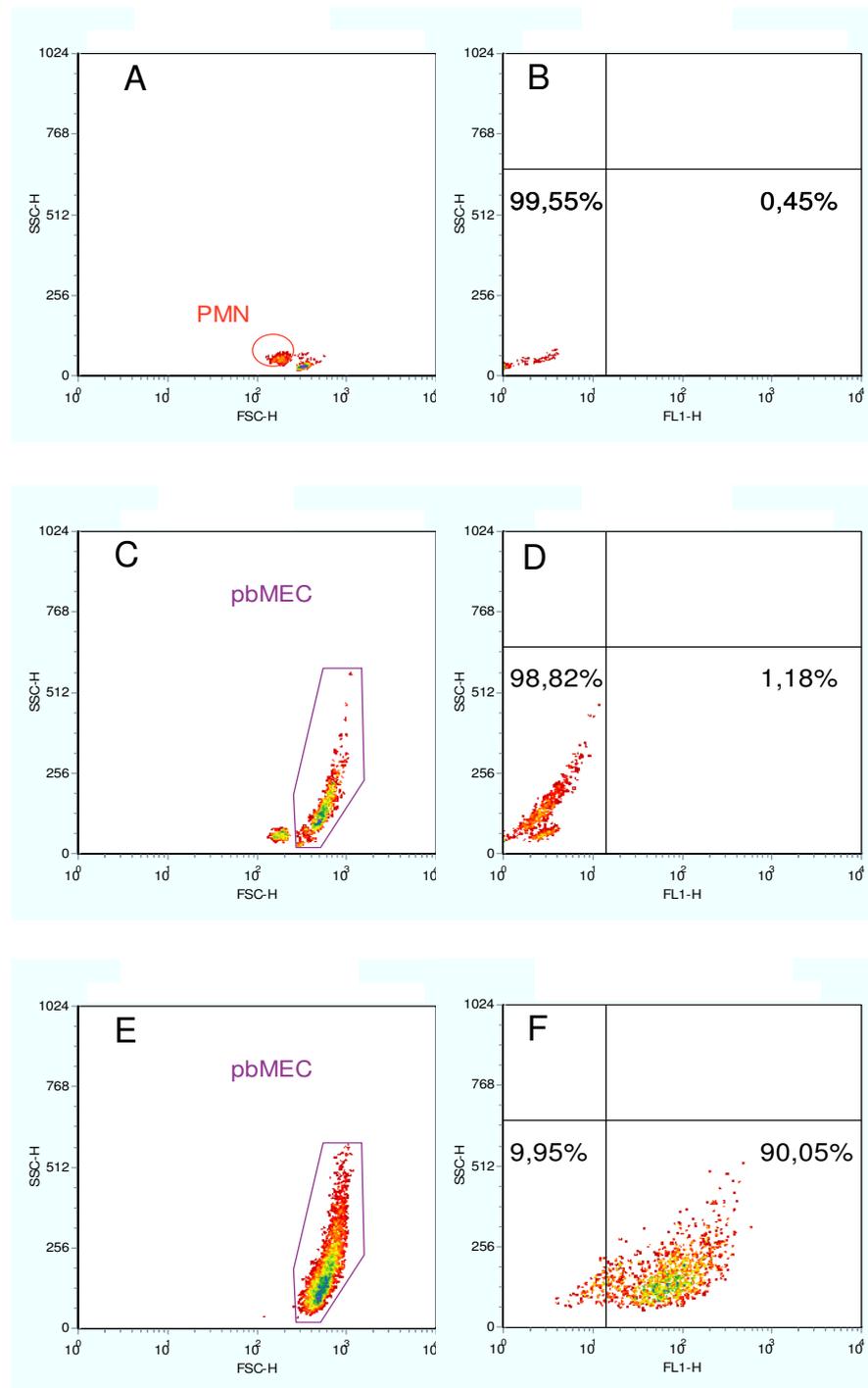
Als Negativkontrolle für die Cytokeratinfärbung wurden mit Biocoll<sup>®</sup> separierte bovine PMN eingesetzt, die ebenfalls auf eine Dichte von  $5 \times 10^6$ /ml eingestellt wurden.

Damit der Anti-Cytokeratin-Antikörper binden konnte, wurden die Zellen zunächst in Methanol fixiert. Dafür wurden 3ml der Zellsuspension mit 7ml eisgekühltem Methanol in einem 15ml-Röhrchen mit Hilfe des Mischshakers gut durchmischt. Für die Negativkontrolle wurden reine PMN verwendet oder eine Mischung aus jeweils 1,5ml pbMEC-Suspension und 1,5ml Granulozyten-Suspension. Anschließend erfolgte die Konservierung durch Inkubation der Röhrchen in Eis für eine Stunde.

Damit das Methanol entfernt werden konnte, mussten die Zellen zentrifugiert werden (240 x g; 10min; RT). Nach Dekantieren der Überstände wurde das Zellpellet mit PBS resuspendiert und in ein 50ml-Röhrchen überführt, das anschließend mit PBS aufgefüllt wurde. Durch wiederholtes Zentrifugieren (je 250 x g; 5min; 4°C) und Dekantieren des Überstandes waren die Zellen für die Färbung fixiert.

Für die Färbung wurden die Zellen in dem nach Dekantieren verbleibenden Restüberstand durch Klopfen gelöst und 20µl des 1:100 in PBS verdünnten pan-FITC markierten Anti-Cytokeratin-AK hinzupipettiert. Nach Mischen auf dem Schüttler erfolgte die Inkubation im Kühlschrank bei 4°C über 45min.

Zur Messung im Durchflusszytometer wurden die Proben mit 500µl PBS in ein FACS-Röhrchen überführt. Es wurden 5000 Events gemessen (siehe Abbildung 6).



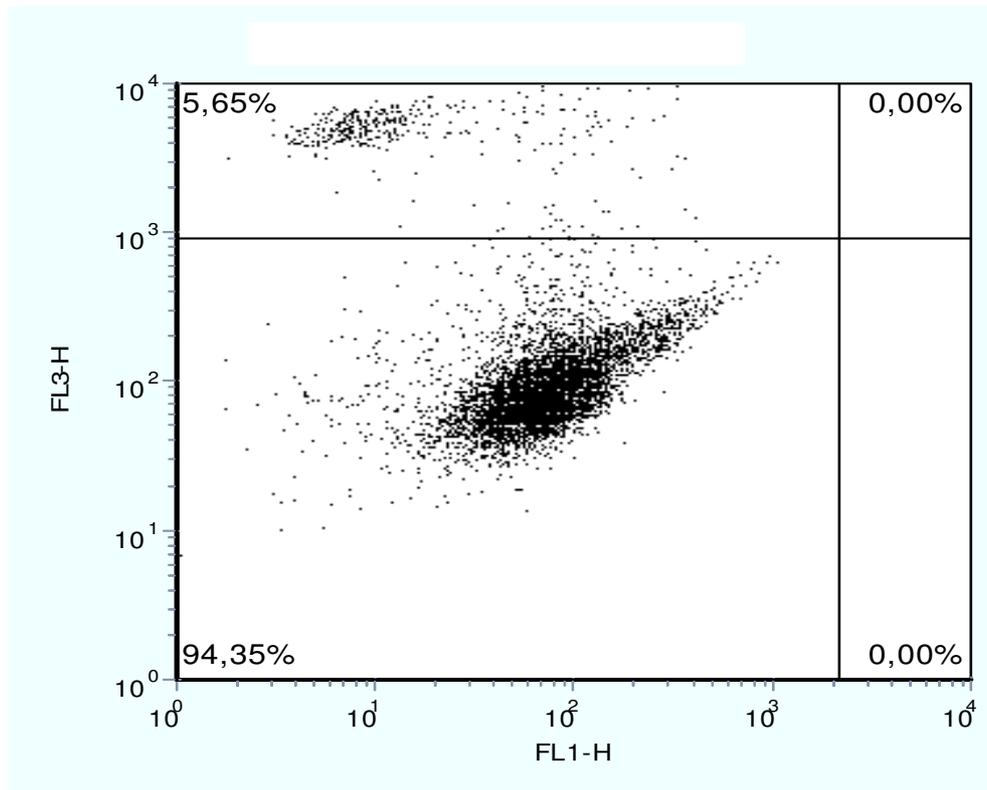
**Abbildung 6: Durchflusszytometrische Identifizierung der cytokerin-positiven Milchdrüsenepithelzellen**

Dargestellt sind links die Vorwärts- gegen Seitwärtsstreulicht-Dotplots, wodurch die Zellen morphologisch nach Größe und Komplexität differenziert abgebildet werden (A;

C; E). Die rechts abgebildeten Dotplots zeigen die Grünfluoreszenz gegen die Komplexität der Zellen (B; D; F). A und B: mit dem Anti-Cytokeratin-AK gefärbte reine PMN, die als Negativkontrolle eingesetzt wurden; C und D: ungefärbte fixierte Zellen, wovon 50% pbMEC und 50% PMN (Cytokeratin negativ) waren; E und F: Kulturzellen, die mit fluoreszenzmarkierten Anti-Cytokeratin-AK gefärbt wurden. In Abbildung F sind die cytokeratinpositiven pbMEC im rechten unteren Quadranten abgebildet, sie werden aufgrund des fluoreszierenden FITC-gekoppelten Anticytokeratin-AK im FL1-Kanal erfasst.

### 3.3.2.8 Vitalitätsnachweis bei den Kulturzellen

Der Vitalitätsnachweis erfolgte nach Lebend-Tot-Färbung der Kulturzellen im Durchflusszytometer. Die Zellen (pbMEC und MAC-T) wurden unmittelbar nach Versuchsabschluss enzymatisch vom Kulturgefäß gelöst und nach Waschen (250 x g; 10min; RT) in 50ml Wachstumsmedium auf eine Zelldichte von  $5 \times 10^6$ /ml eingestellt. 500µl der in PBS resuspendierten Zellen wurden mit 5µl des rotfluoreszierenden Propidiumjodid und mit 5µl Sybr<sup>®</sup> 14 versetzt. Nach Zugabe der Farbstoffe wurde der Ansatz mit dem Schüttler gemischt und anschließend für 15min bei 37°C inkubiert. Im Durchflusszytometer wurden 5000 Events ausgewertet. Die nur mit Sybr<sup>®</sup> 14 gefärbten grünfluoreszierenden, lebenden Zellen wurden im FL1-Kanal erfasst. Tote oder membrangeschädigte Zellen fluoreszierten grün-rot oder nur rot (FL3; siehe auch Abbildung 7).



**Abbildung 7: Lebend-Tot-Färbung der Kulturzellen**

Dargestellt sind als Dotplot die mit Sybr<sup>®</sup> 14 und Propidiumjodid gefärbten Kulturzellen. Im linken oberen Quadranten befinden sich die toten oder membrangeschädigten Zellen (PJ-positive Zellen), im linken unteren Quadranten die lebenden, nur mit Sybr<sup>®</sup> 14 angefärbten Zellen. Achsenbezeichnung: FL1 = Fluoreszenzkanal 1 (Grünfluoreszenz); FL3 = Fluoreszenzkanal 3 (Rotfluoreszenz)

### 3.3.3 Methoden für ein In-vitro-Modell zur LPS-Toleranz

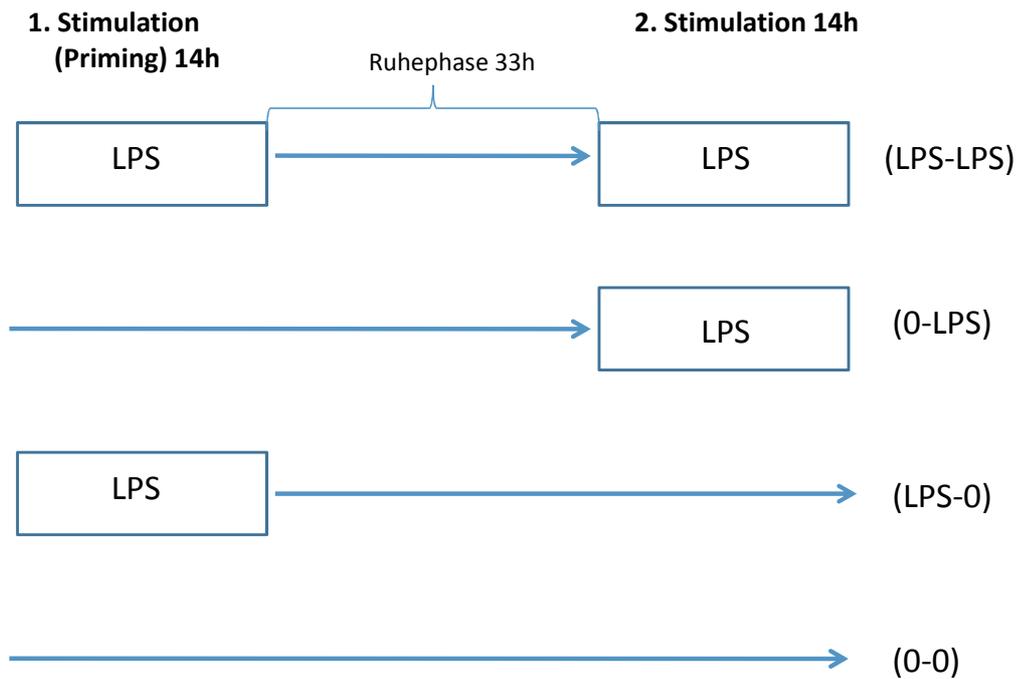
#### 3.3.3.1 Herstellen der LPS-Präparation für die Stimulationsversuche

LPS (L2630 von Sigma) wurde nach Herstelleranweisung in PBS gelöst. Die Stocklösung lag in einer Konzentration von 1000µg/ml vor. Sie wurde aliquotiert und bei -20°C gelagert. Für die Stimulationsversuche wurden Verdünnungsreihen aus der Stocklösung in serumfreiem Zellkulturmedium hergestellt. Für die Stimulationsversuche in den Zellmodellen mit MAC-T war eine Konzentration von 100µg/ml LPS im Kulturmedium erforderlich. Hierfür wurde das LPS in serumfreiem Zellkulturmedium gelöst, da FKS allein schon immunmodulative (auch chemoattraktive) Eigenschaften hat.

### **3.3.3.2 In-vitro-Modell für den Nachweis einer LPS-Toleranz bei der pbMEC und der MAC-T**

Der Versuchsaufbau zum Nachweis einer möglichen LPS-Toleranz wurde für die pbMEC wie auch für die MAC-T identisch gehalten, um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten: Grundprinzip des Entzündungsmodells war eine wiederholte Exposition der Zellen mit LPS in gleichbleibender Konzentration. Es sollte dabei die immunologische Reaktion der Zelle zwischen vorstimulierten („geprimten“) und nicht-vorstimulierten („nicht geprimten“) Zellen verglichen werden. Dazu wurden die Zellkulturüberstände auf ihre PMN-modulierende Kapazität geprüft. Zum Einsatz kamen PMN-Funktionstests wie Chemotaxis-, ROS- und Phagozytose-Assay.

Für den Versuch wurden die Zellen, wie in 3.3.2.3 und 3.3.2.5 beschrieben, angezchtet und auf 6-Well-Platten umgesetzt. Etwa 24h nach Umsetzen waren die Zellen zu einem konfluenten Monolayer angewachsen. Nun erfolgte die erste Stimulation („Priming“) der Zellen. Hierfür wurden die Zellen viermal gründlich mit vorgewärmten PBS gewaschen, um störendes Serum aus der Kultur zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen mit LPS, das in serumfreiem Zellkulturmedium gelöst war, für 14h stimuliert. Die LPS-Konzentration für die Stimulation der pbMEC betrug 20µg LPS/ml, diejenige für die MAC-T 100µg/ml. Diese Dosierungen wurden aufgrund der Dosis-Wirkungsversuche gewählt, da sie sicher wirksam waren (siehe 4.2.1.3). Nach der Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurden die Überstände nach dreimaligem vorsichtigen Resuspendieren in Eppendorfgefäße überführt und bei -80°C gelagert. Um das LPS aus der Kultur zu entfernen, wurden die Zellen viermal mit 37°C warmen PBS gewaschen und für die Ruhephase mit serumhaltigem (10%FKS) Kulturmedium gefüttert. Nach der Ruhephase wurden die Zellen entsprechend der ersten Stimulation ein zweites Mal mit der gleichen LPS-Präparation behandelt. Damit ein Toleranzeffekt nachgewiesen werden kann, wurden die Zellen, wie in Abbildung 8 schematisch dargestellt, in unterschiedlichen Kombinationen mit und ohne LPS behandelt. Nach der 2. Stimulation wurden die Zellkulturüberstände entsprechend der 1. Stimulation behandelt und bis zur weiteren Analyse bei -80°C kryokonserviert. Nach Abschluss des Versuches wurden die Zellen auf ihre Vitalität geprüft.



**Abbildung 8: Stimulationsansätze zur Untersuchung der LPS-Toleranz *in vitro***

Schematische Darstellung des Stimulationsschemas zum Nachweis der LPS-Toleranz bei der pbMEC und der MAC-T: **(LPS-LPS)** beschreibt das Stimulationsschema der doppelstimulierten Zellen, mit dem der Einfluss einer LPS-Vorbehandlung (Toleranz) auf wiederholte LPS-Exposition geprüft wurde. Als Kontrolle dazu wurden nicht-vorstimulierte Zellen **(0-LPS)** zum Zeitpunkt der 2. Stimulation mit LPS behandelt. **(LPS-0)** beschreibt den Versuchsansatz, bei denen Zellen ausschließlich zum Zeitpunkt der 1. Stimulation mit LPS behandelt wurden. Er dient der Beurteilung möglicher LPS-Effekte aufgrund der 1. Stimulation. **(0-0)** ist die mitgeführte Kontrolle nie-stimulierter Zellen.

### 3.3.4 Methoden zur Charakterisierung von PMN-Funktionen

#### 3.3.4.1 Blutentnahme

Die Blutentnahme erfolgte unter sterilen Bedingungen mit einem Vacutainerröhrchen aus der *V. jugularis*. In den Probenröhrchen befand sich Natrium-Heparinat als Antikoagulanzen.

### **3.3.4.2 Gewinnung der polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) aus dem Blut**

Die Blutgewinnung wurde mit einem Vacutainerröhrchen mit Natrium-Heparinat als Antikoagulanzen durchgeführt. Für die Gewinnung der PMN wurden 15ml des Vollblutes 1:2 mit PBS verdünnt und in einem 50ml-Röhrchen vorsichtig über 15ml Biocoll<sup>®</sup> geschichtet. Anschließend erfolgte die Dichtegradientenzentrifugation bei 1300 x g für 30min bei 10°C ohne Bremse. Danach wurden das Plasma und die Interphase mit den mononukleären Zellen abgenommen. Im Röhrchen verblieb das Erythrozytensediment mit den eosinophilen und neutrophilen Granulozyten. Durch zweimalige hypotone Lyse konnten die roten Blutzellen entfernt werden. Das Erythrozytensediment wurde auf 10ml mit PBS (4°C) aufgefüllt und resuspendiert. Mit 20ml *Aqua dest.* (4°C) unter ständigem Schwenken lysierten die Zellen. Um den Lyseprozess zu stoppen, wurden 20ml doppelt konzentriertes PBS zugegeben. Nach Zentrifugation (220 x g; 8min; 4°C) wurde entsprechend eine zweite Lyse durchgeführt, damit noch verbliebene Erythrozyten entfernt werden konnten. Das Zellsediment wurde noch einmal in PBS aufgenommen und zentrifugiert (=Waschgang). Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Granulozyten in dem für den jeweils nachfolgenden Versuch eingesetzten Medium (PBS oder Zellkulturmedium) aufgenommen und nach Auszählung im Sysmex<sup>®</sup> auf die gewünschte Dichte ( $5 \times 10^6$  PMN/ml) eingestellt.

### **3.3.4.3 Zellzahlbestimmung der Granulozyten**

Die separierten PMN wurden mit dem Sysmex<sup>®</sup>, einem automatischen Hämatologiegerät, bestimmt. Hierfür mussten 100µl der separierten Zellsuspension in die Aufnahmeposition des Gerätes gestellt und hämatologisch gemessen werden. Der Anteil der PMN betrug jeweils >90%.

### **3.3.4.4 Durchflusszytometrie**

Mit der Durchflusszytometrie können Partikel nach Größe und Oberflächenbeschaffenheit charakterisiert werden. Bei dieser Methode werden einzelne Zellen in einem Probenführungssystem durch einen Laserstrahl geleitet. Die Probenauswertung in der vorliegenden Arbeit wurde mit dem FACScan<sup>®</sup> durchgeführt, der einen Argonlaser mit einer Lichtemission von 488nm hat. Dabei

wird gestreutes Licht in der Richtung des Laserstrahls als sogenanntes Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter, FSC) oder als Seitwärtsstreulicht (Side Scatter, SSC) erfasst. Mit der Vorwärtsstreuung werden die Partikelgröße und dessen Refraktionsindex charakterisiert. Die Seitwärtsstreuung beschreibt die Komplexität der Partikel (Oberflächenbeschaffenheit und Granularität). Die erfassten Signale werden an einen Computer weitergeleitet. Dieser speichert diese Daten und kontrolliert die Geräteeinstellungen.

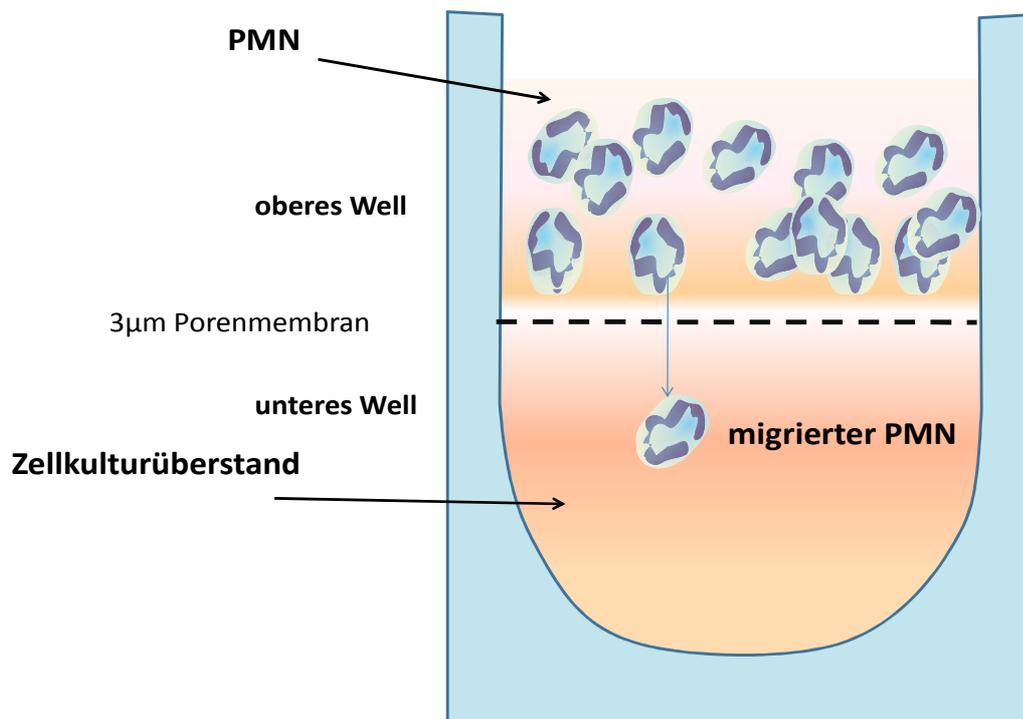
Das Gerät kann zudem eine durch den Laserstrahl verursachte Fluoreszenzinduktion in drei verschiedenen Lichtspektren erfassen: Grünfluoreszenz der Wellenlänge 515-545nm (Fluoreszenzintensität 1, FL1), Orangefluoreszenz der Wellenlänge 564-606nm (FL2) und Rotfluoreszenz mit einer Wellenlänge über 600nm (FL3). Jeder Partikel bzw. jede Zelle wird folglich durch fünf verschiedene Parameter (FSC, SSC, FL1, FL2 und FL3) charakterisiert und als Messereignis festgehalten.

Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Software FCS Express V3. Die Ergebnisse wurden mehrparametrisch als Punktediagramme (sogenannte „Dotplots“) oder als Dichtediagramme dargestellt. Für die Vergleichbarkeit wurden die Messungen der Proben jeweils bei gleichen Einstellungen („settings“) des Durchflusszytometers durchgeführt.

#### **3.3.4.5 PMN-Transmigrationsassay**

Mit der Transmigrationskammer steht eine Technik zur Verfügung, um das Migrationsverhalten der PMN *in vitro* zu testen. Die 10-Well-Transmigrationskammer besteht aus einer Acrylbodenplatte (50x101x11mm), einer Acryldeckplatte (50x101x6mm), einer Silikondichtungsmatte und 6 Schraubenmuttern. In die Bodenplatte sind 10 Rundbodenvertiefungen mit einem Fassungsvermögen von 415µl eingearbeitet, die mit den durchgehenden Bohrungen der Deckplatte korrespondieren. Beim Zusammenbau werden die Kompartimente der Acrylpatten durch eine zwischengelegte Polycarbonatmembran getrennt, die gleichzeitig den Boden der Vertiefungen der oberen Platte bildet. Die entsprechend den Bohrungen der Acrylplatte mit Löchern ausgestattete Silikonmatte wird zwischen beide Platten platziert und dient der Abdichtung. In der Bodenplatte sind entsprechende Gewindestangen verankert, die beim Zusammensetzen der Kammer durch entsprechende

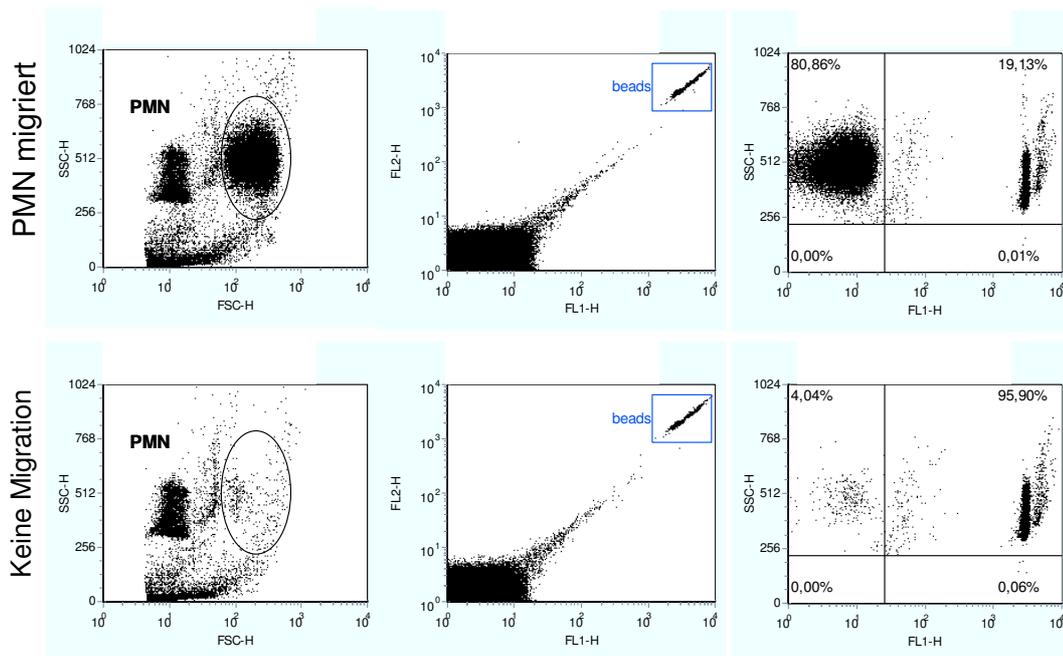
Einsparungen der Silikonmatte und der Deckplatte führen. Mit Hilfe der Schraubenmutter werden die beiden Acrylplatten mäßig fest aneinandergespresst. Angelockt von einer chemoattraktiven Substanz müssen Zellen aus der oberen Kammer aktiv durch die Poren der Polycarbonatmembran wandern, um sich in der unteren Kammer anzusammeln. Die Porengröße beträgt  $3\mu\text{m}$ . Auf einem Quadratzentimeter der Membran befinden sich  $2 \times 10^6$  Poren (siehe Abbildung 9). In der vorliegenden Arbeit wurden die unteren Wells jeweils mit  $300\mu\text{l}$  der zu testenden Zellkulturüberstände oder der Kontrollmedien beschickt und mit ca.  $130\mu\text{l}$  Percoll<sup>®</sup> unterschichtet, bis sich ein leichter Oberflächenmeniskus bildete, um zu gewährleisten, dass die Membran vollständig mit Probenflüssigkeit benetzt wurde. Die Percollschicht diente dazu, eine Adhäsion von Zellen an die Wand der Kammer zu verhindern. Das obere Kompartiment wurde mit  $200\mu\text{l}$  einer PMN-Suspension ( $5 \times 10^6$  PMN/ml) befüllt. Die Kammer wurde für 2h in einer Feuchtkammer bei  $37^\circ\text{C}$  und  $5\%$   $\text{CO}_2$  inkubiert. Anschließend wurde der Inhalt der oberen Kammer vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und verworfen.



**Abbildung 9: Schematische Darstellung der Transmigrationskammer**

Nach dem sorgsamem Abnehmen der Oberplatte, der Silikondichtung und der Polycarbonatmembran wurden nach mehrfachem Durchmischen mit der Pipette

exakt 375µl der Flüssigkeit aus der unteren Kammer in vorgekühlte und mit 125µl Zellkulturmedium ohne FKS befüllte TruCount Tubes überführt (gesamtes Probenvolumen = 500µl). Zur Quantifizierung migrierter PMN wurden die Proben mittels der in 3.3.4.4 beschriebenen Methode durchflusszytometrisch analysiert. Dabei wurden bei jeder Probe als Referenzwert 6.000 TruCount-Beads erfasst und gleichzeitig die Anzahl der PMN gemessen (siehe Abbildung 10). Alle Zellkulturüberstände wurden in Triplikaten getestet.



**Abbildung 10: Durchflusszytometrische Analyse im Rahmen des Transmigrationsassays**

Die Dotplots zeigen die messbaren Partikel (PMN und Referenzbeads) aus den unteren Wells der Transmigrationskammer nach erfolgter Migration: oben = nach Migration, unten = ohne Migration (Kontrolle). Linke Abbildung: Zellmorphologie (Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht); Mittlere Abbildung: Beads als Referenz (Grünfluoreszenz gegen Orangefluoreszenz); Rechte Abbildung: im linken oberen Quadranten sind PMN dargestellt, im rechten oberen Quadranten die Beads (Grünfluoreszenz gegen Komplexität).

### 3.3.4.6 Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) durch PMN

Für die Messung der Bildung reaktiver Sauerstoffmetaboliten durch neutrophile Granulozyten wurde eine für das Rind angepasste Methode aus dem humanen System angewandt<sup>284</sup>.

Die PMN wurden wie in 3.3.4.2 beschrieben gewonnen und standen in R10F+Medium suspendiert zur Verfügung. 100µl der Zellsuspension ( $4 \times 10^6$  Zellen/ml) wurden in jedes Well einer 96-Loch-Rundbodenmikrotiterplatte pipettiert. Anschließend wurde diese bei 350 x g für 5min bei 8°C zentrifugiert. Die Überstände wurden durch Dekantieren entfernt. Nun wurden die Zellen mit dem Restmedium in Suspension gebracht. Nun wurden die Überstände durch Dekantieren entfernt. Zellkulturüberstände aus den Stimulationsversuchen (siehe 3.3.3.2) wurde in dieser Arbeit in Triplikaten untersucht. So wurden 50µl der Zellkulturüberstände zugefügt und diese mit 100µl Percoll<sup>®</sup> unterschichtet, um Adhärenz zu verhindern. Dann wurde die Präparation im Brutschrank (30min; 37°C; 5% CO<sub>2</sub>) inkubiert. Für die Aktivierung der Zellen wurde PMA (Phorbol-Myristat-Acetat) eingesetzt. Um die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies nachzuweisen, wurde Dihydrorhodamin 123 (DHR) zugesetzt, das in Anwesenheit der Myeloperoxidase in das grünfluoreszierende Rhodamin 123 umgebaut wird. Da dieses an den Membranen der PMN haftet und sie nicht verlassen kann, sind Granulozyten mit erhöhter ROS-Bildung aufgrund ihrer verstärkten Grünfluoreszenz durchflusszytometrisch differenzierbar. Zu den in Percoll<sup>®</sup> und Kulturüberständen resuspendierten Zellen wurden 10µl eines Mix aus PMA und DHR (11,25 µg/ml DHR final) pipettiert und anschließend 10 Sekunden auf der Schüttelplatte durchmischt. Die Stimulation mit PMA erfolgte in den Konzentrationen 0, 10, 100 und 1.000 nmol/ml. Nach Inkubation über 30min (siehe oben) wurde die Reaktion durch Abkühlung der Platte auf Eis gestoppt. Nach kurzem Rütteln wurden die Proben zur Auswertung in FACS-Röhrchen mit 100µl Sheath-PJ (4°C) überführt. Im Durchflusszytometer wurden 5000 Zellen gemessen.

### 3.3.4.7 Phagozytosekapazität der PMN

Mit der Bestimmung der Phagozytosekapazität kann der Anteil der phagozytierenden Leukozyten und die mittlere Fluoreszenzintensität der Phagozytose-positiven Zellen als Maß für die Menge der phagozytierten Partikel

ermittelt werden. Die Methode für die Bestimmung der Phagozytosekapazität wurde von Zerbe (1994)<sup>285</sup> etabliert und beruht auf einer durchflusszytometrischen Zellanalyse.

Für diesen funktionellen Test wurden zunächst die PMN aus venösem Rinderblut wie in 3.3.4.2 beschrieben, separiert und in PBS aufgenommen.

Als Phagozytosepartikel wurden FITC-markierte Staphylokokken (Pansorbin<sup>®</sup>; hitzeabgetötet und formalinfixiert) verwendet. Die Bakteriensuspension (1ml,  $4 \times 10^8$  Bakterien/ml PBS) wurde nach dem Auftauen resuspendiert und bei  $11500 \times g$  für 3min bei RT zentrifugiert. Anschließend wurden die Überstände abgenommen und die Bakterien im Restvolumen mit dem Schüttler resuspendiert.

Zur Opsonisierung wurde in jedes Probengefäß 1ml gepooltes Rinderserum gegeben und nach kräftigem Mischen mittels Pipette für 30min bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

Nach Resuspension der opsonisierten Bakterien wurden 100µl ( $4 \times 10^7$  Bakterien/Well) der Suspension in jedes Well der 96-Well-Rundbodenmikrotiterplatte pipettiert. Anschließend wurde die Platte mit  $350 \times g$  für 5min bei 8°C zentrifugiert. Nachfolgend wurden die Überstände abgekippt.

Um den Einfluss der Zellkulturüberstände aus den In-vitro-Modellexperimenten zu testen, wurden nun jeweils 100µl des jeweiligen Überstandes in ein Well der Mikrotiterplatte pipettiert. Zusätzlich wurden in jedes Well 100µl der PMN-Suspension ( $2 \times 10^5$  Zellen/Well) gegeben und durchmischt. PMN und Bakterien lagen im Verhältnis 1:200 vor.

Nach Inkubation über 60min bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurden die Zellen zur Ablösung von der Oberfläche für 5min auf Eis gestellt.

Für die Messung im Durchflusszytometer wurden die Proben jeweils in ein FACS-Röhrchen überführt, in dem 100µl Sheath-PJ (4°C) vorgelegt waren. Jede Probe wurde in Triplikaten gemessen. Im Durchflusszytometer wurden pro Ansatz 5000 Zellen gemessen.

#### **3.3.4.8 CXCL8 (IL-8) ELISA**

Zur quantitativen Bestimmung der CXCL8-Konzentration wurde ein CXCL8-ELISA-Kit für humanes CXCL8 verwendet. Dieser Test wurde schon

mehrfach zum Nachweis von bovinem CXCL8 eingesetzt<sup>168,286</sup>. Es handelt sich um einen quantitativen Sandwich-ELISA mit einer Intraassayvarianz von 4,4% und einer Interassayvarianz von 8,1%. Die untere Nachweisgrenze liegt im Mittel bei 3,5 pg/ml (0-Standard + 2 SD). Der Test wurde nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

### 3.3.5 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte über Exel (MS; [www.microsoft.com](http://www.microsoft.com)) und SPSS (Version 17; [www.spss.com](http://www.spss.com)).

Für die Erstellung der Wachstumskurven wurden die Werte (in CFU/ml) logarithmiert. Zur grafischen Darstellung der Wachstumskurven wurde der Median  $\tilde{x}$  der CFU-Werte herangezogen. In der Darstellung wurde zusätzlich das 1. und 3. Quartil angegeben.

Zum Vergleich der Wachstumskurven von *E. coli*<sub>1303</sub> wurde für jede Kurve die Area under the curve (AUC) für die Zeit 0-24h nach In-vitro-Inokulation berechnet. Unterschiede zwischen den Wachstumskurven (vor und 24h, 72h sowie 240h nach „Priming“ des Versuchstieres) wurden mittels des nicht-parametrischen Kruskal-Wallis-Tests ermittelt, da die Daten nicht normal verteilt waren. Im Anschluss wurde der Mann-Whitney-U-Test eingesetzt, um die Unterschiede im Wachstumsverhalten von *E. coli*<sub>1303</sub> zwischen zwei Gruppen in Vollmilch herauszuarbeiten. Bei der Prüfung multipler Parameter auf vorhandene signifikante Unterschiede wurde zusätzlich die Bonferroni-Korrektur angewandt.

Um festzustellen, inwieweit die AUC der Wachstumskurven von der SCC der Vollmilchproben abhängig ist, erfolgte die Berechnung des Korrelationskoeffizienten (R) mittels linearer Regression.

Die Daten aus dem In-vitro-Zellmodell (Transmigration und Phagozytose) wurden ebenfalls mit den beschriebenen nicht-parametrischen Tests ausgewertet.

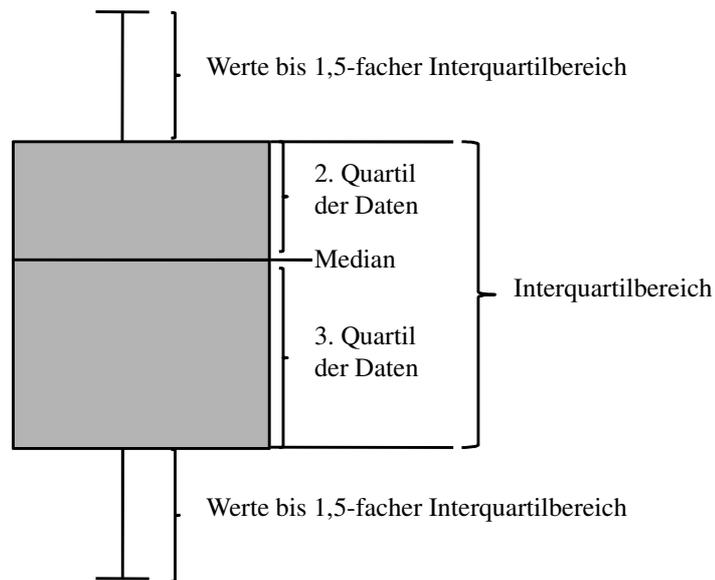
Als statistisch signifikant wurden p-Werte von  $\leq 0,05$  gewertet.

Für einige graphische Darstellungen wurden Boxplots (siehe Abbildung 11) gemäß SPSS-Definition erstellt. Als Box wird das durch das 1. und 3. Quartil bestimmte Rechteck bezeichnet. Dieses enthält 50% der Werte und seine Länge entspricht dem Interquartilbereich (IQB). Der horizontale Balken in der Box stellt

den Median dar, der durch seine Lage innerhalb der Box einen Eindruck von der Schiefe der den Daten zugrundeliegenden Verteilung vermittelt. Die „Whiskers“ (T-Balken ober- und unterhalb der Box) zeigen die Datenwerte innerhalb des 1,5-fachen Interquartilabstands. Werte außerhalb dieses Bereiches werden als Ausreißer bezeichnet, wobei milde Ausreißer mit **o** und extreme Ausreißer mit **\*** dargestellt sind.

\* Extremwert (> 3-facher Interquartilbereich)

o Extremwert (> 1,5-facher Interquartilbereich)



### Abbildung 11: Erläuterungen zum Boxplot

Dargestellt ist der Aufbau eines Boxplots mit Whiskers und Ausreißern. Die Box enthält 50% der Werte und wird durch das 1. und 3. Quartil der Daten bestimmt. Ihre Länge entspricht dem Interquartilbereich (IQB). Der horizontale Balken in der Box stellt den Median dar. Die „Whiskers“ (T-Balken ober- und unterhalb der Box) zeigen die Datenwerte innerhalb des 1,5-fachen Interquartilabstands. **o** bezeichnet Werte außerhalb des 1,5-fachen Interquartilbereichs (milde Ausreißer). **\*** bezeichnet Werte außerhalb des 3-fachen Interquartilabstandes (extreme Ausreißer).

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Einfluss einer intramammären LPS-Behandlung auf das *E. coli*-Wachstum *in vitro*

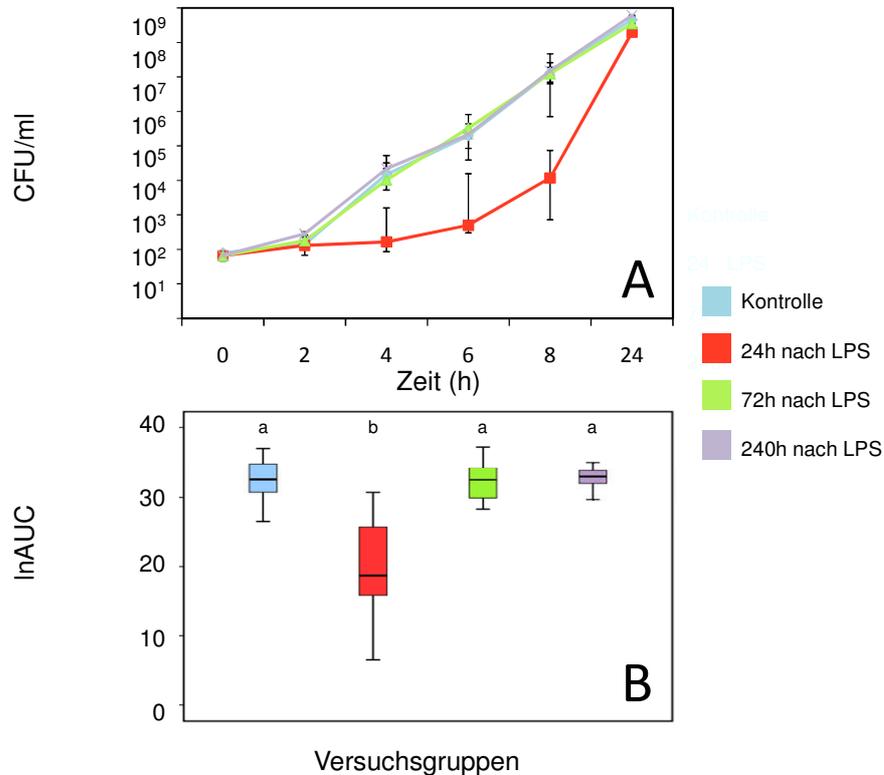
Im Tiermodell in einem Vorläuferprojekt der eigenen Arbeitsgruppe wurde eine protektive Wirkung der intramammären LPS-Vorbehandlung („Priming“) gegenüber einer nachfolgenden experimentellen *E. coli*-Infektion beobachtet. In diesem Projekt konnte gezeigt werden, dass *in vivo* noch 10 Tage nach der LPS-Vorbehandlung in nachfolgenden *E. coli*-Infektionsversuchen ein milderer klinischer Krankheitsverlauf und eine herabgesetzte Erregervermehrung zu verzeichnen waren<sup>6</sup>.

Es wurde hypothetisiert, dass diese *in vivo* beobachtete reduzierte Bakterienvermehrung nach LPS-Vorbehandlung auf einer gesteigerten wachstumshemmenden Kapazität des Milchsekretes beruht. Um dies zu prüfen, wurde die Milch der vorbehandelten Tiere in der vorliegenden Arbeit auf ihre Wachstums-modulierenden Effekte gegenüber *E. coli in vitro* geprüft. Hierfür wurde im ersten Schritt vor und unterschiedlich lange nach (24h, 72h und 240h) der intramammären Behandlung mit 1µg LPS Vollmilch steril aus einem Euterviertel gewonnen. Des Weiteren wurde aus der Vollmilchprobe jeweils eine zellfreie Magermilchpräparation hergestellt. Um den Einfluss der LPS-Vorbehandlung auf die Milcheigenschaften zu charakterisieren, wurden anschließend in den verschiedenen Milchpräparationen Wachstumskurven mit *E. coli* 1303 über 24h erstellt. Bei diesem *E. coli*-Stamm handelt es sich um denselben, der auch in den In-vivo-Experimenten eingesetzt wurde.

#### 4.1.1 Wachstum von *E. coli* in Vollmilch

Da im Tiermodell der eigenen Arbeitsgruppe beobachtet werden konnte, dass eine Vermehrung von *E. coli* bis zu 240h nach LPS-Vorbehandlung verhindert oder vermindert war<sup>6</sup>, wurde zunächst steril gewonnene Vollmilch vorbehandelter Tiere als Wachstumsmedium eingesetzt, was der Situation *in vivo* am nächsten kommt.

Ein hochsignifikanter ( $p < 0,001$ ) wachstumshemmender Effekt konnte nur mit Vollmilch 24h nach intramammärer LPS-Behandlung in einer 24-stündigen



**Abbildung 12: Wachstum von *E. coli* in Vollmilch, die nach intramammärer LPS-Vorbehandlung gewonnen wurde**

Dargestellt sind die Wachstumskurven von *E. coli* in Vollmilchpräparationen in CFU/ml (A; colony forming units/ml; Mediane  $[\bar{x}] \pm 1.$  und 3. Quartil) und die Gesamtkeimzahl als lnAUC (B; area under the curve, logarithmiert; als Boxplots) nach 24-stündiger Kultur. Die Vollmilch war vor (Kontrolle;  $n=14$ ), 24h ( $n=14$ ), 72h ( $n=14$ ) und 240h ( $n=10$ ) nach intramammärer LPS-Behandlung gewonnen worden. Unterschiedliche Buchstaben zeigen einen signifikanten Unterschied in der Gesamtkeimzahl nach Kultur mit unterschiedlichen Vollmilchpräparationen ( $p < 0,001$ ).

Kultur festgestellt werden. Im Vergleich zur Kontrolle, die vor der LPS-Infusion gewonnen worden war, war das *E. coli*-Wachstum hier um etwa 40% reduziert (siehe Abbildung 12). Dabei zeigte sich vor allem eine signifikante Verzögerung in der Wachstumsgeschwindigkeit innerhalb der ersten 8h ( $p < 0,001$ ). Nach 24-stündiger Inkubation mit dieser Präparation näherte sich die Keimzahl den vergleichsweise hohen Werten der übrigen Präparationen: der Milch unbehandelte Euterviertel (Kontrolle) sowie der 72h und 240h nach

intramammärer LPS-Behandlung gewonnenen Milch. In Vollmilch 24h nach LPS-Vorbehandlung erreichte *E. coli* eine maximale Keimzahl von  $2,62 \pm 2,74 \times 10^8$  CFU/ml (MW  $\pm$  SD). Die Werte unterschieden sich signifikant ( $p < 0,05$ ) von den Maximalwerten der Kontrolle ( $5,60 \pm 1,20 \times 10^8$  CFU/ml (MW  $\pm$  SD), jedoch nur um  $2,98 \times 10^8$  CFU/ml (siehe Abbildung 12 A).

Das Wachstum von *E. coli* in der Vollmilch, die 72h und 240h nach LPS-Infusion gewonnen wurde, unterschied sich in der 24h-Kultur nicht von der Kontrolle (siehe Abbildung 12 und Tabelle 5).

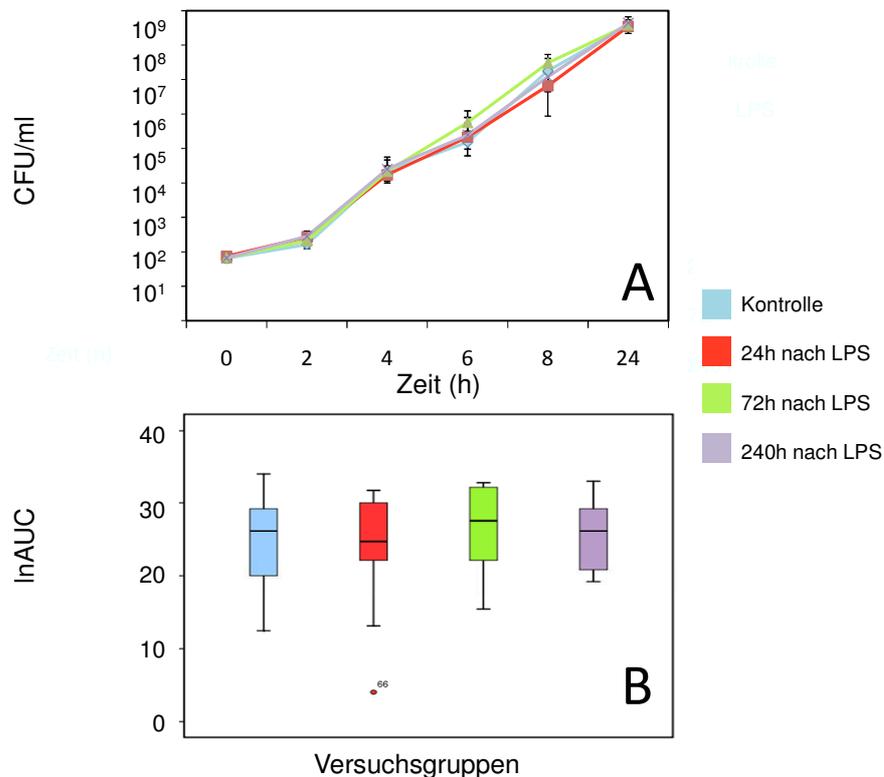
**Tabelle 5: Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Wachstumskurven von *E. coli* nach intramammärer LPS-Behandlung (Kurve berechnet zwischen 0 und 24 h nach In-vitro-Inokulation).**

Medium	Kruskal-Wallis-Test (AUC aller Wachstumskurven)	Mann-Whitney-Test (AUC einzelner Wachstumskurven)	
Vollmilch	p < 0,001	0h↔24h	p < 0,001
		0h↔72h	p = 0,818
		0h↔240h	p = 0,860
		24h↔72h	p < 0,001
		24h↔240h	p < 0,001
		72h↔240h	p = 0,639

Zur Darstellung von statistisch sicherbaren Unterschieden wurde im ersten Schritt die AUC für alle vier LPS-Vorbehandlungsgruppen aus der Zeit 0h und 24h nach In-vitro-Inokulation von *E. coli* berechnet. Im nächsten Schritt wurden diese mit dem parameterfreien Kruskal-Wallis-Test geprüft. Anschließend wurde mit dem Mann-Whitney-Test die statistische Signifikanz zwischen den AUC der Wachstumskurven der einzelnen LPS-Vorbehandlungsgruppen paarweise ermittelt.

### 4.1.2 Wachstum von *E. coli* in zellfreier Magermilch

Hinweise auf antimikrobielle, nicht-zelluläre Milchhaltsstoffe sind in der Literatur weit verbreitet. So ist die Milchdrüsenepithelzelle nach Kontakt mit LPS z.B. in der Lage, Defensine<sup>8</sup> und Laktoferrin<sup>7</sup> zu synthetisieren. Um zu überprüfen, ob es sich bei dem unter 4.1.1 beobachteten wachstumshemmenden Effekt um zelluläre oder humorale Effekte handelt, wurde das Gemelk Zelldepletiert und die gewonnene Magermilch als Wachstumsmedium für *E. coli* eingesetzt.



**Abbildung 13: Wachstum von *E. coli* in zellfreier Magermilch, die nach intramammärer LPS-Vorbehandlung gewonnen wurde**

Dargestellt sind die Wachstumskurven von *E. coli* in zellfreier Magermilch in CFU/ml (A; colony forming units/ml; Mediane  $[\bar{x}] \pm 1.$  und 3. Quartil) und die Gesamtkeimzahl als lnAUC (B; area under the curve, logarithmiert; als Boxplots) nach 24-stündiger Kultur. Die zellfreien Magermilchpräparationen waren aus Vollmilch vor (Kontrolle; n=14), 24h (n=14), 72h (n=14) und 240h (n=10) nach intramammärer LPS-Behandlung hergestellt worden.

*In vitro* konnte durch zellfreie Magermilch, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten

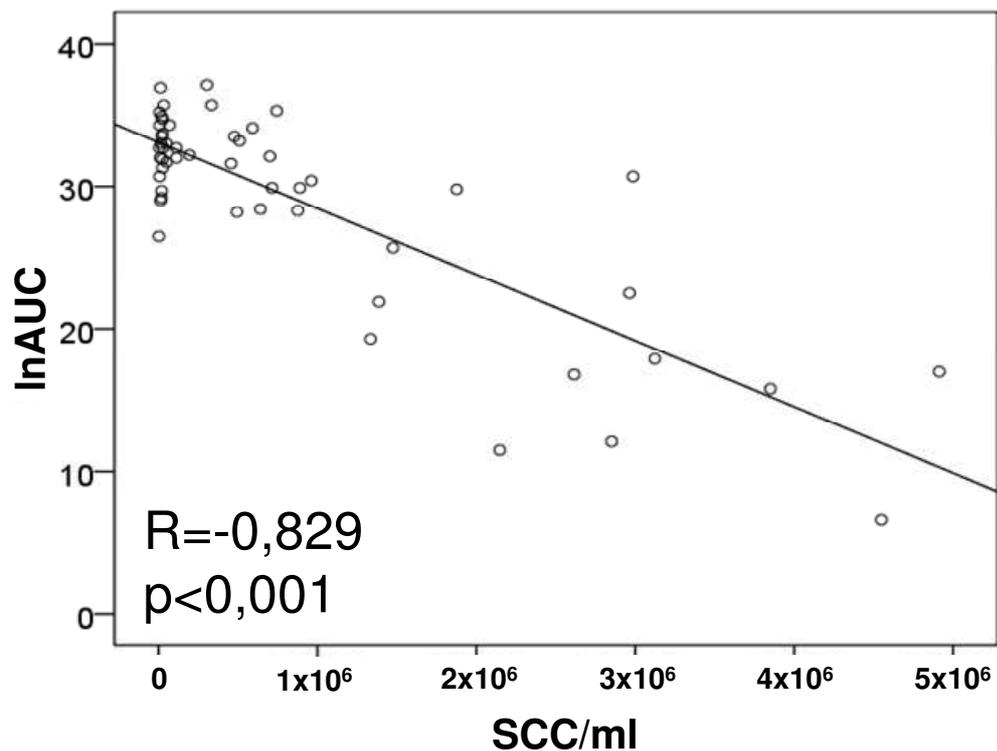
nach der intramammären LPS-Behandlung gewonnen worden war, kein deutlicher wachstumshemmender Effekt gegenüber *E. coli* festgestellt werden. Lediglich 24h nach LPS-Priming zeigte sich eine Tendenz zur Wachstumshemmung gegenüber *E. coli* in der zellfreien Magermilch, die jedoch nicht statistisch gesichert werden konnte ( $p=0,086$ ) (siehe Abbildung 13).

#### **4.1.3 Einfluss der Somatischen Zellzahl der Milch (SCC) auf das Wachstum von *E. coli* *in vitro***

Aufgrund der unter 4.1.1 gezeigten Daten lag die Vermutung nahe, dass es sich bei den wachstumshemmenden Effekten in der Vollmilch LPS-vorbehandelter Kühe um einen Zell-vermittelten Mechanismus handelt. Mittels Korrelationsanalyse wurde der Zusammenhang zwischen der somatischen Zellzahl (SCC; engl.: somatic cell count) der Milch und der Dynamik des bakteriellen Wachstums ermittelt. Letztere wurde über die AUC der logarithmierten Keimzahlen (in CFU/ml) aus den Wachstumskurven bestimmt.

Der SCC in den Milchproben war 24h nach der intramammären LPS-Infusion mit  $3 \pm 1 \times 10^6$  SCC/ml (MW  $\pm$  SD; n=14) am höchsten und sank 72h nach „LPS-Priming“ auf  $565 \pm 230 \times 10^3$  SCC/ml (MW  $\pm$  SD; n=14). 240h nach der intramammären LPS-Behandlung lag der SCC nur noch bei  $42 \pm 30 \times 10^3$  SCC/ml (MW  $\pm$  SD; n=10). Hier hatten sich die Werte wieder auf ein Niveau der Ursprungswerte vor der LPS-Behandlung von  $27 \pm 49 \times 10^3$  SCC/ml (MW  $\pm$  SD; n=14) einnivelliert.

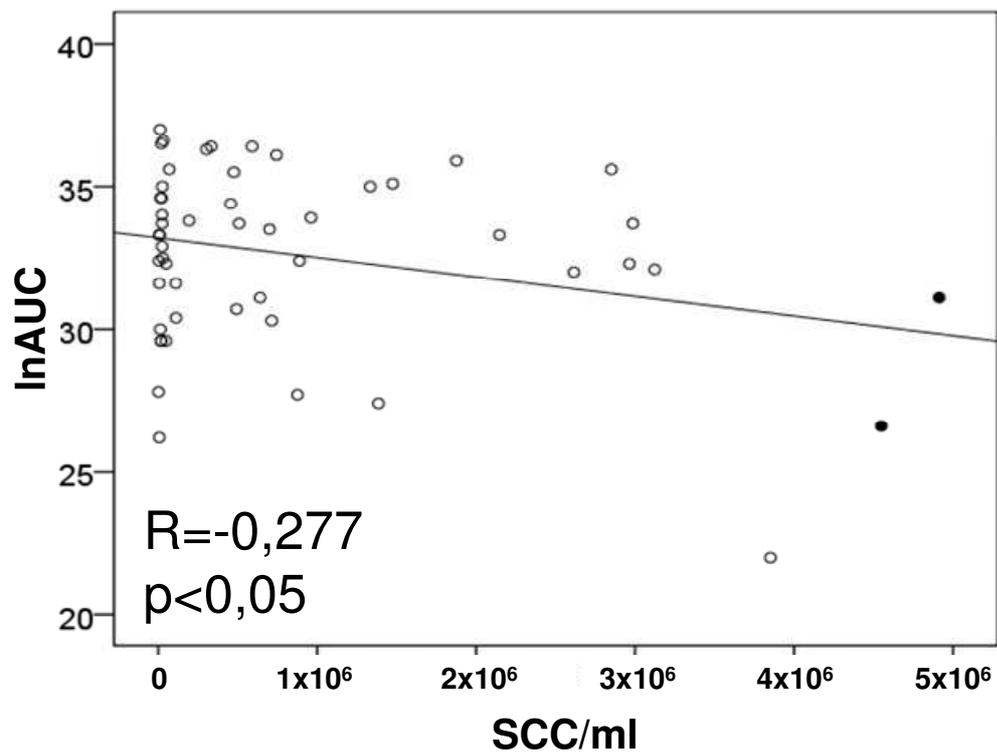
In den Vollmilchproben zeichnete sich eine starke negative Korrelation ( $R=-0,829$ ) zwischen dem SCC und der AUC ab. Mit steigendem SCC nahm das Bakterienwachstum signifikant ab ( $p<0,001$ ; siehe Abbildung 14).



**Abbildung 14: Zusammenhang zwischen Somatischer Zellzahl und *E. coli*-Wachstum in Vollmilch**

In die Korrelation gingen alle Daten der *E. coli*-Wachstumskurven ein, die vor und nach LPS-Behandlung von 14 Kühen in Vollmilch erstellt wurden. Die Keimzahlen sind als lnAUC (area under the curve, logarithmiert) dargestellt. Diese wurden mit den zugehörigen SCC-Werten (Somatische Zellzahl/ml) der entsprechenden Vollmilchpräparationen ins Verhältnis gesetzt (n=52).

Bei den *E. coli*-Wachstumsexperimenten mit zellfreier Magermilch war nur eine schwache negative Korrelation ( $R = -0,277$ ) zwischen dem SCC des Gemelks vor der Zell-Depletion und der AUC festzustellen (siehe Abbildung 15). Dies war durch zwei Werte mit einer Zellzahl von mehr als  $4 \times 10^6$  SCC/ml bedingt. Bei Ausschluss dieser beiden Messpunkte (●) bestand keine Korrelation mehr zwischen dem SCC und der lnAUC in zellfreier Magermilch ( $R = -0,063$ ).



**Abbildung 15: Zusammenhang zwischen Somatischer Zellzahl und *E. coli*-Wachstum in zellfreier Magermilch.**

In die Korrelation gingen alle Daten der *E. coli*-Wachstumskurven ein, die vor und nach LPS-Behandlung von 14 Kühen in zellfreier Magermilch erstellt wurden. Die Keimzahlen sind als lnAUC (area under the curve, logarithmiert) dargestellt. Diese wurden mit den zugehörigen SCC-Werten (Somatische Zellzahl/ml; vor der Zell-Depletion) der entsprechenden zellfreien Magermilchpräparationen ins Verhältnis gesetzt (n=52).

## **4.2 Etablierung eines In-vitro-Entzündungsmodells zur Untersuchung der LPS-Toleranz in der bovinen Milchdrüsenepithelzelle**

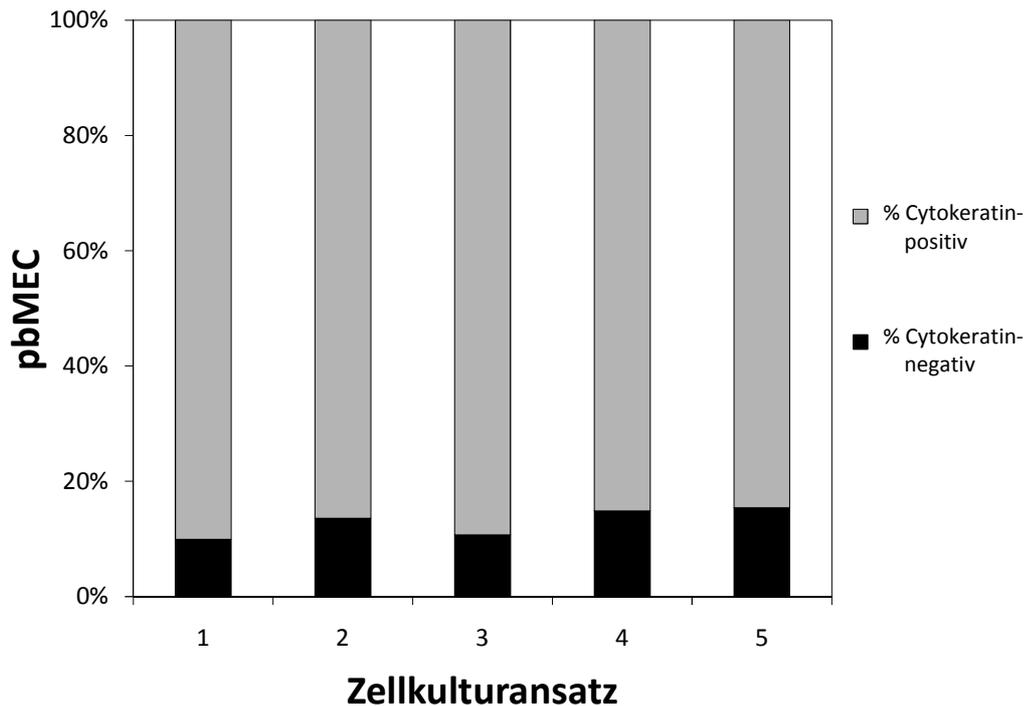
Ein Kernpunkt der vorliegenden Arbeit war die Etablierung eines In-vitro-Entzündungsmodells, mit dem das Phänomen der LPS-Toleranz an der Milchdrüsenepithelzelle (MEC) untersucht werden konnte. Die Stimulationsversuche wurden vergleichend mit primären Milchdrüsenepithelzellen (pbMEC) und einer etablierten permanenten bovinen Zelllinie (MAC-T) durchgeführt. Hintergrund der nachfolgenden Experimente war die Überlegung, dass bei der LPS-Toleranz *in vivo* die Synthese proinflammatorischer, auch chemoattraktiver Mediatoren und damit die Rekrutierung von PMN ins Entzündungsgebiet herabgesetzt sind. Deshalb wurden die Kulturüberstände aus den Zellkulturansätzen anschließend in einer In-vitro-Transmigrationskammer zur Prüfung des Chemotaxisverhaltens von PMN eingesetzt.

### **4.2.1 Methodische Vorarbeiten**

#### **4.2.1.1 Reinheit des pbMEC-Kultursystems**

Für die Standardisierung und die Qualitätssicherung des In-vitro-Entzündungsmodells war es notwendig, die im Versuch eingesetzten primären bovinen MEC (pbMEC) in Hinblick auf Reinheit und Vitalität zu prüfen.

Bei der Präparation des Eutergewebes zur Gewinnung der pbMEC wurden neben der pbMEC zu einem gewissen Anteil auch andere Zellen, vor allem Fibroblasten, durch den Verdauungsprozess herausgelöst. Die notwendige Aufreinigung der pbMEC erfolgte erst bei der Kultivierung, durch Ablösen der Bindegewebszellen mittels Trypsin. Da die optische Beurteilung von pbMEC keine sichere Aussage bezüglich ihrer Reinheit geben kann, wurden die Zellen exemplarisch aus fünf unterschiedlichen Kulturplatten an unterschiedlichen Versuchstagen zu Versuchsbeginn abgelöst und auf ihre Reinheit überprüft. Hierzu wurde der Anteil der Epithelzellen durchflusszytometrisch über die Bestimmung der Cytokeratin (Zellgerüstbestandteil von Epithelzellen)-positiven Zellen ermittelt. Der Anteil der Zellen, die nach Fixation den fluoreszenzmarkierten Anti-Cytokeratin-Antikörperbanden, betrug  $87,09\% \pm 2,46$  (MW  $\pm$  SD; n=5; siehe auch Abbildung 16).



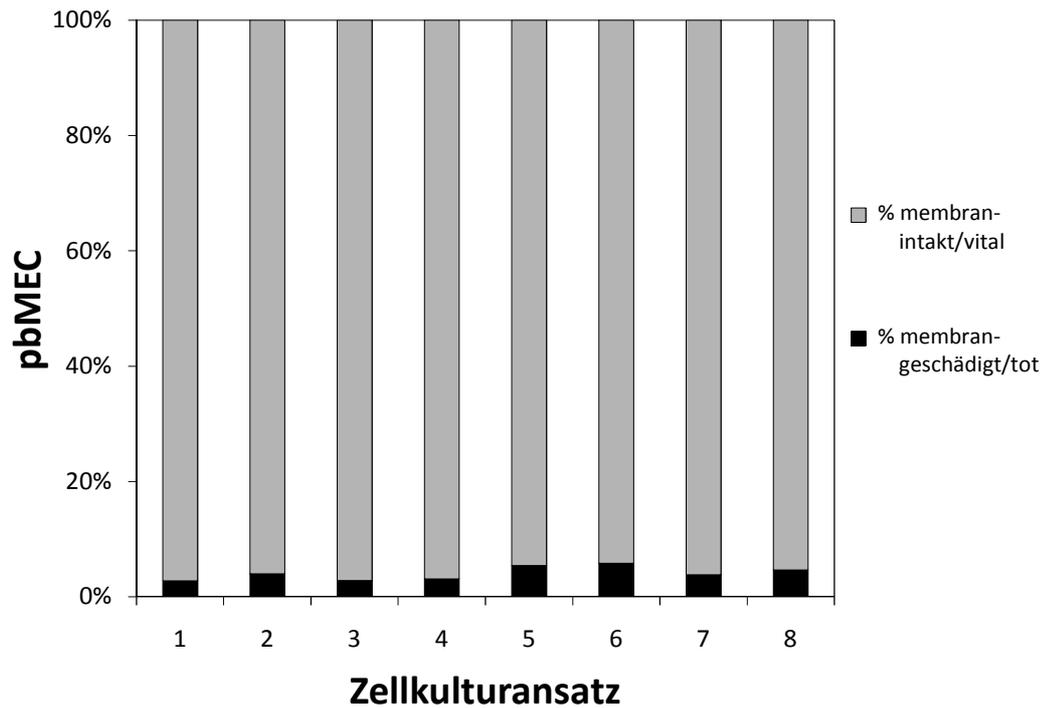
**Abbildung 16: Anteil Cytokeratin-positiver Kulturzellen**

Dargestellt als Säulendiagramme ist der prozentuale Anteil Cytokeratin-positiver Kulturzellen nach Aufreinigung der pbMEC mittels Trypsinierung.

#### 4.2.1.2 Vitalitätsnachweis der Kulturzellen

Sowohl die pbMEC als auch die MAC-T wurden nach Abschluss der Stimulationsversuche auf ihre Vitalität geprüft. Da die LPS-Stimulation der Zellen unter serumfreien Bedingungen erfolgte, war es zwingend notwendig, eine negative Auswirkung dieser Kulturphase auszuschließen. Nach Gewinnung der Kulturüberstände wurden die Zellen mit Trypsin von der Kulturplatte gelöst, mit Propidiumjodid und Sybr<sup>®</sup> 14 gefärbt (siehe 3.3.2.8) und im Durchflusszytometer analysiert.

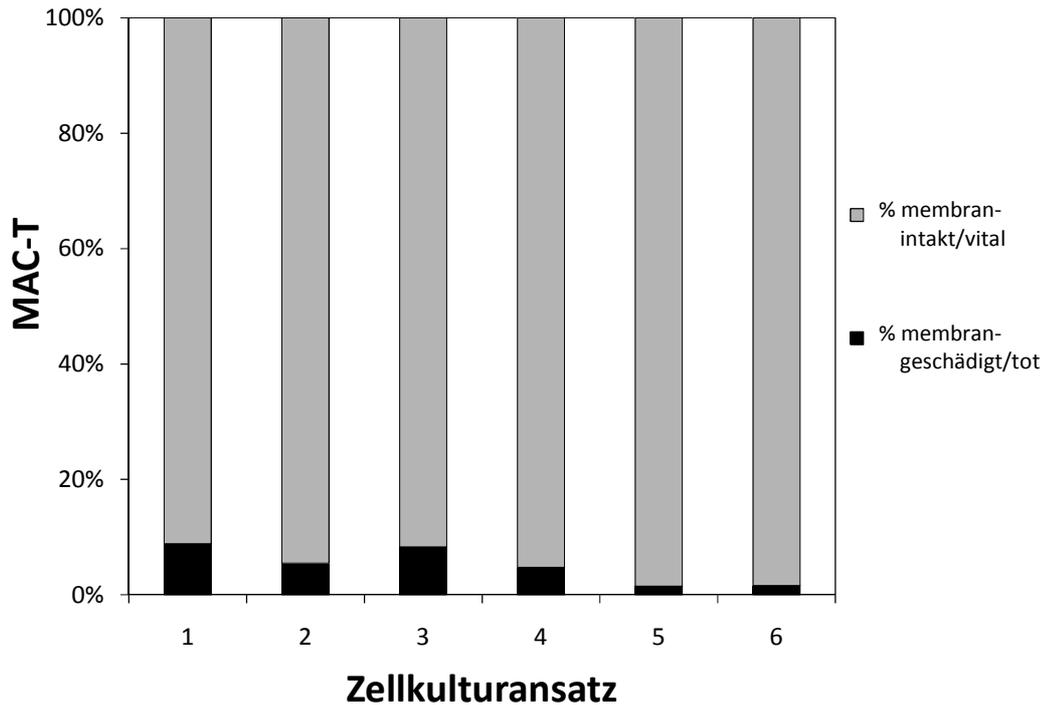
Der Anteil lebender, nicht membrangeschädigter pbMEC betrug zum Versuchsende  $96\% \pm 1,16$  (MW  $\pm$  SD) (siehe Abbildung 17). Exemplarisch wurden die Zellen aus 8 Wells (n=8) der 6-Well-Kulturplatten an unterschiedlichen Versuchstagen nach der 2. LPS-Stimulation gewonnen und auf ihre Vitalität getestet. Die Zellen waren hierbei insgesamt 10 Tage in Kultur gewesen.



**Abbildung 17: Vitalität der pbMEC am Ende von LPS-Stimulationsexperimenten**

Dargestellt als Säulendiagramme ist der prozentuale Anteil vitaler, nicht membrangeschädigter pbMEC nach Kultivierung und zweimaliger LPS-Stimulation. Nach Anfärbung mit Propidiumjodid und Sybr<sup>®</sup> 14 zeigten sich 96% vitale und membranintakte pbMEC und 4% tote oder membrangeschädigte pbMEC.

Nach Abschluss der LPS-Stimulationsversuche mit der MAC-T lag der Anteil an lebenden, nicht membrangeschädigten Zellen bei  $94,9\% \pm 3,16$  (MW  $\pm$  SD; n=6) (siehe Abbildung 18). Die Kulturzeit der Zellen betrug inklusive der LPS-Stimulationsphase hierbei 10 Tage.



**Abbildung 18: Vitalität der MAC-T am Ende von LPS-Stimulationsexperimenten**

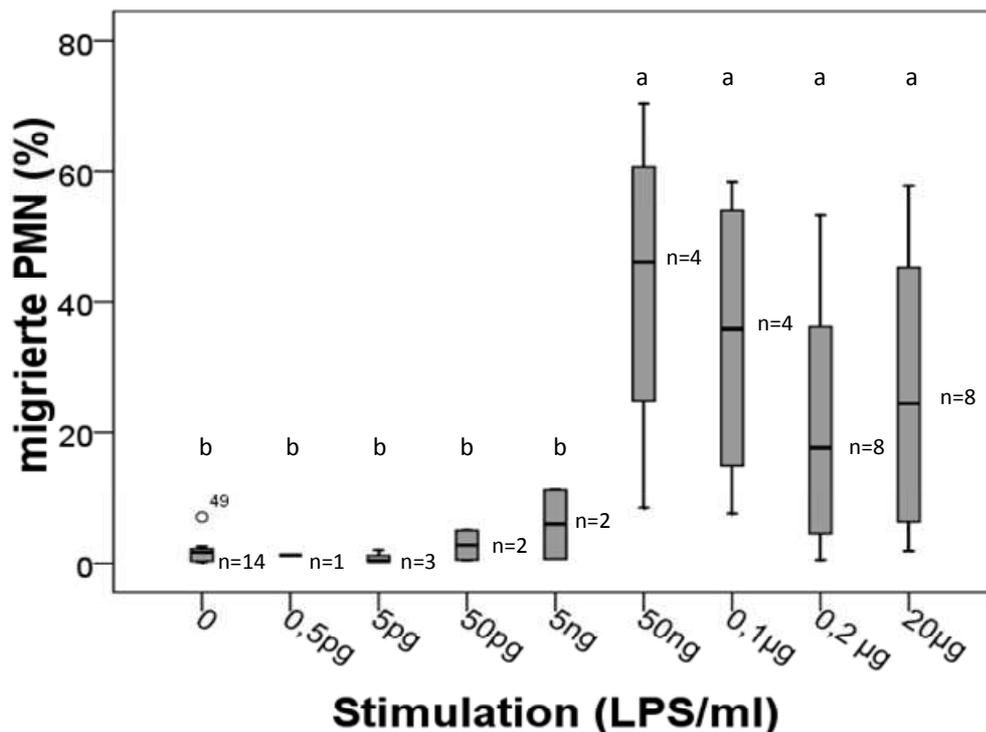
Dargestellt als Säulendiagramme ist der prozentuale Anteil vitaler, nicht membrangeschädigter MAC-T nach Kultivierung und zweimaliger LPS-Stimulation. Nach Anfärbung mit Propidiumjodid und Sybr<sup>®</sup> 14 zeigten sich 94,9 % vitale und membranintakte pbMEC und 5,1 % tote oder membrangeschädigte pbMEC.

#### 4.2.1.3 Ermittlung der wirksamen LPS-Dosis bei pbMEC und MAC-T zur Chemotaxisinduktion bei PMN

Für die Induktion einer LPS-Toleranz in pbMEC und MAC-T *in vitro* war es zunächst notwendig, eine wirksame Dosierung von LPS für die Stimulation der Zellen einzugrenzen. Hierfür wurden Verdünnungsreihen mit LPS eingesetzt, um zu prüfen, ab welcher Dosierung die pbMEC und MAC-T chemoattraktive Faktoren in das Kulturmedium abgeben. Anschließend sollten die Zellkulturüberstände in einer Transmigrationskammer funktionell auf ihre anlockende Wirkung gegenüber neutrophilen Granulozyten (PMN) geprüft werden.

Nach Stimulation der pbMEC über 14h mit unterschiedlichen

LPS-Konzentrationen waren chemoattraktive Faktoren in den Zellkulturüberständen funktionell nachweisbar. Am deutlichsten zeigten sich diese in einer Konzentration von  $0,05\mu\text{g/ml}$  bis  $20\mu\text{g/ml}$  (siehe Abbildung 19). Bei einer geringeren Stimulationsdosis von  $0,5\text{pg/ml}$  bis  $5\text{ng/ml}$  LPS zeigten die Zellkulturüberstände nach gleicher Stimulationsdauer keine statistisch signifikanten Unterschiede zur Medium-Kontrolle (ohne LPS). Jedoch war ab  $50\text{pg/ml}$  LPS ein leichter statistisch nicht signifikanter Anstieg der PMN-Transmigrationsrate zu beobachten (siehe Abbildung 19).

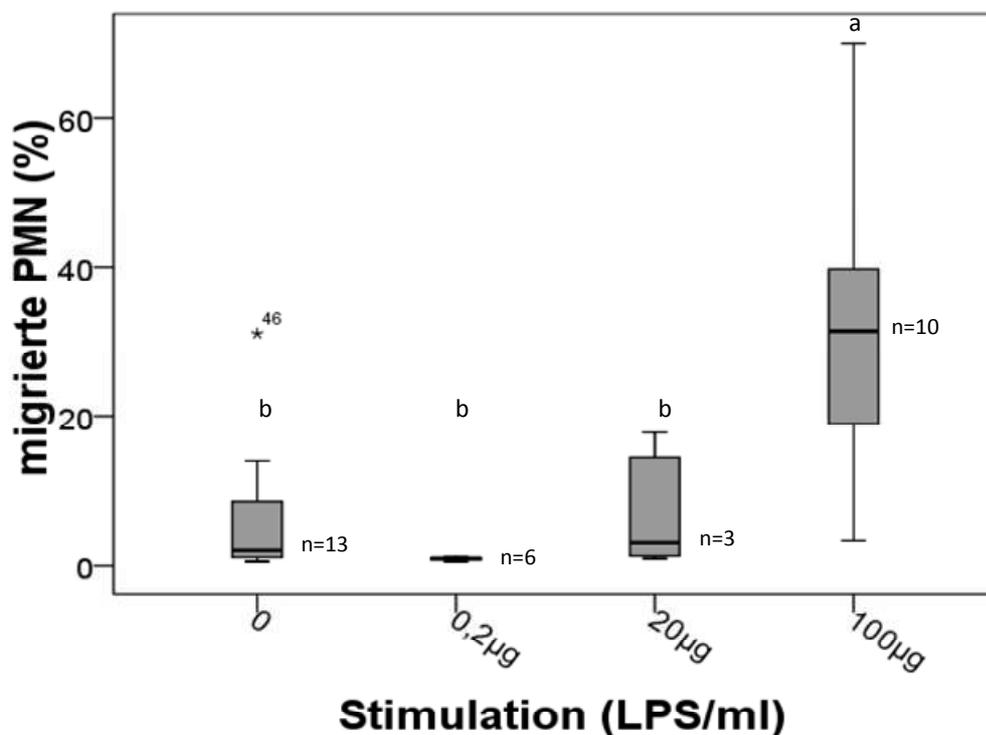


**Abbildung 19: Einfluss der LPS-Konzentration auf die Bildung chemoattraktiver Faktoren durch die pbMEC**

Dargestellt als Boxplots ist der prozentuale Anteil migrierter PMN auf Zellkulturüberstände LPS-stimulierter pbMEC ( $0,1\mu\text{g/ml}$  IL-8 ist Positivkontrolle=100%). LPS-Konzentrationen mit unterschiedlichen Buchstaben (a, b) unterscheiden sich jeweils signifikant ( $p < 0,05$ ).

Um die Eignung der immortalisierten MAC-T zu prüfen, wurden zunächst LPS-Stimulationsversuche zur Dosisfindung für diese Zelle durchgeführt. Auch in den Zellkulturüberständen der MAC-T waren *in vitro* nach einer 14-stündigen

LPS-Stimulation chemoattraktive Faktoren funktionell nachweisbar. Die Dosis-Wirkungs-Versuche zeigten, dass für die MAC-T deutlich höhere Konzentrationen an LPS erforderlich waren, um die Produktion chemoattraktiver Faktoren anzuregen. Erst die Stimulation mit einer Konzentration von 100µg/ml LPS führte im Vergleich zur Medium-Kontrolle (ohne LPS) zu einer signifikanten Migration der PMN ( $p < 0,001$ ). Eine geringere Stimulationsdosis (0,2µg/ml und 20µg/ml LPS) bewirkte keine gesteigerte Sekretion chemoattraktiver Faktoren gegenüber der Kontrolle. Zwischen der Stimulation mit 0,2µg/ml und 20µg/ml konnte lediglich eine tendenziell höhere PMN-Transmigrationsrate bei steigender LPS-Konzentration beobachtet werden, die jedoch statistisch nicht zu sichern war (siehe Abbildung 20).



**Abbildung 20: Einfluss der LPS-Konzentration auf die Bildung chemoattraktiver Faktoren durch die MAC-T**

Dargestellt als Boxplots ist der prozentuale Anteil migrierter PMN auf Zellkulturüberstände LPS-stimulierter MAC-T (0,1µg/ml IL-8 ist Positivkontrolle=100%). LPS-Konzentrationen mit unterschiedlichen Buchstaben (a, b) unterscheiden sich jeweils signifikant ( $p < 0,001$ ).

#### 4.2.1.4 CXCL8 (IL-8)-Nachweis in Zellkulturüberständen LPS-stimulierter pbMEC

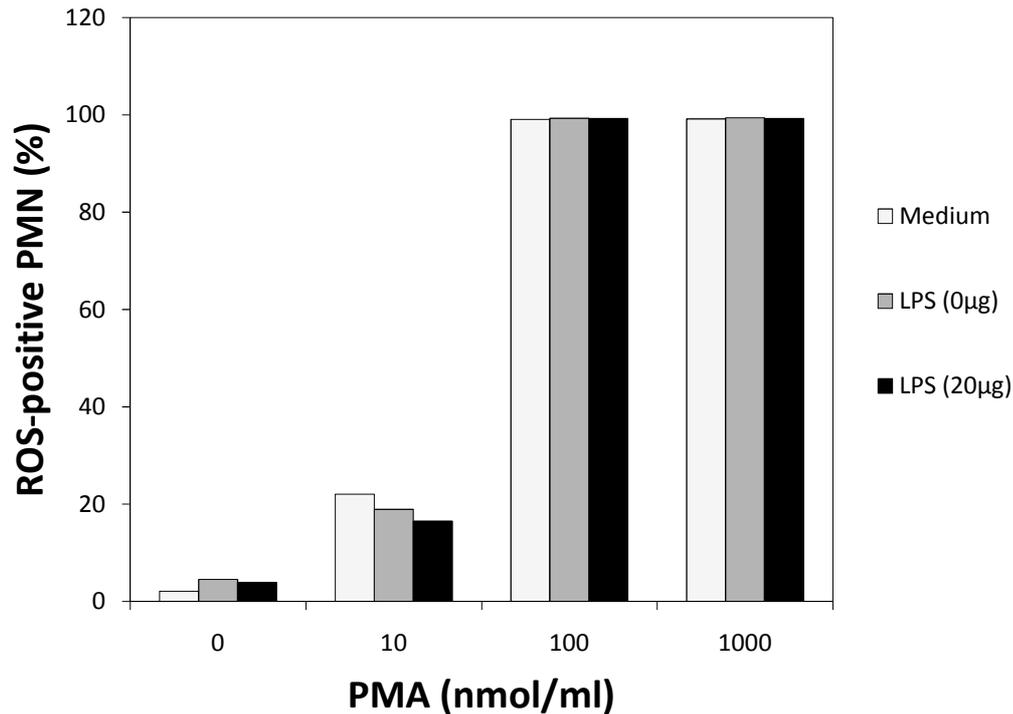
Die Stimulation der pbMEC und der MAC-T mit LPS bewirkte bei beiden Zelltypen die Synthese und Sekretion von Chemokinen (siehe 4.2.1.3). CXCL8 ist ein potentes Chemokin, welches nachweislich von der MEC exprimiert werden kann<sup>8</sup>. In Ermangelung geeigneter Rinder-spezifischer Testsysteme sollten die gewonnenen Zellkulturüberstände in einem parallelen Ansatz mittels eines humanen CXCL8 ELISA geprüft werden. Dieser ELISA wurde bereits erfolgreich im bovinen System eingesetzt, weist jedoch eine deutlich schwächere Sensitivität auf als bekannte, nicht kommerziell erhältliche bovine Testsysteme<sup>69</sup>. Eingesetzt wurden unverdünnte Kulturüberstände (siehe Tabelle 6). In keinem der Zellkulturüberstände aus den Stimulationsversuchen konnte CXCL8 mit dem humanen Testkit nachgewiesen werden. Die höchste gemessene Konzentration lag im Bereich der unteren Nachweisgrenze und entstammte einem unstimulierten Versuchsansatz (siehe Tabelle 6).

**Tabelle 6: CXCL8-Konzentrationen in Zellkulturüberständen LPS-stimulierter MEC**

Zellkultursystem	LPS ( $\mu\text{g/ml}$ )	CXCL8 ( $\text{pg/ml}$ )
pbMEC	20	1,34
pbMEC	0,05	0
pbMEC	0	4,03
MAC-T	100	1,34

#### 4.2.1.5 Einfluss LPS-stimulierter MEC auf die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) durch PMN

Eine zentrale antibakterielle Funktion der PMN ist die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS, engl.: reactive oxygen species). Diese können sowohl intra- als auch extrazellulär Erreger abtöten. Inwieweit die LPS-Stimulation der MEC indirekt über Zellkulturüberstände eine Veränderung der ROS-Bildung durch PMN bewirkt, wurde *in vitro* untersucht.



**Abbildung 21: Einfluss LPS-stimulierter pbMEC auf die ROS-Bildung boviner PMN**

Dargestellt ist der prozentuale Anteil ROS-positiver PMN nach Koinkubation mit Zellkulturüberständen LPS-stimulierter und nicht-stimulierter pbMEC. Die jeweilige PMA-Konzentration, die zur Aktivierung der PMN eingesetzt wurde, ist auf der X-Achse angegeben. Als Kontrolle wurde Medium ohne vorherigen Zellkontakt verwendet (n=1).

Um den Einfluss einer LPS-Stimulation der MEC auf die Bildung von ROS zu prüfen, wurden aus venösem Blut separierte PMN mit Zellkulturüberständen stimulierter MEC koinkubiert. Zur Aktivierung der PMN wurde PMA (Phorbol-Myristat-Acetat) eingesetzt. Über die enzymatische Spaltung des zugesetzten Dihydrorhodamin 123 (DHR) durch die Myeloperoxidase in grünfluoreszierendes Rhodamin 132 konnte die ROS-Bildung der PMN durchflusszytometrisch erfasst werden. ROS-positive PMN sind durch ihre erhöhte Grünfluoreszenz detektierbar. In einem orientierenden Vorversuch sollte zunächst geprüft werden, ob Überstände LPS stimulierter MEC in der Lage sind, die ROS-Bildung in PMN zu modulieren. Hierzu wurden Zellkulturüberstände aus Stimulationsansätzen gewählt, die nachweislich eine chemotaktische Wirkung auf PMN gezeigt hatten. Alle Zellkulturüberstände wurden in Triplikaten geprüft. Die

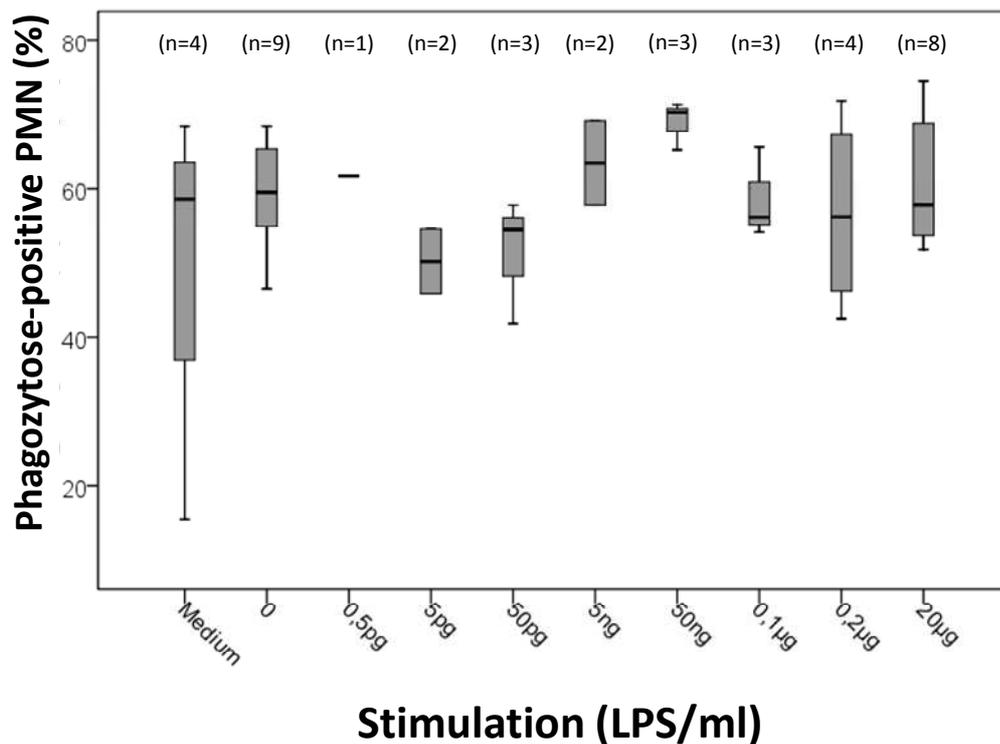
ROS-Bildung stieg erwartungsgemäß mit steigender PMA-Konzentration (siehe Abbildung 21) jedoch konnte kein Unterschied zwischen reinem Zellkulturmedium und Überständen stimulierter und nichtstimulierter Ansätze gezeigt werden (siehe Abbildung 21). Das gleiche Bild zeigte sich nach Prüfung von Zellkulturüberständen stimulierter und nicht stimulierter MAC-T (Daten nicht gezeigt). Aufgrund der mangelnden Unterschiede zwischen den Stimulationsansätzen wurde im Weiteren darauf verzichtet, die Induktion einer Endotoxintoleranz anhand der ROS-Bildung zu prüfen.

#### **4.2.2 Einfluss LPS-stimulierter MEC auf die Phagozytosekapazität von PMN**

Neben der Fähigkeit, auf einen chemotaktischen Reiz hin in infiziertes Gewebe einzuwandern, ist die Phagozytose von Pathogenen eine weitere bedeutende Zellfunktion der PMN. Inwiefern die Stimulation der MEC mit LPS indirekt eine Steigerung der Phagozytosekapazität neutrophiler Granulozyten vermittelt, wurde *in vitro* geprüft. Hierfür wurden Zellkulturüberstände aus Stimulationsversuchen der pbMEC funktionell auf das Vorhandensein von Faktoren getestet, welche die Phagozytosefähigkeit der PMN beeinflussen. FITC-markierte Staphylokokken wurden nach Opsonisierung mit gepooltem Rinderserum für 30min mit PMN koinkubiert. Phagozytose-positive PMN waren anhand ihrer erhöhten Grünfluoreszenz detektierbar (siehe 3.3.4.7).

##### ***pbMEC-vermittelter Einfluss auf die Phagozytosekapazität boviner PMN***

Zellkulturüberstände aus LPS-Stimulationsversuchen der pbMEC zeigten keine indirekten Effekte auf die Phagozytosekapazität boviner PMN. Einerseits konnten zwischen den Zellkulturüberständen LPS-stimulierter wie nicht-stimulierter pbMEC keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich ihrer Auswirkungen auf die Phagozytosekapazität von PMN festgestellt werden. Andererseits waren auch keine LPS-Dosis-Effekte erkennbar (siehe Abbildung 22).

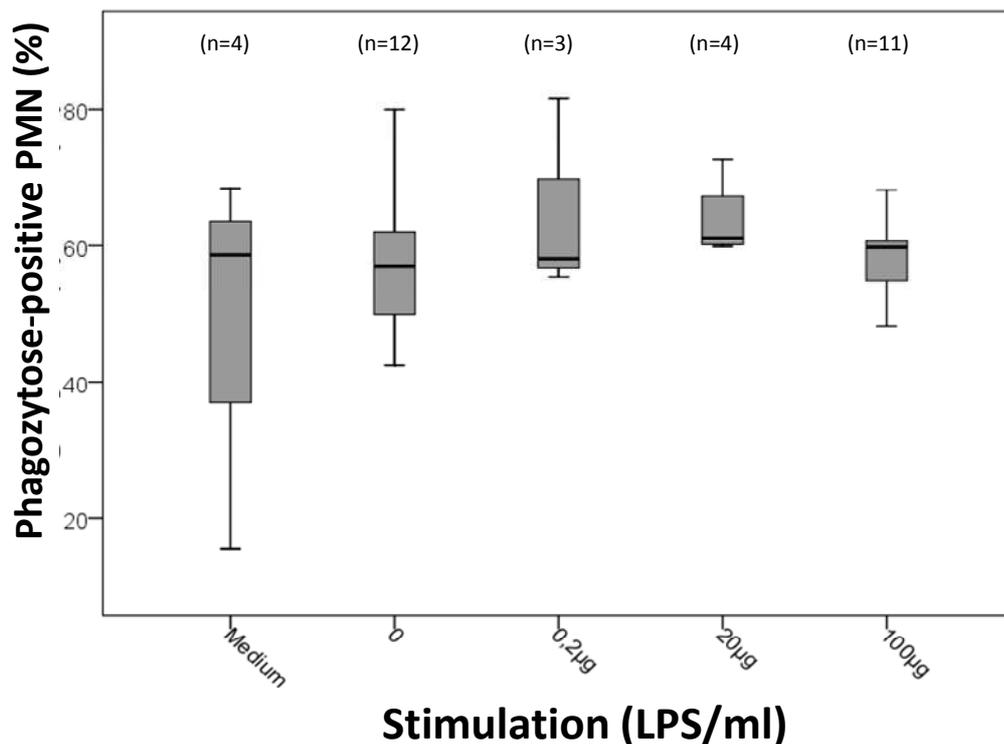


**Abbildung 22: Einfluss LPS-stimulierter pbMEC auf die Phagozytosekapazität boviner PMN**

Dargestellt als Boxplots ist der prozentuale Anteil phagozytischer PMN (%) nach Inkubation mit Zellkulturüberständen LPS-stimulierter pbMEC. Die jeweilige LPS-Konzentration, die zur Stimulation der pbMEC eingesetzt wurde, ist auf der X-Achse angegeben. Als Kontrolle im Phagozytoseversuch wurde Medium ohne vorherigen Zellkontakt verwendet.

#### ***MAC-T-vermittelter Einfluss auf die Phagozytosekapazität boviner PMN***

Die Prüfung der Zellkulturüberstände aus Stimulationsversuchen mit der MAC-T zeigte, dass wie bei der pbMEC ebenfalls keine Effekte auf die Phagozytosekapazität boviner PMN nachzuweisen sind. Zwischen den Zellkulturüberständen LPS-stimulierter wie nicht-stimulierter MAC-T konnten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich ihrer Auswirkungen auf die Phagozytosekapazität von PMN gefunden werden. Auch die unterschiedlichen LPS-Konzentrationen ließen keinen Effekt erkennen (siehe Abbildung 23).



**Abbildung 23: Einfluss LPS-stimulierter MAC-T auf die Phagozytosekapazität boviner PMN**

Dargestellt als Boxplots ist der prozentuale Anteil phagozytischer PMN (%) nach Inkubation mit Zellkulturüberständen LPS-stimulierter MAC-T. Die jeweilige LPS-Konzentration, die zur Stimulation der MAC-T eingesetzt wurde, ist auf der X-Achse angegeben. Als Kontrolle im Phagozytoseversuch wurde Medium ohne vorherigen Zellkontakt verwendet.

#### 4.2.3 Induktion einer LPS-Toleranz in Milchdrüsenepithelzellen *in vitro*

Für die *E. coli*-Mastitis des Rindes wurde im Tiermodell gezeigt, dass die intramammäre LPS-Vorbehandlung („LPS-Priming“) den Verlauf einer nachfolgenden experimentellen Infektion mit *E. coli* im Sinne einer abgemilderten Entzündungsreaktion beeinflusst<sup>6</sup>. Kernpunkt der vorliegenden Arbeit war es herauszufinden, inwieweit die MEC eine Toleranz gegenüber LPS entwickeln kann. Um dies zu prüfen, wurde ein In-vitro-Entzündungsmodell entwickelt, bei dem die MEC wiederholt mit LPS stimuliert wurde. Durch den funktionellen Vergleich LPS-vorbehandelter und nicht-vorbehandelter Zellen stand ein Modell zur Verfügung, durch das eine induzierte LPS-Toleranz bei der

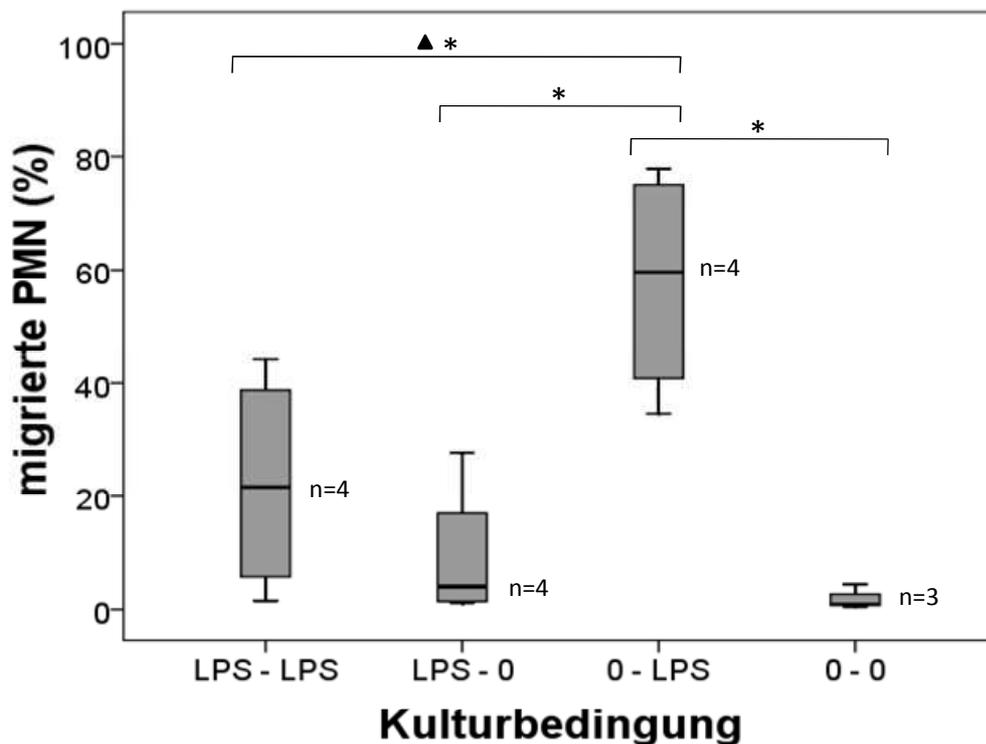
MEC *in vitro* untersucht werden konnte. Dieses Entzündungsmodell wurde sowohl für die pbMEC als auch für die MAC-T entwickelt. Die Kulturzellen wurden zweimal für jeweils 14h mit LPS (20µg bzw. 100µg/ml) stimuliert. Nach der 1. Stimulation folgte eine Ruhephase von 33h, bei denen die Zellen unstimuliert blieben. Zum Vergleich wurde im Parallel-Ansatz dazu nur einmal zum Zeitpunkt der 2. Stimulation mit LPS kokubiert (siehe auch Abbildung 8).

Um den Einfluss der LPS-Vorbehandlung auf die Sekretion chemoattraktiver Faktoren durch die MEC zu prüfen, wurden die Zellkulturüberstände nach der 2. Stimulation gewonnen und in der Transmigrationskammer auf ihre chemoattraktiven Eigenschaften getestet.

#### **4.2.3.1 Induktion einer LPS-Toleranz in pbMEC**

Die pbMEC zeigte *in vitro* eine funktionell nachweisbare Toleranz gegenüber LPS. Zwischen den Zellkulturüberständen der vorstimulierten (LPS-LPS) und der nicht-vorstimulierten (0-LPS) Zellen bestand ein signifikanter Unterschied (siehe Abbildung 24; ▲;  $p=0,043$ ) in der Sekretion chemoattraktiver Faktoren. Dies beschreibt den Effekt der LPS-Toleranz. Der prozentuale Anteil an migrierten PMN war bei den LPS-vorstimulierten pbMEC um 70% geringer als bei nicht-vorstimulierten Zellen. Demzufolge geben LPS-vorbehandelte pbMEC bei wiederholter Stimulation mit LPS weniger chemoattraktive Substanzen an das Zellkulturmedium ab als „naive“ Zellen. Die PMN-Transmigrationsrate unterschied sich bei Zellkulturüberständen der LPS-vorstimulierten pbMEC (LPS-LPS) nicht signifikant von der Kontrolle (0-0;  $p=0,077$ ). Bei dem Kontroll-Ansatz wurden die Zellen nicht stimuliert, jedoch unter identischen Bedingungen jeweils mit serumfreiem Medium kultiviert.

Um den Einfluss der 1. LPS-Stimulation auf die Sekretion chemoattraktiver Substanzen nach der 2. Stimulation zu beurteilen, wurden die Zellen nur einmal zum Zeitpunkt der 1. Stimulation mit LPS stimuliert. Zum angesetzten Zeitpunkt der 2. LPS-Stimulation wurden diese Zellen lediglich mit serumfreiem Medium kultiviert. Der Anteil migrierter PMN auf Zellkulturüberstände aus diesem Ansatz (LPS-0) unterschied sich nicht signifikant ( $p=0,157$ ) von dem Kontroll-Ansatz (0-0). Somit war gesichert, dass zum Zeitpunkt der 2. LPS-Stimulation keine gesteigerte Sekretion chemoattraktiver Faktoren aufgrund der 1. Stimulation vorhanden war (siehe Abbildung 24).



**Abbildung 24: Chemoattraktive Kapazität von Zellkulturüberständen wiederholt LPS-stimulierter pbMEC**

Dargestellt als Boxplots ist der Anteil migrierter PMN (%) auf Zellkulturüberstände von pbMEC. Eine Stimulation mit 20µg/ml LPS erfolgte zweimalig (LPS-LPS) oder einmalig 61h (LPS-0) und 14h (0-LPS) vor Analyse. Die Kontrolle (0-0) blieb über den gesamten Zeitraum unstimuliert. 0,1µg/ml IL-8 (Positivkontrolle) = 100% migrierte PMN.

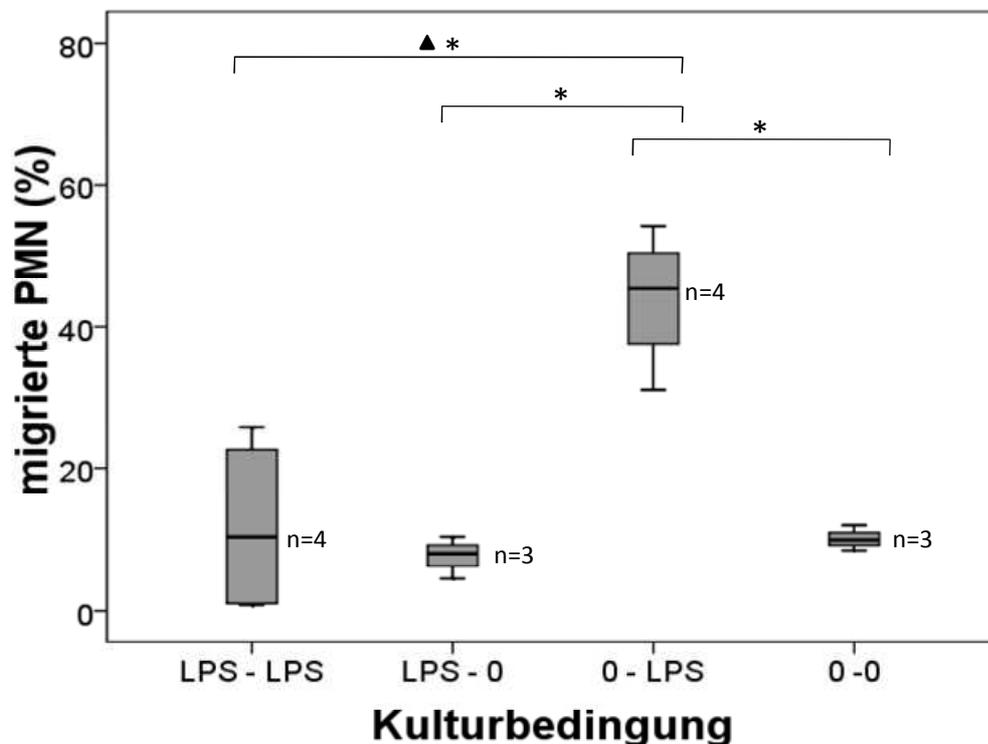
\* =  $p < 0,05$ . ▲ = LPS-Toleranz.

#### 4.2.3.2 Induktion einer LPS-Toleranz in MAC-T

*In vitro* ist auch bei der immortalisierten MAC-T eine Toleranz gegenüber LPS induzierbar. Es bestand ein signifikanter Unterschied zwischen dem Anteil migrierter PMN auf Zellkulturüberstände LPS-vorstimulierter (LPS-LPS) und nicht-vorstimulierter (0-LPS) MAC-T ( $p = 0,021$ ). Die PMN-Transmigrationsrate auf Zellkulturüberstände vorstimulierter MAC-T war nach wiederholter LPS-Stimulation (LPS-LPS) um 80% geringer als auf Überstände einmalig stimulierter, naiver Zellen (0-LPS). Der Anteil migrierter PMN auf Zellkulturüberstände zweimalig LPS-stimulierter MAC-T (LPS-LPS), war nach der 2. Stimulation vergleichbar niedrig wie der der Kontrolle (0-0). Es bestand

kein signifikanter Unterschied zwischen diesen beiden Versuchsansätzen ( $p=0,480$ ).

Um den Einfluss der 1. LPS-Stimulation auf die Sekretion chemoattraktiver Faktoren einer nachfolgenden 2. Stimulation zu beurteilen, wurden die Zellen nur einmal zum Zeitpunkt der 1. Stimulation mit LPS behandelt (LPS-0). Während der 2. Stimulationsphase wurden diese Zellen nur mit serumfreiem Medium kultiviert. Der Anteil migrierter PMN auf Zellkulturüberstände aus diesem Ansatz unterschied sich nicht signifikant von der Kontrolle (0-0;  $p=0,513$ ). Demzufolge war auch bei der MAC-T zum Zeitpunkt der 2. LPS-Stimulation keine gesteigerte Sekretion chemoattraktiver Faktoren aufgrund der vorangegangenen 1. Stimulation funktionell nachweisbar (siehe Abbildung 25).



**Abbildung 25: Chemoattraktive Kapazität der Zellkulturüberstände wiederholt LPS-stimulierter MAC-T**

Dargestellt als Boxplots ist der Anteil migrierter PMN auf Zellkulturüberstände nach der 2. Stimulation aus dem In-vitro-LPS-Toleranzmodell der MAC-T. Die Stimulation der MAC-T erfolgte mit  $100\mu\text{g/ml}$  LPS (= LPS).  $0,1\mu\text{g/ml}$  IL-8 (Positivkontrolle) = 100% migrierte PMN. \* =  $p < 0,05$ . ▲ = LPS-Toleranz.

## 5 Diskussion

Die Mastitis des Rindes ist weltweit die teuerste Einzeltierkrankung in der Milchwirtschaft<sup>1</sup>. Sie wird fast ausschließlich durch bakterielle Erreger hervorgerufen. Je nach beteiligten Erregern werden subklinische Mastitiden, bei denen lediglich die Milchzellzahl (SCC; engl.: somatic cell count) erhöht ist, von klinischen Mastitiden unterschieden. Insbesondere die durch *Escherichia coli* (*E. coli*) ausgelöste Euterentzündung verursacht hohe Einbußen durch Abgänge von Tieren aus der Produktion. *E. coli* gelangt als Umwelt-assoziiertes, Gram-negatives Bakterium meist durch den Strichkanal in die Milchdrüse und vermehrt sich im Milchsekret. Hauptverantwortlich für die Pathogenese akuter Mastitiden durch Gram-negative Erreger ist das Lipopolysaccharid (LPS; syn. Endotoxin), welches bei der Teilung und beim Absterben der Bakterien frei wird. LPS wird über bestimmte Rezeptoren (TLR-4, LBP, CD14) vom Wirt erkannt und löst eine Immunantwort aus. Neben den Leukozyten, deren Fähigkeit zur LPS-Erkennung und nachfolgender Immunreaktion in einer ganzen Reihe von Studien bei verschiedenen Spezies nachgewiesen wurde<sup>4</sup>, wird auch der Milchdrüsenepithelzelle (MEC) eine immunologische Bedeutung bei LPS-Kontakt zugeschrieben. Hinweise geben mehrere In-vitro-Studien, bei denen unter anderem auch die Expression von Toll-like-Rezeptoren (TLRs)<sup>181-182</sup> und eine LPS-abhängige Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen durch die MEC gezeigt wurde<sup>8,69-70</sup>.

Die vorliegende Arbeit ist Teil eines Gesamtkonzeptes von Untersuchungen zur Aufklärung der initialen Vorgänge bei der Entstehung einer Mastitis, welche den Schweregrad der anschließenden Erkrankung beeinflussen. Ein langfristig formuliertes Ziel ist es, mittels Modulation angeborener Immunmechanismen schwere Mastitiden zu verhindern und/oder die klinischen Symptome sowie die langfristigen Schäden zu vermindern.

### 5.1 Konzeptionelle Überlegungen

Untersuchungen im Bereich der humanmedizinischen Sepsisforschung zeigen, dass sich bei wiederholtem Kontakt mit LPS ein Toleranzeffekt (syn.

Endotoxintoleranz) einstellt, welcher zu einer abgeschwächten Immunreaktion führt. Als verantwortlicher Mechanismus werden desensibilisierende Substanzen im Plasma, endotoxinneutralisierende Plasmamoleküle, die Hemmung von Nuklear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B) und die Herunterregulierung des TLR-assoziierten Signalweges angenommen<sup>4</sup>. Nach Vorstimulation der Milchdrüse mit LPS und einer anschliessenden experimentellen *E. coli*-Mastitis konnte die Endotoxintoleranz im Tiermodell innerhalb der eigenen Arbeitsgruppe gezeigt werden<sup>6</sup>. Um weitere Hinweise auf mögliche Ursachen für die beobachtete LPS-Toleranz *in vivo* zu erhalten, sollte in dieser Arbeit das Milchsekret von mit LPS intramammär vorbehandelten Kühen auf eine mögliche Veränderung seiner antimikrobiellen Eigenschaften geprüft werden. Weiterhin wurde hypothetisiert, dass die MEC als potentielle Regulatorzelle lokaler Entzündungsreaktionen im Euter bei wiederholtem Kontakt mit pathogenen Bestandteilen abgeschwächt reagiert. Um zu prüfen, ob die MEC an den Mechanismen der Endotoxintoleranz im Euter beteiligt ist, wurde ein In-vitro-Entzündungsmodell entwickelt. Dabei sollten die funktionellen Konsequenzen für bovine neutrophile Granulozyten (PMN) aus einer wiederholten LPS-Stimulation der MEC untersucht werden. PMN gelten als die wichtigsten Effektorzellen bei der akuten Mastitis des Rindes<sup>34</sup>. Im Vordergrund sollten Methoden stehen, mit denen es möglich ist, *in vitro* die Funktion der PMN direkt zu untersuchen (Chemotaxis, Bildung reaktiver Sauerstoffmetaboliten, Phagozytosekapazität). Somit sollten frühere Untersuchungen anderer Autoren<sup>7-8,70</sup>, welche die Immunkompetenz der MEC auf RNA-Ebene untersucht haben, um funktionelle Studien ergänzt werden. Parallel dazu wurde ein In-vitro-Entzündungsmodell mit einer immortalisierten bovinen MEC (Mammary Alveolar Cells-Large T antigen; MAC-T) entwickelt und mit dem der primären bovinen Milchdrüsenepithelzelle (pbMEC) verglichen. Damit sollte die Eignung der MAC-T als aussagekräftige Modellzelle geprüft werden.

Hintergrund und Motivation der Erforschung der Endotoxintoleranz im Euter ist es, dieses biologische Phänomen auf sein Potential für neue Prophylaxe- und Therapiestrategien bei der Mastitis des Rindes zu prüfen. Eine wirksame Bekämpfung von Mastitiden könnte die Häufigkeit des umstrittenen Einsatzes von Antibiotika in der Zukunft senken.

## 5.2 Einfluss einer intramammären LPS-Vorbehandlung auf das *E. coli*-Wachstum *in vitro*

Das Milchsekret von Kühen aus einem Tiermodell zur Endotoxintoleranz<sup>6</sup> wurde in Abhängigkeit von der Expositionsdauer nach intramammärer LPS-Vorbehandlung *ex vivo* auf Veränderungen hinsichtlich seiner wachstumshemmenden Eigenschaften gegenüber *E. coli* untersucht.

Wachstumskurven mit *E. coli* 1303 in Vollmilch beschreiben die LPS-abhängigen Effekte insgesamt, also Effekte durch zelluläre und lösliche Faktoren der Milch. Die gleichzeitige Bestimmung des SCC ermöglichte die Charakterisierung des Einflusses der Zellzahlhöhe auf das Wachstumsverhalten von *E. coli* (siehe Abbildung 14). Mit Hilfe zellfreier Magermilch konnten Rückschlüsse auf die alleinigen Effekte löslicher antimikrobieller Komponenten in der Milch auf das Bakterienwachstum gezogen werden.

### *Hohe Zellzahlen in der Milch hemmen das Wachstum von E. coli in vitro*

Beim Vergleich der Wachstumskurven von *E. coli* 1303 in der Vollmilch zu Beginn, 24h, 72h und 240h nach LPS-Vorbehandlung der Versuchstiere zeigte sich nur bei Milch, die 24h nach Vorbehandlung gewonnen wurde, eine signifikante Hemmung des Bakterienwachstums (siehe Abbildung 12). Lohuis et al. (1990)<sup>287</sup> untersuchten das Wachstumsverhalten von *E. coli* in der Vollmilch 18h nach einer intramammären LPS-Infusion. Sie stellten hier eine Wachstumshemmung von *E. coli* fest. In der vorliegenden Arbeit wurden gleiche Beobachtungen 6h später nach der intramammären LPS-Applikation gemacht.

Das Wachstumsverhalten von *E. coli* in der Vollmilch korrelierte negativ mit den SCC-Werten der Vollmilch. Die höchsten SCC-Werte wurden 24h nach der LPS-Behandlung gemessen ( $3 \pm 1 \times 10^6$  SCC/ml; MW  $\pm$  SD). Somit lässt die negative Korrelation der SCC-Werte mit dem bakteriellen Wachstum auf eine Zell-vermittelte Hemmung der Vermehrung von *E. coli* schließen (siehe Abbildung 14). Dies deckt sich weitgehend mit bekannten Beobachtungen ähnlicher Untersuchungen<sup>287</sup>. Es ist davon auszugehen, dass dieser Effekt auf den hohen Anteil von PMN an den Milchzellen zurückzuführen ist. PMN machen über 95% der Milchzellen in hochzelliger Milch aus. Auch im hier eingesetzten

Tiermodell waren PMN die vorherrschende Population (>95%) nach intramammärer LPS-Infusion<sup>6</sup>. Es liegt nahe, dass PMN durch Phagozytose und Sekretion antimikrobieller Faktoren (ROS, Defensine) das Wachstum von *E. coli* hemmen konnten. Die *E. coli*-Wachstumshemmung in der Vollmilch in Abhängigkeit von der LPS-Behandlung deutet eine Art Schwellenwertphänomen für den SCC an, ab dem *in vitro* eine Wachstumshemmung zu beobachten ist. Nur 24h nach intramammärer LPS-Behandlung konnte *in vitro* eine statistisch signifikante Wachstumshemmung für *E. coli* in der Vollmilch festgestellt werden. Zu diesem Zeitpunkt lag der SCC bei  $3 \pm 1 \times 10^6$  /ml (MW  $\pm$  SD). 72h nach der LPS-Infusion lag der SCC-Wert der Vollmilch bei  $565 \pm 230 \times 10^3$  /ml (MW  $\pm$  SD). *In vitro* konnte trotz dieses aus klinischer Sicht immer noch relativ hohen SCC-Wertes keine Wachstumshemmung von *E. coli* festgestellt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die funktionelle Aktivität der Milch-PMN allerdings nicht geprüft. Die 72h nach LPS-Applikation gewonnenen Milchproben könnten möglicherweise in der Tendenz mehr „ältere“ sowie durch die Phagozytose von Milchpartikeln funktionell erschöpfte PMN enthalten. Dadurch kann das unbeeinflusste *E. coli*-Wachstum auch erklärt werden. Die *E. coli*-Wachstumskurven, die über 24h erstellt wurden, zeigen zudem, dass es nur während der ersten 8h der 24-stündigen Kultivierung zu einer Hemmung der bakteriellen Vermehrung kommt. Am Ende der 24h-Inkubation ist die Keimzahl unabhängig vom SCC der Milch auf vergleichbar hohem Niveau. Neben einem zunehmenden Funktionsverlust kann das auch mit dem mangelnden „Nachschub“ der PMN in der In-vitro-Situation erklärt werden. PMN haben darüber hinaus eine relativ kurze Halbwertszeit von 8,9h<sup>288</sup>. Diese ist im Rahmen einer Entzündung noch kürzer<sup>289</sup>. Ein LPS-vermittelter In-vivo-Effekt ist der Influx von PMN in die Milchdrüse<sup>6</sup>. Dieses Phänomen wird für die Elimination der Erreger verantwortlich gemacht<sup>27</sup>. Die Stärke und Geschwindigkeit des Influx der PMN in die Milch und die daraus resultierende dortige Erregervermehrung beeinflussen den Schweregrad der Mastitis<sup>21</sup>. Die vorliegenden Daten lassen schlussfolgern, dass nicht allein die initiale Anzahl phagozytischer Zellen in der Milch, sondern vielmehr deren rasches Einwandern ausschlaggebend für eine effektive Erregerabwehr sein muss.

Im Tiermodell konnte 10 Tage (240h) nach Vorstimulation des Euters mit LPS eine abgeschwächte Immunreaktion auf eine experimentelle *E. coli*-Infektion

gegenüber nicht LPS-behandelten Tieren festgestellt werden<sup>6</sup>. 72h nach „LPS-Priming“ ließ sich sogar eine klinische Mastitis nach experimenteller Infektion des Euters mit *E. coli* verhindern. Im Vergleich dazu zeigen die Ex-vivo-Untersuchungen der vorliegenden Arbeit in Vollmilch keine Wachstumshemmung 72h oder 240h nach dem „LPS-Priming“ der Milchdrüse. Diese Erkenntnisse lassen vermuten, dass für die 72h oder 240h nach der LPS-Behandlung im Tiermodell festgestellte Toleranz keine zellulären oder löslichen Inhaltsstoffe der Milch verantwortlich sind. Somit müssen andere Mechanismen, die eine abgeschwächte Immunreaktion nach Vorbehandlung mit LPS bewirken, diskutiert und geprüft werden. In Frage kommen z.B. Effekte durch MEC und/oder residente Makrophagen. In Experimenten von Kornalijnslijper et al. (2004)<sup>21</sup> wurde festgestellt, dass die Vermehrung von *E. coli* in Milchproben *in vitro* weder mit dem Wachstum des Erregers in der frühen Phase der Mastitis *in vivo* noch mit dem Schweregrad der Euterentzündung korreliert. Dies widerspricht zumindest teilweise unseren Resultaten, da die Schwere einer Euterentzündung mit der Höhe der SCC-Werte korreliert und hohe SCC-Werte das Bakterienwachstum in den vorliegenden Experimenten einschränkte.

### ***Eine LPS-Vorbehandlung in vivo hat keinen Einfluss auf das Wachstum von E. coli in zellfreier Magermilch in vitro***

Mit Hilfe zellfreier Magermilch in unseren In-vitro-Experimenten sollte geprüft werden, ob eine LPS-Vorbehandlung *in vivo* durch lösliche antimikrobielle Komponenten in der Milch zu einer Veränderung des *E. coli*-Wachstums führt. Zellfreie Magermilch, die 24h, 72h oder 240h nach Vorbehandlung der Probanden mit LPS gewonnen wurde, bewirkte im Vergleich zur Kontrollgruppe keinen wachstumshemmenden Effekt für *E. coli* (siehe Abbildung 13). Diese Ergebnisse widersprechen durchaus den Ergebnissen von Lohuis et al. (1990)<sup>287</sup>, die eine Hemmung des Bakterienwachstums in der zellfreien Magermilch 18h nach LPS-Infusion zeigten. Aus früheren Studien ist zudem bekannt, dass eine intramammäre LPS-Infusion zur Exsudation von Plasmabestandteilen führt, die mit einem Anstieg von Immunglobulinen, Transferrin und Laktoferrin verbunden ist<sup>290-293</sup>. Im Milchdrüsengewebe LPS-vorbehandelter Kühe konnte gezeigt werden, dass die Expression für das Defensin LAP (lingual antimicrobial peptide)

auf mRNA-Ebene 72h nach Vorbehandlung 10-fach und 240h nach Vorbehandlung 4-fach hochreguliert war (Seyfert, persönliche Mitteilung). Im Mastitis-Tiermodell offenbarte sich, dass eine intramammäre Infusion von *E. coli* zu einer gesteigerten Expression der antimikrobiell wirkenden  $\beta$ -Defensine durch die MEC führt<sup>180</sup>. Goldammer et al. (2003)<sup>102</sup> konnten in MECs der infizierten Milchdrüse eine 13-fach gesteigerte mRNA-Expression für BNBD5 (bovines  $\beta$ -Defensin-5) gegenüber der gesunden Milchdrüse feststellen. Dieser Effekt wäre aufgrund der intramammären LPS-Infusion auch zu erwarten gewesen. Veränderungen in der Konzentration dieser bakterizid wirkenden Komponenten in der zellfreien Magermilch sollten dann auch einen wachstumshemmenden Effekt gegenüber *E. coli* haben. In unserem Versuchs- und Analyseaufbau konnten wir dies nicht zeigen. Einerseits kann dies darauf zurückzuführen sein, dass nur ganze Pathogene in der Lage sind, den Wirt und insbesondere die MEC zur Synthese und Freisetzung wirksamer Mengen löslicher bakterizider Faktoren in die Milch zu stimulieren. Zweitens ist es denkbar, dass nur das summarische Wirken von zellulären und löslichen Komponenten das *E. coli*-Wachstum nachweisbar modulieren kann. Drittens ist auch nicht auszuschließen, dass die gewählte Methode für die entsprechende Fragestellung zu ungenau ist. So streuten die ermittelten Keimzahlen/ml (in CFU) relativ stark. Auch differierte das Wachstumsverhalten von *E. coli in vitro* trotz hoher Standardisierung der Modelltiere zwischen den Kühen und den Milchpräparationen um den Faktor 100. Somit waren geringe Effekte kaum zu erfassen. Eine quantitative Bestimmung ausgewählter löslicher Komponenten des Immunsystems im Milchsekret, wie Komplementkomponenten, Laktoferrin, Defensine etc., wäre der nächste logische Schritt zur Aufklärung der Fragestellung.

### 5.3 Induktion einer LPS-Toleranz in der MEC

Die Endotoxintoleranz ist definiert als eine herabgesetzte immunologische Reaktivität des Wirts gegenüber LPS aufgrund einer vorhergehenden LPS-Exposition. Die induzierte Toleranz kann vor letalen LPS-Dosen schützen, Entzündungen begrenzen und ischämische Gewebeschädigungen verhindern<sup>4</sup>. Die LPS-Toleranz kann nicht als eine generell abgeschwächte Immunantwort angesehen werden. Vielmehr handelt es sich um eine komplexe, konzertierte

Regulation der Immunantwort bei wiederholter Stimulation mit LPS<sup>203,210-211</sup>. So resultiert dieser Effekt aus desensibilisierenden Substanzen im Plasma, endotoxinneutralisierenden Plasmamolekülen, der Hemmung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B und der Herunterregulierung von Faktoren des TLR-assoziierten Signalweges<sup>4</sup>.

Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit war es, vor dem Hintergrund einer protektiven LPS-Toleranz *in vivo*, *in vitro* zu prüfen, ob die MEC eine tolerisierbare Komponente der bovinen Milchdrüse darstellt.

### ***Etablierung eines In-vitro-Entzündungsmodells zur Untersuchung der LPS-Toleranz***

Frühere Untersuchungen geben Hinweise darauf, dass neben Makrophagen auch die MEC in das Euter eingedrungene Bakterien erkennen kann. Sie vermittelt Signale, die eine Immunantwort auslösen können oder zumindest modulieren. Die bereits vorhandenen Erkenntnisse über die an der initialen Erregererkennung beteiligten Mediatoren sollten in unserem Projekt durch funktionelle Untersuchungen ergänzt werden. Die MEC exprimiert nachgewiesenermaßen TLR-4<sup>7</sup> und reagiert auf LPS-Stimulation mit einer gesteigerten Synthese von Zytokinen und Chemokinen<sup>8,70</sup>. Eine gezielte Modulation der MEC hinsichtlich ihrer funktionellen Kompetenz wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht. Dafür wurde ein In-vitro-Entzündungsmodell zur Prüfung einer induzierbaren LPS-Toleranz bei der pbMEC und der immortalisierten Zelllinie MAC-T entwickelt. Nach einmaliger oder wiederholter Exposition der MEC mit LPS sollten Kulturüberstände auf ihre chemoattraktive Kapazität gegenüber PMN sowie auf die Modulation von deren Phagozytosevermögen und ROS-Bildung geprüft werden.

Ein wichtiger methodischer Punkt bei der Etablierung der pbMEC war die Sicherstellung einer reproduzierbaren Reinheit. Da die pbMEC bei der Präparation aus dem Zellverband v.a. mit Fibroblasten gelöst wurde, mussten letztere anschließend bei der Kultivierung mittels Trypsin entfernt werden. Verschiedene Studien deuten auf eine Beteiligung der Fibroblasten am

Entzündungsprozess hin. Humane Fibroblasten exprimieren TLR und bilden nach LPS-Stimulation Chemokine, wie z.B. CXCL8 (IL-8)<sup>294-296</sup>. Von bovinen Synovialfibroblasten ist bekannt, dass sie auf den Kontakt mit LPS mit der Synthese von Prostaglandinen (z.B. PGE<sub>2</sub>) reagieren<sup>297</sup>. Zur Qualitätssicherung war es im vorliegenden Projekt unabdingbar, den Anteil der pbMEC an den Kulturzellen zu ermitteln. Da die rein morphologische Beurteilung der Zellen für diesen Methoden-Etablierungsschritt nicht genau genug war, wurde der Anteil Cytokeratin-positiver Zellen bestimmt (positiv: Epithelzellen; negativ: u.a. Fibroblasten, Myoepithelzellen, Leukozyten). Die Reinheit lag in fünf exemplarisch ausgewählten Kulturproben bei etwa 87% (siehe Abbildung 16). Um einen pbMEC-Monolayer mit annähernd 100%iger Reinheit zu erhalten, hätten verbliebene Fibroblasten unter dem Mikroskop sehr aufwendig markiert und anschließend mit dem Zellschaber entfernt werden müssen.

Da bei der Anzucht der pbMEC keine einheitliche Zelldichte in den Wells der 6-Well-Platten zu erzielen war, mussten die Zellen in einem Zwischenschritt aus den Wells abgelöst, gepoolt und dann gleichmäßig auf die einzelnen Wells einer neuen Platte verteilt werden. Hierbei mussten die Zellen sehr dicht ausgesät werden, wie Vorversuche gelehrt hatten: Bei dünner Aussaat mussten sich die Zellen bis zur Bildung eines konfluenten Monolayers zu häufig teilen. Die daraus resultierende Kulturdauer könnte dabei mit einem Funktionsverlust der Zellen einhergehen. Pilotexperimente zeigten auch, dass passagierte pbMEC mit einer wesentlich höheren LPS-Konzentration stimuliert werden müssen, bis sie chemoattraktive Substanzen in das Kulturmedium abgeben (Ergebnisse nicht gezeigt). Dies untermauert die Beobachtungen von Günther et al. (2009)<sup>280</sup>: Sie charakterisierten den Verlust der immunologischen Kapazität der pbMEC unter verschiedenen Kulturbedingungen auf Transkriptom-Ebene. So zeigte die pbMEC bereits nach wenigen Passagen bei Stimulation mit abgetöteten *E. coli* eine herabgesetzte Expression von LAP (lingual antimicrobial peptide).

Für eine funktionelle Analyse mit dem Einsatz von MEC-Kulturüberständen in der Transmigrationskammer mussten die Zellen in serumfreiem Kulturmedium stimuliert werden, da fetales Kälberserum (FKS) bekanntlich chemoattraktive Substanzen enthält<sup>298</sup>. In eigenen Vorstudien konnte die chemotaktische Potenz von FKS in der Transmigrationskammer nachvollzogen werden (Daten nicht gezeigt). Ähnliche Erfahrungen machten Okata et al. (1997)<sup>71</sup>: Die IL-1 $\alpha$ - und

IL-1 $\beta$ -Sekretion der pbMEC konnte nur bei Kultur in serumfreiem Medium reproduzierbar nachgewiesen werden.

Ein weiteres Qualitätskriterium des Kultursystems stellt die Vitalität der Zellen während der Stimulationsphase dar. Gerade weil FKS-freies Medium eingesetzt werden musste, war ein Monitoring der Zellvitalität notwendig. FKS enthält u.a. Wachstumsfaktoren, die insbesondere empfindliche Kulturzellen stabilisieren. Um auszuschließen, dass die serumfreien Kulturphasen einen Vitalitäts- und einen damit verbundenen Funktionsverlust bewirken, wurden die MEC nach Versuchsabschluss auf ihre Vitalität überprüft. Der Anteil vitaler Zellen betrug hier jeweils nahezu 100% (pbMEC 96% und MAC-T 94%; siehe Abbildung 17 und Abbildung 18). Es kann davon ausgegangen werden, dass die wenigen toten oder membrangeschädigten Zellen vor allem durch den Färbeprozess zustande kamen.

Somit kann zusammenfassend gesagt werden, dass mit dem erarbeiteten Zellkultursystem, das sich durch eine reproduzierbar gute Reinheit und eine hohe Vitalität der MEC auszeichnet, ein gutes methodisches Instrument zur Verfügung steht, mit dem verschiedene Fragestellungen zur MEC *in vitro* untersucht werden können.

### ***Die In-vitro-Stimulation von pbMEC und MAC-T mit LPS führt zur Sekretion chemoattraktiver Faktoren***

Sowohl die pbMEC als auch die immortalisierte MAC-T synthetisieren nach Stimulation mit LPS chemoattraktive Substanzen und geben diese an das Zellkulturmedium ab (siehe Abbildung 19 und Abbildung 20). Die Dosis-Wirkungs-Versuche mit der pbMEC zeigten für LPS-Konzentrationen ab 50ng/ml Medium eine nahezu konstante Migrationsrate von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN). Dies lässt darauf schließen, dass es entweder ab einer bestimmten „Schwellendosis“ zu einer dosisunabhängigen gleichbleibenden Sekretion chemoattraktiver Substanzen durch die pbMEC kommt oder ein Teil der PMN auch durch höhere Konzentrationen von Chemoattraktantien nicht zur Migration stimuliert werden kann. Bei eigenen Vorarbeiten stellte sich zudem heraus, dass mindestens 12h gewartet werden muss, bis die pbMEC reproduzierbar chemoattraktive Faktoren sezernieren

(Ergebnisse nicht gezeigt).

Chemokine und Komplement-Faktoren sind Mediatoren für die Rekrutierung von Leukozyten ins Entzündungsgebiet. Haupteffektorzellen in der bakteriell kontaminierten entzündeten Milchdrüse sind PMN. CXCL8/IL-8 ist ein potentes, proinflammatorisches Chemokin, das für die Rekrutierung von PMN in die Milchdrüse verantwortlich ist<sup>89</sup>. Der Kontakt mit LPS oder *E. coli* bewirkt bei der pbMEC und der MAC-T die Transkription von CXCL8 auf mRNA-Ebene<sup>8,69,267</sup>. Aus diesen Gründen wurden die Kulturüberstände der pbMEC- und MAC-T-Kulturen vor und nach LPS-Stimulation mittels humanem CXCL8-ELISA (siehe 3.3.4.8) analysiert. Weder in den Überständen stimulierter Zellen noch in den Überständen nicht-stimulierter Zellen konnte CXCL8 nachgewiesen werden (siehe Tabelle 6). Lahouassa et al. (2007)<sup>69</sup> stellten fest, dass die mit dem auch bei uns verwendeten humanen ELISA Kit (R&D Systems, Minneapolis) im Vergleich zu ihrem eigens für bovines CXCL8 entwickelten ELISA um das 300- bis 800-fache niedrigere Werte ermittelt werden. Demnach muss davon ausgegangen werden, dass der humane CXCL8-ELISA, der jedoch für andere Fragestellungen schon erfolgreich in bovinen Systemen eingesetzt wurde<sup>8,267</sup>, geringe Mengen an bovinem IL-8 nicht effizient erfassen kann.

Die Stimulation der pbMEC mit LPS bewirkt eine gesteigerte Expression des CXCL5 Genes<sup>299</sup>. CXCL5 ähnelt in seiner Struktur dem CXCL8/IL-8 und ist ebenfalls ein potentes Chemokin für neutrophile Granulozyten<sup>300</sup>. Dies lässt vermuten, dass durchaus auch andere chemoattraktive Substanzen, welche von der MEC gebildet werden, für die Migration der PMN verantwortlich oder mitverantwortlich sind. IL-1 ist ein weiteres auf bovine PMN chemoattraktiv wirkendes Zytokin<sup>34</sup>. Nach LPS-Kontakt wurde bei der pbMEC eine gesteigerte Expression von IL-1 beobachtet<sup>71</sup>. Untersuchungen zu den initialen Vorgängen bei der Mastitis schreiben der chemoattraktiven Komplement-Komponente C5a eine bedeutende Rolle bei der Rekrutierung von PMN ins Euterparenchym zu. Nach LPS-Infusion in die Milchdrüse wurde im Milchsekret ein erhöhter Gehalt an C5a gefunden<sup>76</sup>. Frühere Untersuchungen deuten auf eine lokale C5a-Synthese im Euter hin<sup>114</sup>. Eine mögliche Quelle könnten Monozyten, Makrophagen oder auch die MEC sein. Das Vorkommen von C5a bei nicht-myeloischen Zellen, einschließlich Epithelzellen, wurde bereits gezeigt<sup>301</sup>.

LPS selbst wirkt ebenfalls potentiell chemoattraktiv<sup>34</sup>. Eigene Vorversuche

zeigten jedoch keine Effekte von LPS in den eingesetzten Konzentrationen auf das Migrationsverhalten der PMN in der Transmigrationskammer (Ergebnisse nicht gezeigt).

### ***LPS-Toleranz ist in vitro bei der MEC induzierbar***

Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass die LPS-Vorbehandlung der Milchdrüse bei einer nachfolgenden experimentellen *E. coli*-Infektion zu einer abgeschwächten Immunreaktion führte. Die so exponierten Tiere reagierten im Vergleich zu naiven Tieren mit abgeschwächten klinischen Symptomen (kein Fieber, keine Veränderungen des Milchsekretes etc.) und waren zudem in der Lage, die Anzahl der Erreger in der Milch effizient zu reduzieren<sup>6</sup>.

Ein Hauptziel der vorliegenden Arbeit war es herauszufinden, inwieweit die MEC an der LPS-Toleranz beteiligt ist. Dafür wurde ein In-vitro-Entzündungsmodell entwickelt. Neben der pbMEC wurde dazu parallel auch die immortalisierte MAC-T-Linie eingesetzt. Damit sollte geprüft werden, ob sich diese permanente Zelllinie für derartige Studien eignet. MAC-T wird häufig als Modellzelle für die Untersuchung verschiedener Fragestellungen zur bovinen Milchdrüse eingesetzt<sup>7,267,302</sup>. Allerdings ist die Aussagekraft der Ergebnisse umstritten, da diese Zelllinie durch vielfache Passagierung und den Immortalisierungsprozess einige wichtige funktionelle Kompetenzen verloren hat<sup>7,266</sup>.

Als Stimulationsdosis wurde eine LPS-Konzentration gewählt (pbMEC 20µg/ml und MAC-T 100µg/ml), die sich in Vorversuchen als sicher wirksam erwiesen hatte (Bioassay, Chemotaxis; siehe 4.2.1.3). In verschiedenen Studien variiert die gewählte Konzentration für die In-vitro-Stimulationsversuche. Dies liegt daran, dass unterschiedliche Präparationen variable Mengen an Fremdproteinen enthalten können, die die Aktivierung von Immunzellen beeinflussen können<sup>303</sup>. Vor allem aber ist die endotoxine Wirkung im Wesentlichen von der Struktur des eingesetzten LPS abhängig und variiert zwischen Bakterienstämmen und LPS-Präparationen sowie -Chargen.

In der vorliegenden Studie wurden die MEC wiederholt im Abstand von 33h mit LPS stimuliert. Die Kulturüberstände wurden in einer In-vitro-Transmigrationskammer eingesetzt. Dabei wurde die Chemoattraktivität der

Überstände für PMN nach einfacher und wiederholter LPS-Exposition verglichen (siehe Abbildung 24 und Abbildung 25). Anhand der reduzierten PMN-Migrationsrate nach wiederholter LPS-Stimulation konnte die LPS-Toleranz der pbMEC und MAC-T gezeigt werden. Vorstimulierte Zellen sezernierten gegenüber naiven Kulturzellen bei wiederholter LPS-Stimulation offenbar eine geringere Menge an chemoattraktiven Substanzen. Übertragen auf die Verhältnisse *in vivo* könnte das bedeuten, dass der wiederholte Kontakt der Milchdrüse mit LPS oder dem gesamten Bakterium zu einer herabgesetzten Rekrutierung neutrophiler Granulozyten in die Milchdrüse führt. Dies deckt sich mit den Erkenntnissen aus dem Tiermodell<sup>6</sup>. Da PMN die wichtigsten Effektorzellen im Rahmen einer Mastitis darstellen, ist dieser Effekt als zweischneidig zu betrachten: Eine rasche ausreichende Rekrutierung von PMN ist essentiell für eine effektive Erregererkennung und -eliminierung<sup>3</sup>. Im Gegenzug ist die übermäßige Rekrutierung schadhaft für den Wirt (Gewebeschädigung)<sup>304</sup>. Zu beachten ist, dass *in vivo* neben Epithelzellen auch residente Makrophagen in der Milchdrüse an der Induktion der Immunreaktion beteiligt sind<sup>30</sup>. Zu prüfen wäre also, ob diese ebenfalls am Phänomen der LPS-Toleranz beteiligt sind.

Das in dieser Arbeit etablierte Modell zielte vor allem auf die funktionellen Konsequenzen ab, die sich für PMN nach LPS-Kontakt der MEC ergeben. Ergänzende Modell-Experimente wurden von einer kooperierenden Arbeitsgruppe unter Leitung von Prof. Hans-Martin Seyfert im FBN Dummerstorf durchgeführt. Sie konnte anhand von Kandidatengenanalysen zeigen, dass die pbMEC auf einen wiederholten LPS-Stimulus verändert reagiert. Es kommt zur herabgesetzten Expression von Genen proinflammatorischer Faktoren, wie z.B. dem Akute Phase Protein Haptoglobin, der induzierbaren Stickoxidsynthase NOS2a und der proinflammatorischen Zytokinen IL-1 $\beta$  und IL-10 (Seyfert, persönliche Mitteilung).

Eigene Vorversuche zeigten auch, dass eine längere Ruhephase von etwa 33h zwischen der 1. und 2. Stimulation notwendig ist, um die LPS-Toleranz in der Transmigrationskammer zu erfassen (Ergebnisse nicht gezeigt). Bei kürzeren Ruhephasen von etwa 12h würden die Effekte der 1. Stimulation (z.B. Ausschüttung von Chemokinen) die der 2. Stimulation überlagern, da die Zellen zum Zeitpunkt der 2. Stimulation noch chemoattraktive Substanzen aufgrund der 1. Stimulation sezernieren. Um einen Einfluss der 1. Stimulation auszuschließen,

wurde ein Kontrollansatz mit ausschließlich vorstimulierten Zellen mitgeführt. Bei der Prüfung dieser Zellkulturüberstände migrierten vergleichbar viele PMN wie bei Überständen unstimulierter Zellen (siehe Abbildung 24 und Abbildung 25). Das bestätigt, dass in der hier etablierten Methode zum Zeitpunkt der 2. Stimulation keine chemoattraktiven Substanzen mehr aufgrund der 1. Stimulation sezerniert wurden.

Da sich bei der MEC eine LPS-Toleranz induzieren lässt, gibt dies Raum für Diskussion über beteiligte Mechanismen. Denkbar sind einerseits eine herabgesetzte Erkennung und Bindung von Erregerbestandteilen durch verminderte TLR-Expression und andererseits eine (eventuell resultierende) Veränderung der TLR-Signalkaskade. So zeigen Makrophagen im toleranten Zustand eine verminderte Expression von TLR an der Zelloberfläche<sup>254</sup>. Blackwell et al. (1997)<sup>228</sup> gehen bei der Endotoxintoleranz der Makrophagen von einer Hemmung von NF- $\kappa$ B aus. NF- $\kappa$ B ist für die Transkription der Gene proinflammatorischer Zytokine verantwortlich. Das wäre auch für die MEC denkbar. Die LPS-Toleranz könnte somit auf der veränderten Expression von TLR durch die MEC beruhen. Damit käme es bei Zweitkontakt mit Erregern oder Erregerbestandteilen (LPS) zu einer schwächeren Bindung und Erkennung durch die MEC und nachfolgend zur verminderten Synthese und Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen. Die Folgen *in vivo* wären schwächere lokale Entzündungssymptome und mit Blick auf die oben beschriebenen TNF- $\alpha$ -Effekte auch ein weniger gestörtes Allgemeinbefinden.

Der Modellaufbau schließt von Fremdzellen gebildete desensibilisierende Plasmabestandteile, wie z.B. IL-10<sup>215</sup>, als Einflussfaktoren weitgehend aus. IL-10 hemmt die Sekretion von TNF- $\alpha$ , woraus letztendlich eine Toleranz resultieren kann<sup>214</sup>. Desensibilisierungseffekte, vermittelt durch Katecholamine des Nervensystems<sup>222</sup> oder TGF- $\beta$  von Leukozyten<sup>217</sup>, spielen vermutlich ebenfalls keine Rolle, da diese Zelltypen nicht im verwendeten System vorkommen.

Da Effekte durch Fremdzellen in diesem System weitgehend ausgeschlossen werden, könnten autokrine Effekte eine Bedeutung beim Phänomen LPS-Toleranz der MEC haben. Zwar wurde das Kulturmedium mehrfach nach der ersten Stimulation gewechselt und autokrin wirksame Substanzen wurden gewaschen. Trotzdem könnten in dieser ersten Induktionsphase Modulatoren wirksam geworden sein (z.B. IL-10<sup>70</sup> oder LBP<sup>7</sup>). Eine autokrin über TGF- $\beta$

vermittelte Toleranz der MEC wäre ebenfalls denkbar. Es ist bekannt, dass die MAC-T TGF- $\beta$  produzieren kann<sup>305</sup> und über TGF- $\beta$ -Rezeptoren zur Autoregulation fähig ist<sup>306</sup>.

***LPS-Stimulation von pbMEC und MAC-T hat keinen Einfluss auf die Phagozytosekapazität und Bildung reaktiver Sauerstoffspezies von PMN in vitro***

In orientierenden Experimenten wurde untersucht, ob die LPS-Stimulation der MEC neben der Chemotaxis auch weitere Funktionen von PMN beeinflusst. Hierbei sollte der indirekte MEC-vermittelte Effekt auf die Phagozytosekapazität boviner PMN geprüft werden. Hintergrund dieser Untersuchung war es herauszufinden, ob es weitere Hinweise für eine Beteiligung der MEC bei der Aktivierung oder Hemmung von PMN im Entzündungsprozess der durch *E. coli* ausgelösten Mastitis gibt.

Zellkulturüberstände stimulierter pbMEC und MAC-T zeigten im Vergleich zu Überständen nicht-stimulierter Zellen jedoch keinen messbaren Einfluss auf die Phagozytosekapazität von PMN (siehe Abbildung 22 und Abbildung 23). Aus der Literatur ist bekannt, dass rekombinantes bovines Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), TNF- $\alpha$ , C5a und rekombinanter GM-CSF die Phagozytose boviner PMN steigern kann<sup>34</sup>. Okada et al. (1997)<sup>71</sup> konnten bei der pbMEC eine gesteigerte Expression der mRNA für TNF- $\alpha$  und GM-CSF feststellen, jedoch nicht für IFN- $\gamma$ . Auch die Aktivierung der Komplement-Komponenten C3b und C3bi begünstigen die Phagozytose über die Bindung an Rezeptoren der PMN<sup>307</sup>. Da das Kulturmedium Komplement-inaktiviert wurde, kann dieser Mechanismus hier nicht beteiligt sein. Die pbMEC kann jedoch nachweislich (in den entsprechenden Experimenten nicht identifizierte) Substanzen bilden, welche die Phagozytosekapazität von PMN steigern können<sup>69</sup>. Vermutlich war dies im vorliegenden Entzündungsmodell nicht darstellbar, weil kooperierende Zelltypen wie residente mammäre Makrophagen und/oder Bindegewebszellen dafür anwesend sein müssten.

Eine weitere wichtige Funktion der PMN ist die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). Komplement-Komponenten und Immunglobuline binden an Rezeptoren auf der Zellmembran von PMN. Infolgedessen kommt es zu einem erhöhten Sauerstoffverbrauch und einer gesteigerten

Hexose-Monophosphat-Aktivität, was als „respiratory burst“ bezeichnet wird. Bovine PMN produzieren dann Hyperoxide ( $O_2^-$ ) und Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ). Diese bilden an der Zelloberfläche und an der phagosomalen Membran Hydroxylradikale ( $OH\bullet$ ) und „singlet oxygen“ ( $O_2$ ). Die reaktiven Sauerstoffspezies sind für das Abtöten von Krankheitserregern verantwortlich. Zahlreiche Zytokine, wie GM-CSF, TNF- $\alpha$  und rekombinantes bovines Interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ), können die ROS-Aktivität der PMN steigern<sup>34</sup>.

Die Resultate unserer Testversuche gaben jedoch keinen Hinweis darauf, dass pbMEC oder MAC-T nach Stimulation mit LPS Stoffe an das Zellkulturmedium abgeben, welche die ROS-Bildung bei PMN nachhaltig beeinflussen. Potentiell in Frage kommende Zytokine werden unter bestimmten Bedingungen sowohl von pbMEC als auch von MAC-T sezerniert<sup>71</sup>. In den vorliegenden Experimenten wurde die ROS-Bildung durch PMN mittels PMA (Phorbol-Myrestat-Acetat) in unterschiedlichen Konzentrationen stimuliert. Die Koinkubation der PMN mit den MEC-Kulturüberständen beeinflusste die ROS-Bildung jedoch nicht (siehe Abbildung 21). Als Erklärung können ähnliche Argumente wie bei der Diskussion zur PMN-Phagozytose herangezogen werden (z.B. fehlende kooperierende Zellfraktionen, fehlendes Komplement).

Da bezüglich der Phagozytosekapazität und der ROS-Bildung keine LPS-vermittelten indirekten Effekte der MEC auf PMN nachweisbar waren, wurden diese beiden PMN-Funktionen in die LPS-Toleranzstudien nicht einbezogen.

### ***Die immortalisierte MAC-T eignet sich nur bedingt als Modellzelle***

Bei der MAC-T handelt es sich um eine etablierte Zelllinie, die bereits vielfach zu Studien bezüglich der Immunkompetenz der MEC herangezogen wurde<sup>7,267</sup>. Sie ist durch Transfektion mit der tsA-Mutante des Simian-Virus-40-Gens immortalisiert worden. Die schnell wachsende Zelle bildet alle Milchproteine und zeigt selbst nach 350-facher Passage keine Alterung<sup>264</sup>. Frühere Untersuchungen ergaben jedoch bereits eine eingeschränkte Vergleichbarkeit mit der pbMEC: Die Expression der mRNA für IL-8, IL-6 und TNF- $\alpha$  nach Stimulation ist bei der pbMEC um ein Vielfaches höher als bei der MAC-T. Sehr deutliche Unterschiede zeigten sich auch bei der Expression von IL-1 $\beta$  und  $\beta$ -Defensinen. Die pbMEC

reagiert auf die LPS-Stimulation mit einer 500-fach stärkeren Expression als die immortalisierte Zelle. Als Ursache für die Unterschiede werden die mehrfache Passagierung der MAC-T und der Immortalisierungsprozess vermutet<sup>7</sup>.

In der vorliegenden Arbeit wurde mit der MAC-T ein mit dem pbMEC-Modell vergleichbares In-vitro-Entzündungsmodell entwickelt. Sowohl die Präparation und Stimulation als auch die verwendeten Kulturmedien und Reagenzien waren identisch. Der Vergleich beider Modelle sollte Argumente zur Eignung der praktikableren MAC-T für In-vitro-Untersuchungen zur LPS-Toleranz und gegebenenfalls für andere immunologische Fragestellungen im Zusammenhang mit der MEC liefern.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass beide Zellen gleichsinnig auf die Stimulation mit LPS reagieren. Beide Zellen bilden chemoattraktive Substanzen. Nur musste die LPS-Konzentration hierbei entsprechend angepasst werden (siehe Abbildung 19 und Abbildung 20). Für die Stimulation der pbMEC war eine Mindestdosis von 50ng/ml LPS erforderlich, wohingegen die MAC-T mit 100µg/ml des gleichen LPS stimuliert werden musste, bis ein chemoattraktiver Effekt der Zellkulturüberstände für PMN nachweisbar war. Dies zeigt, dass die pbMEC wesentlich sensitiver gegenüber dem LPS ist als die MAC-T.

Auch die LPS-Toleranz konnte mit pbMEC und MAC-T in vergleichbarer Art und Weise dargestellt werden (siehe Abbildung 24 und Abbildung 25). Dies bestätigt, dass Untersuchungen zur Endotoxintoleranz auch an der MAC-T Zelle möglich sind. Der Vergleich der beiden Zellmodelle könnte für die genauere Aufklärung der dem LPS-Toleranz-Phänomen zu Grunde liegenden Mechanismen hilfreich sein. Die unterschiedliche Kompetenz der beiden MEC-Varianten zur Expression immunmodulatorischer Faktoren könnte durch Ausschlussverfahren den Kreis verantwortlicher Mediatoren einschränken. Entsprechende molekulargenetische Experimente sind in Nachfolgestudien vorgesehen.

#### **5.4 Schlussbetrachtung und Ausblick**

Mit der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, ein valides In-vitro-Entzündungsmodell zu etablieren, das die Induzierbarkeit einer

Endotoxintoleranz in der MEC beweist. Somit muss der pbMEC eine bedeutende Rolle bei der *in vivo* beobachteten LPS-Toleranz<sup>6</sup> zugesprochen werden. Erkenntnisse aus früheren Untersuchungen, die auf der Genexpression und Sekretion von Entzündungsmediatoren beruhen, ergeben Hinweise auf eine Beteiligung der MEC bei der initialen Erregererkennung und der daraus resultierenden Immunantwort<sup>7-8,70</sup>. Mit der vorliegenden Arbeit wird dies auch funktionell bestätigt: Erstmals konnte eine chemoattraktive Wirkung LPS-stimulierter MEC auf PMN *in vitro* gezeigt werden. Somit ist die pbMEC eine potentielle Schlüsselzelle, die durch Immunmodulatoren, zu denen auch das LPS zählt, gezielt beeinflusst werden kann. Mit der Ausnutzung des Endotoxintoleranzmechanismus bei der MEC ergeben sich denkbare Lösungsansätze, über Immunmodulatoren einen Schutz des Euters vor Mastitiden durch Gram-negative Erreger zu erzeugen. Im Rahmen eines Gesamtkonzepts zur Erforschung früher Erreger-Wirts-Interaktionen im Euter sollen auf der Basis der bisherigen In-vivo- und In-vitro-Experimente weiterführende Studien folgen, die zur Entwicklung neuer prophylaktischer und therapeutischer Ansätze bei der Bekämpfung von Mastitiden führen.

## 6 Zusammenfassung

Die Mastitis des Rindes ist die wirtschaftlich bedeutendste Einzeltierkrankung in der Milchproduktion, für die es bislang keine zufriedenstellenden Therapie- und Prophylaxekonzepte gibt. Akute, schwerwiegende Mastitiden werden besonders häufig durch *Escherichia coli* (*E. coli*) ausgelöst. Im Vordergrund der Pathogenese steht vor allem das Lipopolysaccharid (LPS, syn. Endotoxin), welches eine überschießende Immunantwort beim Wirt hervorrufen kann. Als Folge kann es zu schweren lokalen und systemischen Störungen, bleibenden Gewebeschäden in der Milchdrüse oder zum Tod des Tieres kommen. Die Endotoxintoleranz beschreibt einen Mechanismus, wonach der Organismus nach Kontakt mit Erregermustern (PAMPs, engl.: pathogen associated molecular patterns) innerhalb eines bestimmten Zeitrahmens auf eine nachfolgende Infektion mit einer deutlich herabgesetzten Immunantwort reagiert. Dies konnte *in vivo* im Rahmen eines assoziierten Projektes bereits für die *E. coli*-Mastitis des Rindes gezeigt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Konzept entwickelt, anhand dessen mögliche Mechanismen der im Euter induzierbaren Endotoxintoleranz *in vitro* untersucht werden können.

Zum einen wurden lösliche und zelluläre Faktoren im Milchsekret in Abhängigkeit von einer intramammären LPS-Behandlung auf ihre antibakteriellen Eigenschaften gegenüber *E. coli ex vivo* untersucht. Zum anderen wurde ein In-vitro-Entzündungsmodell etabliert, anhand dessen die Induzierbarkeit einer Endotoxintoleranz in der Milchdrüsenepithelzelle (MEC) geprüft werden sollte.

Ob die *in vivo* beobachtete abgeschwächte Wirtsantwort nach intramammärer LPS-Vorbehandlung in der Konsequenz die wachstumshemmende Kapazität des Milchsekretes bedingte, sollte *in vitro* im ersten Teil der Arbeit untersucht werden. Hierzu wurde das Wachstum von *E. coli* in steril gewonnener Vollmilch und zellfreier Magermilch 24h, 72h und 240h nach intramammärer LPS-Infusion der Spendertiere geprüft. In Vollmilch konnte nur 24h nach der LPS-Infusion eine Wachstumshemmung festgestellt werden. Die starke negative Korrelation (R=0,83) des In-vitro-Wachstums mit der zum Zeitpunkt der Probengewinnung in der Vollmilch ermittelten somatischen Zellzahl deutet auf einen zellvermittelten

Effekt hin. Die Wachstumshemmung 24h nach LPS-Infusion war vor allem innerhalb der ersten 8h deutlich zu sehen. Nach 24-stündiger Inkubation näherte sich die Keimzahl den Werten der Kontrolle an. In der zellfreien Magermilch konnte keine LPS-abhängige Veränderung der Wachstumskapazität für *E. coli* festgestellt werden. Somit ergab sich auch kein Hinweis auf eine effektive Erregerabwehr durch antimikrobielle, nicht-zelluläre Milchinhaltstoffe nach einer intramammären LPS-Behandlung.

Im Fokus zellulärer Abwehrmechanismen standen im zweiten Teil dieser Arbeit sowohl die Milchdrüsenepithelzelle (MEC) als vorherrschender Zelltyp im Euter als auch die polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) als wichtigste Effektorzellen bei der Mastitis. Um ihre Beteiligung an der *in vivo* induzierbaren Endotoxintoleranz zu untersuchen, wurde ein In-vitro-Entzündungsmodell etabliert. Hieran sollte geprüft werden, ob sich bei der primären bovinen Milchdrüsenepithelzelle (pbMEC) und einer immortalisierten bovinen Milchdrüsenepithelzelllinie (MAC-T) eine Endotoxintoleranz induzieren lässt. Zur Induktion einer Endotoxintoleranz wurden die Zellen zunächst mit LPS vorstimuliert und nach einer Ruhephase erneut stimuliert. Als Kontrolle wurden naive Zellen zu diesem Zeitpunkt ebenfalls mit LPS stimuliert. Die Zellkulturüberstände der MEC wurden daraufhin funktionell an PMN getestet: Überstände stimulierter MEC zeigten keinen Einfluss auf die Phagozytosekapazität und die Bildung reaktiver Sauerstoffmetaboliten (ROS) von PMN. Jedoch zeigten Überstände LPS-stimulierter MEC eine starke chemoattraktive Wirkung gegenüber PMN in der Transmigrationskammer. Somit wurde im Folgenden die Versuchsanordnung basierend auf der Synthese chemoattraktiver Faktoren gewählt. Sowohl in der pbMEC- als auch in der MAC-T-Kultur konnte eine Endotoxintoleranz *in vitro* induziert werden. Hierbei zeigte sich die Endotoxintoleranz in einer signifikant verminderten Migration von PMN auf Zellkulturüberstände wiederholt stimulierter MEC gegenüber naiven MEC. Somit gaben vorstimulierte MEC weniger chemoattraktive Substanzen an das Zellkulturmedium ab als naive Zellen nach erstmaliger LPS-Stimulation. Es konnte auch gezeigt werden, dass die MAC-T-Zelllinie neben der Primärkultur für derartige Untersuchungen geeignet ist, jedoch weniger empfindlich auf eine LPS-Stimulation reagiert.

In dieser Arbeit konnten erstmalig Transkriptom-Analysen der MEC um

funktionelle Studien ergänzt werden. Hierbei zeigte sich, dass die MEC nach Kontakt mit LPS in der Lage ist, chemoattraktive Faktoren zu sezernieren. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass sich die im Tiermodell beobachtete Endotoxintoleranz im Rahmen der bovinen Mastitis im Zellmodell mit der MEC simulieren und untersuchen lässt. Das hier etablierte Modell und die *in vitro* gewonnenen Erkenntnisse werden dazu beitragen, zukünftig molekulare Mechanismen der Endotoxintoleranz in der Milchdrüse aufzuklären. Ein tieferes Verständnis über die Modulierbarkeit zellulärer Mechanismen im Euter ist die Grundlage für neue immunologische Prophylaxestrategien bei der Mastitis des Rindes.

(Gefördert aus Mitteln der H.WILHELM SCHAUMANN STIFTUNG)

## 7 Summary

Eva Kalivoda, maiden name Kemeter (2010): Functional investigations into endotoxin induced tolerance mechanisms in bovine mastitis

Due to the current lack of satisfactory treatment or prophylaxis, bovine mastitis has a major economic impact on global dairy industries. Acute, severe mastitis is often caused by an intramammary *E. coli* infection. The main pathogenic component of *E. coli* is lipopolysaccharide (LPS), which can initiate an overshooting immune response. In the course of infection severe local and systemic signs can occur and may lead to permanent tissue damage of the udder or even the death of the animal. If a host animal is repeatedly confronted with pathogens or its associated molecules (PAMPs, pathogen associated molecular patterns), the immune response might be markedly decreased. This mechanism is known as endotoxin tolerance and has been described *in vivo* for *E. coli* mastitis in cattle in an associated study.

The aim of the current study was to develop an *in vitro* model to examine potential mechanisms of endotoxin tolerance against the background of *E. coli* mastitis. Therefore milk of cows was tested for its antibacterial properties *ex vivo* after intramammary LPS treatment. Additionally an *in vitro* inflammation model was established to induce endotoxin tolerance in mammary epithelial cells (MEC).

Whether the observed reduced host response to intramammary *E. coli* challenge after a previous LPS treatment *in vivo* was the consequence of an increased antibacterial capacity of the milk secretion was to be tested *in vitro* in the first part of this study. Therefore *E. coli* growth was assessed in aseptically collected whole milk and cell depleted whey 24h, 72h and 240h after intramammary LPS treatment. Whole milk showed to have a growth inhibiting effect on *E. coli* 24h after intramammary LPS infusion. The strong negative correlation (R=0,83) of growth *in vitro* with the somatic cell count at the corresponding time point suggested a cell mediated effect on *E. coli* growth. This inhibitory effect was mainly to be seen during the first 8h of *E. coli* growth. After 24h of incubation the number of bacteria converged with those of the control. In cell depleted whey no LPS dependent alteration was detected for *E. coli* growth. Thus no potential

defence mechanisms by soluble antimicrobial factors could be detected after intramammary LPS treatment.

The second part of this study focussed on cellular defence mechanisms. The mammary epithelial cell (MEC) as the most abundant cell type in the udder as well as polymorphonuclear neutrophils (PMN) as the predominant effector cell population during mastitis served as model cells. To investigate their contribution to an induced endotoxin tolerance in the udder an *in vitro* inflammation model was established. Experiments were carried out in parallel with primary mammary epithelial cells (pbMEC) and with an immortalized cell line (MAC-T). To induce an endotoxin tolerance, cells were initially stimulated with LPS, left to rest and restimulated after 33h. As a control, naïve cells were simultaneously stimulated. The supernatants were finally tested for their functional effects on PMN *in vitro*. Supernatants of stimulated MEC showed no modulatory effect on PMN phagocytosis and oxidatory burst activity compared to unstimulated MEC. However LPS stimulated MEC released chemoattractive factors increasing PMN migration rates in the chemotaxis chamber. Hence the following experiments were based on the synthesis of chemoattractive factors by MEC. In both, pbMEC as well as MAC-T we could induce endotoxin tolerance *in vitro*. This manifested itself in a significant decreased migration rate of PMN towards supernatants of repeatedly stimulated MEC in comparison to only once stimulated MEC. Thus prestimulated MEC produced chemokines into the supernatant to a lesser extent than naïve MEC after the first stimulation. In parallel it was shown that MAC-T cells are a valid system for these experiments but are less sensitive to LPS than pbMEC.

In this study we could show for the first time functional data for the immune regulatory role of MEC as an upgrade to transcriptome analysis. It became evident, that the MEC is capable of secreting chemoattractive factors after LPS stimulation. Additionally it was shown that the observed endotoxin tolerance during *E. coli* mastitis *in vivo* can be simulated in an *in vitro* model system. The here established model will contribute to clarify molecular mechanisms of endotoxin tolerance in the bovine mammary gland. Profound knowledge about modulating cellular mechanisms in the udder is the basis for novel immunological prophylaxis strategies against bovine mastitis.

(Supported by H.WILHELM SCHAUMANN STIFTUNG)

## 8 Literaturverzeichnis

1. Miller GY, Bartlett PC, Lance SE, et al. Costs of clinical mastitis and mastitis prevention in dairy herds. *J Am Vet Med Assoc* 1993;202:1230-1236.
2. Bannerman DD, Paape MJ, Goff JP, et al. Innate immune response to intramammary infection with *Serratia marcescens* and *Streptococcus uberis*. *Vet Res* 2004;35:681-700.
3. Burvenich C, Van Merris V, Mehrzad J, et al. Severity of *E. coli* mastitis is mainly determined by cow factors. *Vet Res* 2003;34:521-564.
4. Cavaillon JM, Adib-Conquy M. Bench-to-bedside review: endotoxin tolerance as a model of leukocyte reprogramming in sepsis. *Crit Care* 2006;10:233.
5. Broad A, Jones DE, Kirby JA. Toll-like receptor (TLR) response tolerance: a key physiological "damage limitation" effect and an important potential opportunity for therapy. *Curr Med Chem* 2006;13:2487-2502.
6. Pfister T. Untersuchungen zur Endotoxintoleranz bei der Mastitis des Rindes. *Diss* 2009;Ludwig- Maximilians-Universität, München.
7. Strandberg Y, Gray C, Vuocolo T, et al. Lipopolysaccharide and lipoteichoic acid induce different innate immune responses in bovine mammary epithelial cells. *Cytokine* 2005;31:72-86.
8. Wellnitz O, Kerr DE. Cryopreserved bovine mammary cells to model epithelial response to infection. *Vet Immunol Immunopathol* 2004;101:191-202.
9. Halasa T, Huijps K, Osteras O, et al. Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: a review. *Vet Q* 2007;29:18-31.

10. Huijps K, Lam TJ, Hogeveen H. Costs of mastitis: facts and perception. *J Dairy Res* 2008;75:113-120.
11. Kawai K, Shimazaki K, Higuchi H, et al. Antibacterial activity of bovine lactoferrin hydrolysate against mastitis pathogens and its effect on superoxide production of bovine neutrophils. *Zoonoses Public Health* 2007;54:160-164.
12. Dutt KW, Eberhart RJ, Wilson RA. In vitro growth of mastitis pathogens in mammary secretions of the dry and peripartum periods. *J Dairy Sci* 1986;69:2408-2415.
13. Zhao X, Lacasse P. Mammary tissue damage during bovine mastitis: causes and control. *J Anim Sci* 2008;86:57-65.
14. Bradley A. Bovine mastitis: an evolving disease. *Vet J* 2002;164:116-128.
15. Erskine RJ, Eberhart RJ, Hutchinson LJ, et al. Incidence and types of clinical mastitis in dairy herds with high and low somatic cell counts. *J Am Vet Med Assoc* 1988;192:761-765.
16. Hogan J, Larry Smith K. Coliform mastitis. *Vet Res* 2003;34:507-519.
17. Smith KL, Hogan JS. Environmental mastitis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 1993;9:489-498.
18. Frost AJ, Wanasinghe DD, Woolcock JB. Some factors affecting selective adherence of microorganisms in the bovine mammary gland. *Infect Immun* 1977;15:245-253.
19. Opdebeeck JP, Frost AJ, O'Boyle D. Adhesion of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to bovine udder epithelial cells. *Vet Microbiol* 1988;16:77-86.

20. Rolle M, Mayr, A. Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. 7 Aufl, Verlag Enke, Stuttgart 2002.
21. Kornalijnslijper JE, Daemen AJ, van Werven T, et al. Bacterial growth during the early phase of infection determines the severity of experimental *Escherichia coli* mastitis in dairy cows. *Vet Microbiol* 2004;101:177-186.
22. Petersson-Wolfe CS, Wolf SL, Hogan JS. In vitro growth of enterococci of bovine origin in bovine mammary secretions from various stages of lactation. *J Dairy Sci* 2007;90:4226-4231.
23. Fang W, Luther DA, Almeida RA, et al. Decreased growth of *Streptococcus uberis* in milk from mammary glands of cows challenged with the same mastitis pathogen. *Zentralbl Veterinarmed B* 1998;45:539-549.
24. Lammers A, Kruijt E, van de Kuijt C, et al. Identification of *Staphylococcus aureus* genes expressed during growth in milk: a useful model for selection of genes important in bovine mastitis? *Microbiology* 2000;146:981-987.
25. Leigh JA, Field TR, Williams MR. Two strains of *Streptococcus uberis*, of differing ability to cause clinical mastitis, differ in their ability to resist some host defence factors. *Res Vet Sci* 1990;49:85-87.
26. Kornalijnslijper JE, van Werven T, Daemen AJ, et al. In vitro growth of mastitis-inducing *Escherichia coli* in milk and milk fractions of dairy cows. *Vet Microbiol* 2003;91:125-134.
27. Burvenich C, Paape MJ, Hoeben D, et al. Modulation of the inflammatory reaction and neutrophil defense of the bovine lactating mammary gland by growth hormone. *Domest Anim Endocrinol* 1999;17:149-159.
28. Lohuis JA, Van Leeuwen W, Verheijden JH, et al. Growth of *Escherichia coli* in whole and skim milk from endotoxin-induced mastitic quarters: in vitro effects of deferroxamine, zinc, and iron supplementation. *J Dairy Sci*

1988;71:2772-2781.

29. Burton JL, Erskine RJ. Immunity and mastitis. Some new ideas for an old disease. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 2003;19:1-45.

30. Paape M, Mehrzad J, Zhao X, et al. Defense of the bovine mammary gland by polymorphonuclear neutrophil leukocytes. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2002;7:109-121.

31. Leitner G, Eligulashvily R, Krifucks O, et al. Immune cell differentiation in mammary gland tissues and milk of cows chronically infected with *Staphylococcus aureus*. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2003;50:45-52.

32. Sordillo LM, Campos M, Babiuk LA. Antibacterial activity of bovine mammary gland lymphocytes following treatment with interleukin-2. *J Dairy Sci* 1991;74:3370-3375.

33. Tatarczuch L, Philip C, Bischof R, et al. Leucocyte phenotypes in involuting and fully involuted mammary glandular tissues and secretions of sheep. *J Anat* 2000;196:313-326.

34. Paape MJ, Bannerman DD, Zhao X, et al. The bovine neutrophil: Structure and function in blood and milk. *Vet Res* 2003;34:597-627.

35. Roitt. Kurzes Lehrbuch der Immunologie *Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York* 1995.

36. Dürr Ku. Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin. *Verlag Schattauer Stuttgart, New York* 2005;

37. Dore M, Slauson DO, Neilsen NR. Membrane NADPH oxidase activity and cell size in bovine neonatal and adult neutrophils. *Pediatr Res* 1990;28:327-331.

38. Kayser. Medizinische Mikrobiologie. *Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York* 2001.
39. Paape MJ, Wergin WP, Guidry AJ, et al. Phagocytic defense of the ruminant mammary gland. *Adv Exp Med Biol* 1981;137:555-578.
40. Poutrel B, Rainard P. Predicting the probability of quarter infection (by major pathogens) from somatic cell concentration. *Am J Vet Res* 1982;43:1296-1299.
41. Baggiolini M, Boulay F, Badwey JA, et al. Activation of neutrophil leukocytes: chemoattractant receptors and respiratory burst. *FASEB J* 1993;7:1004-1010.
42. Bokoch GM. Chemoattractant signaling and leukocyte activation. *Blood* 1995;86:1649-1660.
43. Burmester G-R, Pezzutto, A. Taschenatlas der Immunologie. *1 Aufl, Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York* 1998.
44. Paape MJ, Lilius EM, Wiitanen PA, et al. Intramammary defense against infections induced by *Escherichia coli* in cows. *Am J Vet Res* 1996;57:477-482.
45. Jain NC, Lasmanis J. Phagocytosis of serum-resistant and serum-sensitive coliform bacteria (*Klebsiella*) by bovine neutrophils from blood and mastitic milk. *Am J Vet Res* 1978;39:425-427.
46. Kent GM, Newbould FH. Phagocytosis and related phenomena in polymorphonuclear leukocytes from cow's milk. *Can J Comp Med* 1969;33:214-219.
47. Paape MJ, Guidry AJ, Kirk ST, et al. Measurement of phagocytosis of <sup>32</sup>P-labeled *Staphylococcus aureus* by bovine leukocytes: lysostaphin digestion

and inhibitory effect of cream. *Am J Vet Res* 1975;36:1737-1743.

48. Russell MW, Brooker BE, Reiter B. Electron microscopic observations of the interaction of casein micelles and milk fat globules with bovine polymorphonuclear leucocytes during the phagocytosis of staphylococci in milk. *J Comp Pathol* 1977;87:43-52.

49. Zembala M AGL. Human Monocytes. *Academic Press, New York* 1989.

50. Hildebrandt H. Pschyrembel Klinisches Wörterbuch 1998.

51. Adler H, Peterhans E, Jungi TW. Generation and functional characterization of bovine bone marrow-derived macrophages. *Vet Immunol Immunopathol* 1994;41:211-227.

52. Jungi TW, Sager H, Adler H, et al. Serum factors, cell membrane CD14, and beta2 integrins are not required for activation of bovine macrophages by lipopolysaccharide. *Infect Immun* 1997;65:3577-3584.

53. Yang Z, Carter CD, Miller MS, et al. CD14 and tissue factor expression by bacterial lipopolysaccharide-stimulated bovine alveolar macrophages in vitro. *Infect Immun* 1995;63:51-56.

54. Yang Z, Mason GL, Slauson DO, et al. Analysis of the CD14 receptor associated with bovine alveolar macrophages. *Inflammation* 1996;20:97-106.

55. Mullan NA, Carter EA, Nguyen KA. Phagocytic and bactericidal properties of bovine macrophages from non-lactating mammary glands. *Res Vet Sci* 1985;38:160-166.

56. Diment S, Stahl P. Macrophage endosomes contain proteases which degrade endocytosed protein ligands. *J Biol Chem* 1985;260:15311-15317.

57. Janeway CA, Travers , P., Walport, M., Shlomchik, M. Immunologie. 5 Aufl Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg;Berlin 2002.
58. Bounous DI, Enright FM, Gossett KA, et al. Comparison of oxidant production by bovine neutrophils and monocyte-derived macrophages stimulated with *Brucella abortus* strain 2308. *Inflammation* 1992;16:215-225.
59. Forman HJ, Torres M. Reactive oxygen species and cell signaling: respiratory burst in macrophage signaling. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166:S4-8.
60. Goff WL, Johnson WC, Wyatt CR, et al. Assessment of bovine mononuclear phagocytes and neutrophils for induced L-arginine-dependent nitric oxide production. *Vet Immunol Immunopathol* 1996;55:45-62.
61. Adler H, Peterhans E, Nicolet J, et al. Inducible L-arginine-dependent nitric oxide synthase activity in bovine bone marrow-derived macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;198:510-515.
62. Aldwell FE, Wedlock DN, Buddle BM. Sequential activation of alveolar macrophages by IFN-gamma and LPS is required for enhanced growth inhibition of virulent *Mycobacterium bovis* but not *M. bovis* BCG. *Immunol Cell Biol* 1997;75:161-166.
63. Stich RW, Shoda LK, Dreewes M, et al. Stimulation of nitric oxide production in macrophages by *Babesia bovis*. *Infect Immun* 1998;66:4130-4136.
64. MacMicking J, Xie QW, Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol* 1997;15:323-350.
65. Akira S, Kishimoto T. Role of interleukin-6 in macrophage function. *Curr Opin Hematol* 1996;3:87-93.

66. Norimatsu M, Harris J, Chance V, et al. Differential response of bovine monocyte-derived macrophages and dendritic cells to infection with *Salmonella typhimurium* in a low-dose model in vitro. *Immunology* 2003;108:55-61.
67. Kim JM, Kim JS, Jun HC, et al. Differential expression and polarized secretion of CXC and CC chemokines by human intestinal epithelial cancer cell lines in response to *Clostridium difficile* toxin A. *Microbiol Immunol* 2002;46:333-342.
68. Meyer-Hoffert U, Lezcano-Meza D, Bartels J, et al. Th2- and to a lesser extent Th1-type cytokines upregulate the production of both CXC (IL-8 and gro-alpha) and CC (RANTES, eotaxin, eotaxin-2, MCP-3 and MCP-4) chemokines in human airway epithelial cells. *Int Arch Allergy Immunol* 2003;131:264-271.
69. Lahouassa H, Moussay E, Rainard P, et al. Differential cytokine and chemokine responses of bovine mammary epithelial cells to *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Cytokine* 2007;38:12-21.
70. Okada H, Ohtsuka H, Kon Nai S, et al. Effects of lipopolysaccharide on production of interleukin-1 and interleukin-6 by bovine mammary epithelial cells in vitro. *J Vet Med Sci* 1999;61:33-35.
71. Okada H, Ito T, Ohtsuka H, et al. Detection of interleukin-1 and interleukin-6 on cryopreserved bovine mammary epithelial cells in vitro. *J Vet Med Sci* 1997;59:503-507.
72. Talhouk RS, Neiswander RL, Schanbacher FL. Effect of substratum on growth, cell morphology and lactoferrin synthesis and secretion in bovine mammary cell culture. *Tissue Cell* 1998;30:226-235.
73. Yang W, Molenaar A, Kurts-Ebert B, et al. NF-kappaB factors are essential, but not the switch, for pathogen-related induction of the bovine beta-defensin 5-encoding gene in mammary epithelial cells. *Mol Immunol* 2006;43:210-225.

74. Uhlar CM, Whitehead AS. Serum amyloid A, the major vertebrate acute-phase reactant. *Eur J Biochem* 1999;265:501-523.
75. Rainard P, Poutrel B. Deposition of complement components on *Streptococcus agalactiae* in bovine milk in the absence of inflammation. *Infect Immun* 1995;63:3422-3427.
76. Rainard P, Sarradin P, Paape MJ, et al. Quantification of C5a/C5a(desArg) in bovine plasma, serum and milk. *Vet Res* 1998;29:73-88.
77. Persson K, Larsson I, Hallen Sandgren C. Effects of certain inflammatory mediators on bovine neutrophil migration in vivo and in vitro. *Vet Immunol Immunopathol* 1993;37:99-112.
78. Smits E, Cifrian E, Guidry AJ, et al. Cell culture system for studying bovine neutrophil diapedesis. *J Dairy Sci* 1996;79:1353-1360.
79. Riollet C, Rainard P, Poutrel B. Differential induction of complement fragment C5a and inflammatory cytokines during intramammary infections with *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Clin Diagn Lab Immunol* 2000;7:161-167.
80. Mueller R, Carroll EJ, Panico L. Hemolytic complement titers and complement C3 levels in endotoxin-induced mastitis. *Am J Vet Res* 1983;44:1442-1445.
81. Targowski SP. Role of immune factors in protection of mammary gland. *J Dairy Sci* 1983;66:1781-1789.
82. Legrand D, Ellass E, Pierce A, et al. Lactoferrin and host defence: an overview of its immuno-modulating and anti-inflammatory properties. *Biometals* 2004;17:225-229.

83. Harmon RJ, Newbould, F.H.S. Neutrophil leucocyte as a source of lactoferrin in bovine milk. *AmJVetRes* 1980;41:1603-1606
  
84. Molenaar AJ, Kuys YM, Davis SR, et al. Elevation of lactoferrin gene expression in developing, ductal, resting, and regressing parenchymal epithelium of the ruminant mammary gland. *J Dairy Sci* 1996;79:1198-1208.
  
85. Rainard P. Bacteriostatic activity of bovine milk lactoferrin against mastitic bacteria. *Vet Microbiol* 1986;11:387-392.
  
86. Orsi N. The antimicrobial activity of lactoferrin: current status and perspectives. *Biometals* 2004;17:189-196.
  
87. Rainard P. Experimental mastitis with *Escherichia coli*: kinetics of bacteriostatic and bactericidal activities. *Ann Rech Vet* 1983;14:1-11.
  
88. Mattsby-Baltzer I, Roseanu A, Motas C, et al. Lactoferrin or a fragment thereof inhibits the endotoxin-induced interleukin-6 response in human monocytic cells. *Pediatr Res* 1996;40:257-262.
  
89. Sordillo LM, Streicher KL. Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2002;7:135-146.
  
90. Persson K, Carlsson A, Hambleton C, et al. Immunoglobulins, lysozyme and lactoferrin in the teat and udder of the dry cow during endotoxin-induced inflammation. *Zentralbl Veterinarmed B* 1992;39:165-174.
  
91. Reiter B. Protective proteins in milk-Biological significans and exploitation. Lysozym,laktoferrin,lactoperoxidase, xanthineoxidase. *BullIntDairy Fed* 1985;191:1-35.
  
92. Hancock JT, Salisbury V, Ovejero-Boglionne MC, et al. Antimicrobial

properties of milk: dependence on presence of xanthine oxidase and nitrite. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:3308-3310.

93. Schroder JM. Epithelial antimicrobial peptides: innate local host response elements. *Cell Mol Life Sci* 1999;56:32-46.

94. Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 2002;415:389-395.

95. Diamond G, Kaiser V, Rhodes J, et al. Transcriptional regulation of beta-defensin gene expression in tracheal epithelial cells. *Infect Immun* 2000;68:113-119.

96. Diamond G, Russell JP, Bevins CL. Inducible expression of an antibiotic peptide gene in lipopolysaccharide-challenged tracheal epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:5156-5160.

97. Midorikawa K, Ouhara K, Komatsuzawa H, et al. Staphylococcus aureus susceptibility to innate antimicrobial peptides, beta-defensins and CAP18, expressed by human keratinocytes. *Infect Immun* 2003;71:3730-3739.

98. Schonwetter BS, Stolzenberg ED, Zasloff MA. Epithelial antibiotics induced at sites of inflammation. *Science* 1995;267:1645-1648.

99. Stolzenberg ED, Anderson GM, Ackermann MR, et al. Epithelial antibiotic induced in states of disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:8686-8690.

100. Tarver AP, Clark DP, Diamond G, et al. Enteric beta-defensin: molecular cloning and characterization of a gene with inducible intestinal epithelial cell expression associated with *Cryptosporidium parvum* infection. *Infect Immun* 1998;66:1045-1056.

101. Becker MN, Diamond G, Verghese MW, et al. CD14-dependent lipopolysaccharide-induced beta-defensin-2 expression in human tracheobronchial epithelium. *J Biol Chem* 2000;275:29731-29736.
102. Goldammer T, Zerbe H, Molenaar A, et al. Mastitis increases mammary mRNA abundance of beta-defensin 5, toll-like-receptor 2 (TLR2), and TLR4 but not TLR9 in cattle. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004;11:174-185.
103. Sordillo LM, Babiuk LA. Controlling acute *Escherichia coli* mastitis during the periparturient period with recombinant bovine interferon gamma. *Vet Microbiol* 1991;28:189-198.
104. Bannerman DD, Paape MJ, Lee JW, et al. *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* elicit differential innate immune responses following intramammary infection. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004;11:463-472.
105. Persson Waller K, Gronlund U, Johannisson A. Intramammary infusion of beta1,3-glucan for prevention and treatment of *Staphylococcus aureus* mastitis. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2003;50:121-127.
106. Slebodzinski AB, Malinowski E, Lipczak W. Concentrations of triiodothyronine (T3), tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and interleukin-6 (IL-6) in milk from healthy and naturally infected quarters of cows. *Res Vet Sci* 2002;72:17-21.
107. Targowski SP, Niemialtowski M. Inhibition of lacteal leukocyte phagocytosis by colostrum, nonlactating secretion, and mastitic milk. *Am J Vet Res* 1986;47:1940-1945.
108. Guidry AJ, Berning LM, Hambleton CN. Opsonization of *Staphylococcus aureus* by bovine immunoglobulin isotypes. *J Dairy Sci* 1993;76:1285-1289.
109. Hill AW, Heneghan DJ, Field TR, et al. Increase in specific opsonic

activity in bovine milk following experimental *Escherichia coli* mastitis. *Res Vet Sci* 1983;35:222-226.

110. Hogan JS, Todhunter DA, Tomita GM, et al. Opsonic activity of bovine serum and mammary secretion after *Escherichia coli* J5 vaccination. *J Dairy Sci* 1992;75:72-77.

111. Miller RH, Guidry AJ, Paape MJ, et al. Relationship between immunoglobulin concentrations in milk and phagocytosis by bovine neutrophils. *Am J Vet Res* 1988;49:42-45.

112. Watson E. Specific antibody in milk whey and phagocytosis of *Actinomyces pyogenes* by neutrophils in vitro. *Res Vet Sci* 1989;47:253-256.

113. Nonnecke BJ, Harp JA. Function and regulation of lymphocyte-mediated immune responses: relevance to bovine mastitis. *J Dairy Sci* 1989;72:1313-1327.

114. Rainard P, Poutrel B. Generation of complement fragment C5a in milk is variable among cows. *J Dairy Sci* 2000;83:945-951.

115. Schleiffenbaum B, Spertini O, Tedder TF. Soluble L-selectin is present in human plasma at high levels and retains functional activity. *J Cell Biol* 1992;119:229-238.

116. Mackie DP, Logan EF. Changes in immunoglobulin levels in whey during experimental *Streptococcus agalactiae* mastitis. *Res Vet Sci* 1986;40:183-188.

117. Rainard P, Caffin JP. Sequential changes in serum albumin, immunoglobulin (IgG1, IgG2, IgM) and lactoferrin concentrations in milk following infusion of *Escherichia coli* into the udder of immunised and unimmunised cows. *Ann Rech Vet* 1983;14:271-279.

118. McGuire TC, Musoke AJ, Kurtti T. Functional properties of bovine IgG1

and IgG2: interaction with complement, macrophages, neutrophils and skin. *Immunology* 1979;38:249-256.

119. Rainard P, Lautrou Y, Poutrel B. Ingestion and killing of *Streptococcus agalactiae* by bovine granulocytes in the presence of natural opsonins. *Vet Microbiol* 1988;18:41-50.

120. Watson E. Cytophilic attachment of ovine IgG2 to autologous polymorphonuclear leucocytes. *Aust J Exp Biol Med Sci* 1975;53:527-529.

121. Colditz IG, Watson DL. The immunophysiological basis for vaccinating ruminants against mastitis. *Aust Vet J* 1985;62:145-153.

122. Leitner G, Yadlin B, Glickman A, et al. Systemic and local immune response of cows to intramammary infection with *Staphylococcus aureus*. *Res Vet Sci* 2000;69:181-184.

123. Paape MJ, Shafer-Weaver K, Capuco AV, et al. Immune surveillance of mammary tissue by phagocytic cells. *Adv Exp Med Biol* 2000;480:259-277.

124. Wang Y, Paape, M.J., Worku, M. Detection and identification of soluble CD14 in bovine milk. *J Cell BiolMol cell* 1997;8:A85.

125. Filipp D, Alizadeh-Khiavi K, Richardson C, et al. Soluble CD14 enriched in colostrum and milk induces B cell growth and differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:603-608.

126. Rainard P, Poutrel B, Caffin JP. Lactoferrin and transferrin in bovine milk in relation to certain physiological and pathological factors. *Ann Rech Vet* 1982;13:321-328.

127. Soler-Rodriguez AM, Zhang H, Lichenstein HS, et al. Neutrophil

activation by bacterial lipoprotein versus lipopolysaccharide: differential requirements for serum and CD14. *J Immunol* 2000;164:2674-2683.

128. Wang Y, Zarlenga DS, Paape MJ, et al. Recombinant bovine soluble CD14 sensitizes the mammary gland to lipopolysaccharide. *Vet Immunol Immunopathol* 2002;86:115-124.

129. De Schepper S, De Ketelaere A, Bannerman DD, et al. The toll-like receptor-4 (TLR-4) pathway and its possible role in the pathogenesis of *Escherichia coli* mastitis in dairy cattle. *Vet Res* 2008;39:5.

130. Erridge C, Bennett-Guerrero E, Poxton IR. Structure and function of lipopolysaccharides. *Microbes Infect* 2002;4:837-851.

131. Raetz CR. Biochemistry of endotoxins. *Annu Rev Biochem* 1990;59:129-170.

132. Cullor JS, Tyler JW. Mammary gland health and disorders. In Large Animal Internal Medicine. Eds Smith BP & Mosby CV St Louis: Elsevier Health Science 2001;3:1177-1197.

133. Caroff M, Karibian D, Cavaillon JM, et al. Structural and functional analyses of bacterial lipopolysaccharides. *Microbes Infect* 2002;4:915-926.

134. Haeffner-Cavaillon N, Caroff M, Cavaillon JM. Interleukin-1 induction by lipopolysaccharides: structural requirements of the 3-deoxy-D-manno-2-octulosonic acid (KDO). *Mol Immunol* 1989;26:485-494.

135. Muroi M, Tanamoto K. The polysaccharide portion plays an indispensable role in *Salmonella* lipopolysaccharide-induced activation of NF-kappaB through human toll-like receptor 4. *Infect Immun* 2002;70:6043-6047.

136. Caroff M, Karibian D. Structure of bacterial lipopolysaccharides.

*Carbohydr Res* 2003;338:2431-2447.

137. Carroll EJ, Schalm OW, Lasmanis J. Experimental Coliform (Aerobacter Aerogenes) Mastitis: Characteristics of the Endotoxin and Its Role in Pathogenesis. *Am J Vet Res* 1964;25:720-726.

138. Bruckmaier RM, Weiss D, Wiedemann M, et al. Changes of physicochemical indicators during mastitis and the effects of milk ejection on their sensitivity. *J Dairy Res* 2004;71:316-321.

139. Alexander C, Rietschel ET. Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. *J Endotoxin Res* 2001;7:167-202.

140. Gay NJ, Keith FJ. Drosophila Toll and IL-1 receptor. *Nature* 1991;351:355-356.

141. Mishra BB, Gundra UM, Teale JM. Expression and distribution of Toll-like receptors 11-13 in the brain during murine neurocysticercosis. *J Neuroinflammation* 2008;5:53.

142. Armant MA, Fenton MJ. Toll-like receptors: a family of pattern-recognition receptors in mammals. *Genome Biol* 2002;3:REVIEWS3011.

143. Crozat K, Beutler B. TLR7: A new sensor of viral infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:6835-6836.

144. Medzhitov R, Janeway CA, Jr. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* 1997;91:295-298.

145. Shimazu R, Akashi S, Ogata H, et al. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med* 1999;189:1777-1782.

146. Akashi S, Shimazu R, Ogata H, et al. Cutting edge: cell surface expression and lipopolysaccharide signaling via the toll-like receptor 4-MD-2 complex on mouse peritoneal macrophages. *J Immunol* 2000;164:3471-3475.
147. Ingalls RR, Arnaout MA, Golenbock DT. Outside-in signaling by lipopolysaccharide through a tailless integrin. *J Immunol* 1997;159:433-438.
148. Schumann RR, Latz E. Lipopolysaccharide-binding protein. *Chem Immunol* 2000;74:42-60.
149. Tobias PS, Tapping RI, Gegner JA. Endotoxin interactions with lipopolysaccharide-responsive cells. *Clin Infect Dis* 1999;28:476-481.
150. Triantafilou M, Triantafilou K. Lipopolysaccharide recognition: CD14, TLRs and the LPS-activation cluster. *Trends Immunol* 2002;23:301-304.
151. Vogel SN, Fitzgerald KA, Fenton MJ. TLRs: differential adapter utilization by toll-like receptors mediates TLR-specific patterns of gene expression. *Mol Interv* 2003;3:466-477.
152. Fitzgerald KA, Palsson-McDermott EM, Bowie AG, et al. Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature* 2001;413:78-83.
153. Horng T, Barton GM, Medzhitov R. TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. *Nat Immunol* 2001;2:835-841.
154. Li S, Strelow A, Fontana EJ, et al. IRAK-4: a novel member of the IRAK family with the properties of an IRAK-kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:5567-5572.
155. Cao Z, Xiong J, Takeuchi M, et al. TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1. *Nature* 1996;383:443-446.

156. Kollwe C, Mackensen AC, Neumann D, et al. Sequential autophosphorylation steps in the interleukin-1 receptor-associated kinase-1 regulate its availability as an adapter in interleukin-1 signaling. *J Biol Chem* 2004;279:5227-5236.
157. Li L, Cousart S, Hu J, et al. Characterization of interleukin-1 receptor-associated kinase in normal and endotoxin-tolerant cells. *J Biol Chem* 2000;275:23340-23345.
158. Swantek JL, Tsen MF, Cobb MH, et al. IL-1 receptor-associated kinase modulates host responsiveness to endotoxin. *J Immunol* 2000;164:4301-4306.
159. Fitzgerald KA, Rowe DC, Barnes BJ, et al. LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF. *J Exp Med* 2003;198:1043-1055.
160. Oshiumi H, Sasai M, Shida K, et al. TIR-containing adapter molecule (TICAM)-2, a bridging adapter recruiting to toll-like receptor 4 TICAM-1 that induces interferon-beta. *J Biol Chem* 2003;278:49751-49762.
161. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, et al. TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat Immunol* 2003;4:1144-1150.
162. Meylan E, Burns K, Hofmann K, et al. RIP1 is an essential mediator of Toll-like receptor 3-induced NF-kappa B activation. *Nat Immunol* 2004;5:503-507.
163. Sato S, Sugiyama M, Yamamoto M, et al. Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN-beta (TRIF) associates with TNF receptor-associated factor 6 and TANK-binding kinase 1, and activates two distinct transcription factors, NF-kappa B and IFN-regulatory factor-3, in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol* 2003;171:4304-4310.

164. Baldwin AS, Jr. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 1996;14:649-683.
165. Bone RC. Gram-negative sepsis. Background, clinical features, and intervention. *Chest* 1991;100:802-808.
166. Lee JJ, Burckart GJ. Nuclear factor kappa B: important transcription factor and therapeutic target. *J Clin Pharmacol* 1998;38:981-993.
167. Martich GD, Boujoukos AJ, Suffredini AF. Response of man to endotoxin. *Immunobiology* 1993;187:403-416.
168. Boudjellab N, Chan-Tang HS, Zhao X. Bovine interleukin-1 expression by cultured mammary epithelial cells (MAC-T) and its involvement in the release of MAC-T derived interleukin-8. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2000;127:191-199.
169. Larsen CG, Anderson AO, Oppenheim JJ, et al. Production of interleukin-8 by human dermal fibroblasts and keratinocytes in response to interleukin-1 or tumour necrosis factor. *Immunology* 1989;68:31-36.
170. Nourshargh S, Perkins JA, Showell HJ, et al. A comparative study of the neutrophil stimulatory activity in vitro and pro-inflammatory properties in vivo of 72 amino acid and 77 amino acid IL-8. *J Immunol* 1992;148:106-111.
171. Bannerman DD, Erwert RD, Winn RK, et al. TIRAP mediates endotoxin-induced NF-kappaB activation and apoptosis in endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;295:157-162.
172. Bannerman DD, Tupper JC, Erwert RD, et al. Divergence of bacterial lipopolysaccharide pro-apoptotic signaling downstream of IRAK-1. *J Biol Chem* 2002;277:8048-8053.

173. Hull C, McLean G, Wong F, et al. Lipopolysaccharide signals an endothelial apoptosis pathway through TNF receptor-associated factor 6-mediated activation of c-Jun NH2-terminal kinase. *J Immunol* 2002;169:2611-2618.
174. Kaiser WJ, Offermann MK. Apoptosis induced by the toll-like receptor adaptor TRIF is dependent on its receptor interacting protein homotypic interaction motif. *J Immunol* 2005;174:4942-4952.
175. Triantafilou M, Miyake K, Golenbock DT, et al. Mediators of innate immune recognition of bacteria concentrate in lipid rafts and facilitate lipopolysaccharide-induced cell activation. *J Cell Sci* 2002;115:2603-2611.
176. Olsson S, Sundler R. The role of lipid rafts in LPS-induced signaling in a macrophage cell line. *Mol Immunol* 2006;43:607-612.
177. Latz E, Visintin A, Lien E, et al. Lipopolysaccharide rapidly traffics to and from the Golgi apparatus with the toll-like receptor 4-MD-2-CD14 complex in a process that is distinct from the initiation of signal transduction. *J Biol Chem* 2002;277:47834-47843.
178. Triantafilou M, Morath S, Mackie A, et al. Lateral diffusion of Toll-like receptors reveals that they are transiently confined within lipid rafts on the plasma membrane. *J Cell Sci* 2004;117:4007-4014.
179. Triantafilou M, Triantafilou K. The dynamics of LPS recognition: complex orchestration of multiple receptors. *J Endotoxin Res* 2005;11:5-11.
180. Petzl W, Zerbe H, Gunther J, et al. Escherichia coli, but not Staphylococcus aureus triggers an early increased expression of factors contributing to the innate immune defense in the udder of the cow. *Vet Res* 2008;39:18.
181. Ibeagha-Awemu EM, Lee JW, Ibeagha AE, et al. Bacterial

lipopolysaccharide induces increased expression of toll-like receptor (TLR) 4 and downstream TLR signaling molecules in bovine mammary epithelial cells. *Vet Res* 2008;39:11.

182. Yang W, Zerbe H, Petzl W, et al. Bovine TLR2 and TLR4 properly transduce signals from *Staphylococcus aureus* and *E. coli*, but *S. aureus* fails to both activate NF-kappaB in mammary epithelial cells and to quickly induce TNFalpha and interleukin-8 (CXCL8) expression in the udder. *Mol Immunol* 2008;45:1385-1397.

183. Ferreira ME, Coelho MM, Pela IR. Role of the hepatic function in the development of the pyrogenic tolerance to muramyl dipeptide. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2001;281:162-169.

184. Medvedev AE, Kopydlowski KM, Vogel SN. Inhibition of lipopolysaccharide-induced signal transduction in endotoxin-tolerized mouse macrophages: dysregulation of cytokine, chemokine, and toll-like receptor 2 and 4 gene expression. *J Immunol* 2000;164:5564-5574.

185. Lehner MD, Morath S, Michelsen KS, et al. Induction of cross-tolerance by lipopolysaccharide and highly purified lipoteichoic acid via different Toll-like receptors independent of paracrine mediators. *J Immunol* 2001;166:5161-5167.

186. Adib-Conquy M, Adrie C, Fitting C, et al. Up-regulation of MyD88s and SIGIRR, molecules inhibiting Toll-like receptor signaling, in monocytes from septic patients. *Crit Care Med* 2006;34:2377-2385.

187. Beeson PB. Tolerance to bacterial pyrogen. *J Exp Med* 1947:29-38.

188. Freeman HH. Passive transfer of toleranz to pyrogenicity of bacterial endotoxin. *J Exp Med* 1960;111:453-463

189. Maxime V, Fitting C, Annane D, et al. Corticoids normalize leukocyte production of macrophage migration inhibitory factor in septic shock. *J Infect Dis* 2005;191:138-144.
190. Munoz C, Misset B, Fitting C, et al. Dissociation between plasma and monocyte-associated cytokines during sepsis. *Eur J Immunol* 1991;21:2177-2184.
191. Weiss M, Fischer G, Barth E, et al. Dissociation of LPS-induced monocytic ex vivo production of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) and TNF-alpha in patients with septic shock. *Cytokine* 2001;13:51-54.
192. West MA, Heagy W. Endotoxin tolerance: A review. *Crit Care Med* 2002;30:S64-S73.
193. Knopf HP, Otto F, Engelhardt R, et al. Discordant adaptation of human peritoneal macrophages to stimulation by lipopolysaccharide and the synthetic lipid A analogue SDZ MRL 953. Down-regulation of TNF-alpha and IL-6 is paralleled by an up-regulation of IL-1 beta and granulocyte colony-stimulating factor expression. *J Immunol* 1994;153:287-299.
194. Mathison JC, Virca GD, Wolfson E, et al. Adaptation to bacterial lipopolysaccharide controls lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor production in rabbit macrophages. *J Clin Invest* 1990;85:1108-1118.
195. Pitton C, Fitting C, van Deuren M, et al. Different regulation of TNF alpha and IL-1ra synthesis in LPS-tolerant human monocytes. *Prog Clin Biol Res* 1995;392:523-528.
196. Seatter SC, Bennet T, Li MH, et al. Macrophage endotoxin tolerance. Tumor necrosis factor and interleukin-1 regulation by lipopolysaccharide pretreatment. *Arch Surg* 1994;129:1263-1269; discussion 1270.
197. Zhang X, Morrison DC. Lipopolysaccharide-induced selective priming

effects on tumor necrosis factor alpha and nitric oxide production in mouse peritoneal macrophages. *J Exp Med* 1993;177:511-516.

198. Seatter SC, Li MH, Bubrick MP, et al. Endotoxin pretreatment of human monocytes alters subsequent endotoxin-triggered release of inflammatory mediators. *Shock* 1995;3:252-258.

199. West MA, Bennet T, Seatter SC, et al. LPS pretreatment reprograms macrophage LPS-stimulated TNF and IL-1 release without protein tyrosine kinase activation. *J Leukoc Biol* 1997;61:88-95.

200. West MA, Li MH, Seatter SC, et al. Pre-exposure to hypoxia or septic stimuli differentially regulates endotoxin release of tumor necrosis factor, interleukin-6, interleukin-1, prostaglandin E2, nitric oxide, and superoxide by macrophages. *J Trauma* 1994;37:82-89; discussion 89-90.

201. Rodrick ML, Moss NM, Grbic JT, et al. Effects of in vivo endotoxin infusions on in vitro cellular immune responses in humans. *J Clin Immunol* 1992;12:440-450.

202. Zingarelli B, Halushka PV, Caputi AP, et al. Increased nitric oxide synthesis during the development of endotoxin tolerance. *Shock* 1995;3:102-108.

203. Coffee KA, Halushka PV, Ashton SH, et al. Endotoxin tolerance is associated with altered GTP-binding protein function. *J Appl Physiol* 1992;73:1008-1013.

204. Chen H, Halushka PV, Cook JA. Endotoxin tolerance: effects on lethality and macrophage thromboxane (B2) and interleukin 6 production. *Shock* 1994;1:366-371.

205. Geisel J, Cook JA, Ashton SH, et al. Endotoxin tolerance is associated with decreased prostaglandin H synthases-1 and -2. *Am J Physiol* 1994;267:1067-

1072.

206. Cavaillon JM, Marie C, Pitton C, et al. The production of TNF alpha and IL-8 in whole blood assays are differently regulated upon activation by LPS. *Prog Clin Biol Res* 1995;392:433-439.

207. Kaufmann A, Gemsa D, Sprenger H. Differential desensitization of lipopolysaccharide-inducible chemokine gene expression in human monocytes and macrophages. *Eur J Immunol* 2000;30:1562-1567.

208. Learn CA, Mizel SB, McCall CE. mRNA and protein stability regulate the differential expression of pro- and anti-inflammatory genes in endotoxin-tolerant THP-1 cells. *J Biol Chem* 2000;275:12185-12193.

209. Wolk K, Docke WD, von Baehr V, et al. Impaired antigen presentation by human monocytes during endotoxin tolerance. *Blood* 2000;96:218-223.

210. Cavaillon JMP, C.; Fitting C. Endotoxintoleranz is not a LPS-specific Phenomenon: Partial mimicry with IL-1, IL-10 and TNFbeta. *J Endo Res* 1994;1994:21-29.

211. Mathison J, Wolfson E, Steinemann S, et al. Lipopolysaccharide (LPS) recognition in macrophages. Participation of LPS-binding protein and CD14 in LPS-induced adaptation in rabbit peritoneal exudate macrophages. *J Clin Invest* 1993;92:2053-2059.

212. Constantian MB. Association of sepsis with an immunosuppressive polypeptide in the serum of burn patients. *Ann Surg* 1978;188:209-215.

213. Prins JM, Kuijper EJ, Mevissen ML, et al. Release of tumor necrosis factor alpha and interleukin 6 during antibiotic killing of Escherichia coli in whole blood: influence of antibiotic class, antibiotic concentration, and presence of septic serum. *Infect Immun* 1995;63:2236-2242.

214. Ronco C, Brendolan A, Lonnemann G, et al. A pilot study of coupled plasma filtration with adsorption in septic shock. *Crit Care Med* 2002;30:1250-1255.
215. Brandtzaeg P, Osnes L, Ovstebo R, et al. Net inflammatory capacity of human septic shock plasma evaluated by a monocyte-based target cell assay: identification of interleukin-10 as a major functional deactivator of human monocytes. *J Exp Med* 1996;184:51-60.
216. Berg DJ, Kuhn R, Rajewsky K, et al. Interleukin-10 is a central regulator of the response to LPS in murine models of endotoxic shock and the Shwartzman reaction but not endotoxin tolerance. *J Clin Invest* 1995;96:2339-2347.
217. Marie C, Fitting C, Muret J, et al. Interleukin 8 production in whole blood assays: Is interleukin 10 responsible for the downregulation observed in sepsis? *Cytokine* 2000;12:55-61.
218. Chen W, Frank ME, Jin W, et al. TGF-beta released by apoptotic T cells contributes to an immunosuppressive milieu. *Immunity* 2001;14:715-725.
219. Jones SB, Westfall MV, Sayeed MM. Plasma catecholamines during E. coli bacteremia in conscious rats. *Am J Physiol* 1988;254:470-477.
220. Luger TA, Kalden D, Scholzen TE, et al. alpha-melanocyte-stimulating hormone as a mediator of tolerance induction. *Pathobiology* 1999;67:318-321.
221. Delgado M, Pozo D, Martinez C, et al. Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibit endotoxin-induced TNF-alpha production by macrophages: in vitro and in vivo studies. *J Immunol* 1999;162:2358-2367.
222. Annane D, Cavillon JM. Corticosteroids in sepsis: from bench to bedside? *Shock* 2003;20:197-207.

223. Choudhry MA, Ahmad S, Ahmed Z, et al. Prostaglandin E2 down-regulation of T cell IL-2 production is independent of IL-10 during gram-negative sepsis. *Immunol Lett* 1999;67:125-130.
224. Njemini R, Lambert M, Demanet C, et al. Elevated serum heat-shock protein 70 levels in patients with acute infection: use of an optimized enzyme-linked immunosorbent assay. *Scand J Immunol* 2003;58:664-669.
225. Majetschak M, Krehmeier U, Bardenheuer M, et al. Extracellular ubiquitin inhibits the TNF-alpha response to endotoxin in peripheral blood mononuclear cells and regulates endotoxin hyporesponsiveness in critical illness. *Blood* 2003;101:1882-1890.
226. Cavaillon JM, Fitting C, Haeffner-Cavaillon N, et al. Cytokine response by monocytes and macrophages to free and lipoprotein-bound lipopolysaccharide. *Infect Immun* 1990;58:2375-2382.
227. Warren HS, Knights CV, Siber GR. Neutralization and lipoprotein binding of lipopolysaccharides in tolerant rabbit serum. *J Infect Dis* 1986;154:784-791.
228. Blackwell TS, Blackwell TR, Christman JW. Induction of endotoxin tolerance depletes nuclear factor-kappaB and suppresses its activation in rat alveolar macrophages. *J Leukoc Biol* 1997;62:885-891.
229. Ziegler-Heitbrock HW, Wedel A, Schraut W, et al. Tolerance to lipopolysaccharide involves mobilization of nuclear factor kappa B with predominance of p50 homodimers. *J Biol Chem* 1994;269:17001-17004.
230. Adib-Conquy M, Adrie C, Moine P, et al. NF-kappaB expression in mononuclear cells of patients with sepsis resembles that observed in lipopolysaccharide tolerance. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:1877-1883.
231. Adib-Conquy M, Asehnoune K, Moine P, et al. Long-term-impaired

expression of nuclear factor-kappa B and I kappa B alpha in peripheral blood mononuclear cells of trauma patients. *J Leukoc Biol* 2001;70:30-38.

232. Kobayashi K, Hernandez LD, Galan JE, et al. IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling. *Cell* 2002;110:191-202.

233. Escoll P, del Fresno C, Garcia L, et al. Rapid up-regulation of IRAK-M expression following a second endotoxin challenge in human monocytes and in monocytes isolated from septic patients. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;311:465-472.

234. Fukao T, Koyasu S. PI3K and negative regulation of TLR signaling. *Trends Immunol* 2003;24:358-363.

235. Learn CA, Boger MS, Li L, et al. The phosphatidylinositol 3-kinase pathway selectively controls sIL-1RA not interleukin-1beta production in the septic leukocytes. *J Biol Chem* 2001;276:20234-20239.

236. Janssens S, Burns K, Tschopp J, et al. Regulation of interleukin-1- and lipopolysaccharide-induced NF-kappaB activation by alternative splicing of MyD88. *Curr Biol* 2002;12:467-471.

237. Boone DL, Turer EE, Lee EG, et al. The ubiquitin-modifying enzyme A20 is required for termination of Toll-like receptor responses. *Nat Immunol* 2004;5:1052-1060.

238. Kuwert EK, Marcus I, Werner J, et al. Some experiences with human diploid cell strain-(HDCS) rabies vaccine in pre- and post-exposure vaccinated humans. *Dev Biol Stand* 1978;40:79-88.

239. Shinohara H, Inoue A, Toyama-Sorimachi N, et al. Dok-1 and Dok-2 are negative regulators of lipopolysaccharide-induced signaling. *J Exp Med* 2005;201:333-339.

240. Hammer M, Mages J, Dietrich H, et al. Dual specificity phosphatase 1 (DUSP1) regulates a subset of LPS-induced genes and protects mice from lethal endotoxin shock. *J Exp Med* 2006;203:15-20.
241. Wang T, Chuang TH, Ronni T, et al. Flightless I homolog negatively modulates the TLR pathway. *J Immunol* 2006;176:1355-1362.
242. Mashima R, Saeki K, Aki D, et al. FLN29, a novel interferon- and LPS-inducible gene acting as a negative regulator of toll-like receptor signaling. *J Biol Chem* 2005;280:41289-41297.
243. Williams KL, Lich JD, Duncan JA, et al. The CATERPILLER protein monarch-1 is an antagonist of toll-like receptor-, tumor necrosis factor alpha-, and Mycobacterium tuberculosis-induced pro-inflammatory signals. *J Biol Chem* 2005;280:39914-39924.
244. Zhao Q, Wang X, Nelin LD, et al. MAP kinase phosphatase 1 controls innate immune responses and suppresses endotoxic shock. *J Exp Med* 2006;203:131-140.
245. Zhao F, Yuan Q, Sultzer BM, et al. The involvement of Ran GTPase in lipopolysaccharide endotoxin-induced responses. *J Endotoxin Res* 2001;7:53-56.
246. Divanovic S, Trompette A, Atabani SF, et al. Inhibition of TLR-4/MD-2 signaling by RP105/MD-1. *J Endotoxin Res* 2005;11:363-368.
247. Wald D, Qin J, Zhao Z, et al. SIGIRR, a negative regulator of Toll-like receptor-interleukin 1 receptor signaling. *Nat Immunol* 2003;4:920-927.
248. Rauh MJ, Sly LM, Kalesnikoff J, et al. The role of SHIP1 in macrophage programming and activation. *Biochem Soc Trans* 2004;32:785-788.
249. Nakagawa R, Naka T, Tsutsui H, et al. SOCS-1 participates in negative

regulation of LPS responses. *Immunity* 2002;17:677-687.

250. Brint EK, Xu D, Liu H, et al. ST2 is an inhibitor of interleukin 1 receptor and Toll-like receptor 4 signaling and maintains endotoxin tolerance. *Nat Immunol* 2004;5:373-379.

251. Zhang G, Ghosh S. Negative regulation of toll-like receptor-mediated signaling by Tollip. *J Biol Chem* 2002;277:7059-7065.

252. Takeshita F, Ishii KJ, Kobiyama K, et al. TRAF4 acts as a silencer in TLR-mediated signaling through the association with TRAF6 and TRIF. *Eur J Immunol* 2005;35:2477-2485.

253. Chuang TH, Ulevitch RJ. Triad3A, an E3 ubiquitin-protein ligase regulating Toll-like receptors. *Nat Immunol* 2004;5:495-502.

254. Nomura F, Akashi S, Sakao Y, et al. Cutting edge: endotoxin tolerance in mouse peritoneal macrophages correlates with down-regulation of surface toll-like receptor 4 expression. *J Immunol* 2000;164:3476-3479.

255. Sato S, Nomura F, Kawai T, et al. Synergy and cross-tolerance between toll-like receptor (TLR) 2- and TLR4-mediated signaling pathways. *J Immunol* 2000;165:7096-7101.

256. Helminen M, Vesikari T. Interleukin-1 production in bacterial meningitis. *Scand J Infect Dis* 1990;22:105-108.

257. Weighardt H, Heidecke CD, Emmanuilidis K, et al. Sepsis after major visceral surgery is associated with sustained and interferon-gamma-resistant defects of monocyte cytokine production. *Surgery* 2000;127:309-315.

258. Munford RS, Hall CL. Detoxification of bacterial lipopolysaccharides (endotoxins) by a human neutrophil enzyme. *Science* 1986;234:203-205.

259. Singh J, Sidhu SS, Dhaliwal GS, et al. Effectiveness of lipopolysaccharide as an intrauterine immunomodulator in curing bacterial endometritis in repeat breeding cross-bred cows. *Anim Reprod Sci* 2000;59:159-166.
260. Cluff CW, Baldrige JR, Stover AG, et al. Synthetic toll-like receptor 4 agonists stimulate innate resistance to infectious challenge. *Infect Immun* 2005;73:3044-3052.
261. Masihi KN, Lange W, Brehmer W, et al. Immunobiological activities of nontoxic lipid A: enhancement of nonspecific resistance in combination with trehalose dimycolate against viral infection and adjuvant effects. *Int J Immunopharmacol* 1986;8:339-345.
262. Lindl T. Zell-und Gewebekultur. *Spektrum Akademischer Verlag; Heidelberg, Berlin* 2002;5. Aufl.
263. German T, Barash I. Characterization of an epithelial cell line from bovine mammary gland. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2002;38:282-292.
264. Huynh HT, Robitaille G, Turner JD. Establishment of bovine mammary epithelial cells (MAC-T): an in vitro model for bovine lactation. *Exp Cell Res* 1991;197:191-199.
265. Zavizion B, van Duffelen M, Schaeffer W, et al. Establishment and characterization of a bovine mammary epithelial cell line with unique properties. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 1996;32:138-148.
266. Cifrian E, Guidry AJ, O'Brien CN, et al. Bovine mammary teat and ductal epithelial cell cultures. *Am J Vet Res* 1994;55:239-246.
267. Boudjellab N, Chan-Tang HS, Li X, et al. Interleukin 8 response by bovine mammary epithelial cells to lipopolysaccharide stimulation. *Am J Vet Res* 1998;59:1563-1567.

268. McClenahan DJ, Sotos JP, Czuprynski CJ. Cytokine response of bovine mammary gland epithelial cells to *Escherichia coli*, coliform culture filtrate, or lipopolysaccharide. *Am J Vet Res* 2005;66:1590-1597.
269. Ebner KE, Hageman EC, Larson BL. Functional biochemical changes in bovine mammary cell cultures. *Exp Cell Res* 1961;25:555-570.
270. McGrath MF. A novel system for mammary epithelial cell culture. *J Dairy Sci* 1987;70:1967-1980.
271. Tumilowicz JJ, Shirahama S. Aberrant characteristics and virus-like particles of bovine mammary cell cultures. *Am J Vet Res* 1969;30:51-59.
272. Collier RJ, Bauman DE, Hays RL. Lactogenesis in explant cultures of mammary tissue from pregnant cows. *Endocrinology* 1977;100:1192-1200.
273. Gertler A, Cohen N, Maoz A. Human growth hormone but not ovine or bovine growth hormones exhibits galactopoietic prolactin-like activity in organ culture from bovine lactating mammary gland. *Mol Cell Endocrinol* 1983;33:169-182.
274. Buehring GC. Culture of mammary epithelial cells from bovine milk. *J Dairy Sci* 1990;73:956-963.
275. Goodman GT, Akers RM, Friderici KH, et al. Hormonal regulation of alpha-lactalbumin secretion from bovine mammary tissue cultured in vitro. *Endocrinology* 1983;112:1324-1330.
276. Nickerson SC, Heald CW, Bibb TL, et al. Cytological effects of hormones and plasma on bovine mammary tissue in vitro. *J Endocrinol* 1978;79:363-368.
277. Ebner KE, Hoover CR, Hageman EC, et al. Cultivation and properties of bovine mammary cell cultures. *Exp Cell Res* 1961;23:373-385.

278. Schmid E, Franke WW, Grund C, et al. An epithelial cell line with elongated myoid morphology derived from bovine mammary gland. Expression of cytokeratins and desmosomal plaque proteins in unusual arrays. *Exp Cell Res* 1983;146:309-328.
279. Baumrucker CR, Deemer KP, Walsh R, et al. Primary culture of bovine mammary acini on a collagen matrix. *Tissue Cell* 1988;20:541-554.
280. Gunther J, Koczan D, Yang W, et al. Assessment of the immune capacity of mammary epithelial cells: comparison with mammary tissue after challenge with *Escherichia coli*. *Vet Res* 2009;40:31.
281. Rose MT, Aso H, Yonekura S, et al. In vitro differentiation of a cloned bovine mammary epithelial cell. *J Dairy Res* 2002;69:345-355.
282. Smits E, Burvenich C, Guidry AJ, et al. Diapedesis across mammary epithelium reduces phagocytic and oxidative burst of bovine neutrophils. *Vet Immunol Immunopathol* 1999;68:169-176.
283. Emmendorffer A, Hecht M, Lohmann-Matthes ML, et al. A fast and easy method to determine the production of reactive oxygen intermediates by human and murine phagocytes using dihydrorhodamine 123. *J Immunol Methods* 1990;131:269-275.
284. Zerbe H, Schneider N, Leibold W, et al. Altered functional and immunophenotypical properties of neutrophilic granulocytes in postpartum cows associated with fatty liver. *Theriogenology* 2000;54:771-786.
285. Zerbe H. Funktionelle und phänotypische Untersuchungen polymorphkerniger neutrophiler Granulozyten aus Blut und Uterus des Rindes *Diss* 1994;Tierärztliche Hochschule, Hannover.
286. Shuster DE, Kehrli ME, Jr., Rainard P, et al. Complement fragment C5a

and inflammatory cytokines in neutrophil recruitment during intramammary infection with *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1997;65:3286-3292.

287. Lohuis JA, Kremer W, Schukken YH, et al. Growth of *Escherichia coli* in milk from endotoxin-induced mastitic quarters and the course of subsequent experimental *Escherichia coli* mastitis in the cow. *J Dairy Sci* 1990;73:1508-1514.

288. Carlson GP, Kaneko JJ. Intravascular granulocyte kinetics in developing calves. *Am J Vet Res* 1975;36:421-425.

289. Akgul C, Moulding DA, Edwards SW. Molecular control of neutrophil apoptosis. *FEBS Lett* 2001;487:318-322.

290. Lohuis JA, Verheijden JH, Burvenich C, et al. Pathophysiological effects of endotoxins in ruminants. 1. Changes in body temperature and reticulo-rumen motility, and the effect of repeated administration. *Vet Q* 1988;10:109-116.

291. Rainard P. Bacteriostatic activity of bovine lactoferrin in mastitic milk. *Vet Microbiol* 1987;13:159-166.

292. Griffiths E, Humphreys J. Bacteriostatic effect of human milk and bovine colostrum on *Escherichia coli*: importance of biocarbonate. *Infect Immun* 1978;15:396-408.

293. Reiter B. Antimicrobial systems in milk. *J Dairy Res* 1978;45:131-139.

294. Brentano F, Kyburz D, Gay S. Toll-like receptors and rheumatoid arthritis. *Methods Mol Biol* 2009;517:329-343.

295. Pang G, Couch L, Batey R, et al. GM-CSF, IL-1 alpha, IL-1 beta, IL-6, IL-8, IL-10, ICAM-1 and VCAM-1 gene expression and cytokine production in human duodenal fibroblasts stimulated with lipopolysaccharide, IL-1 alpha and TNF-alpha. *Clin Exp Immunol* 1994;96:437-443.

296. Wendell KJ, Stein SH. Regulation of cytokine production in human gingival fibroblasts following treatment with nicotine and lipopolysaccharide. *J Periodontol* 2001;72:1038-1044.
297. De Mattei M, Varani K, Masieri FF, et al. Adenosine analogs and electromagnetic fields inhibit prostaglandin E2 release in bovine synovial fibroblasts. *Osteoarthritis Cartilage* 2009;17:252-262.
298. Lechner S. Interaktion von Inseminatbestandteilen mit Epithelzellen und Leukozyten im Uterus des Rindes. *Diss* 2008; Ludwig Maximilians-Universität, München.
299. Pareek R, Wellnitz O, Van Dorp R, et al. Immunorelevant gene expression in LPS-challenged bovine mammary epithelial cells. *J Appl Genet* 2005;46:171-177.
300. Cole AM, Ganz T, Liese AM, et al. Cutting edge: IFN-inducible ELR-CXC chemokines display defensin-like antimicrobial activity. *J Immunol* 2001;167:623-627.
301. Haviland DL, McCoy RL, Whitehead WT, et al. Cellular expression of the C5a anaphylatoxin receptor (C5aR): demonstration of C5aR on nonmyeloid cells of the liver and lung. *J Immunol* 1995;154:1861-1869.
302. Fang W, Luther DA, Oliver SP. Protein expression by *Streptococcus uberis* in co-culture with bovine mammary epithelial cells. *FEMS Microbiol Lett* 1998;166:237-242.
303. Hirschfeld M, Ma Y, Weis JH, et al. Cutting edge: repurification of lipopolysaccharide eliminates signaling through both human and murine toll-like receptor 2. *J Immunol* 2000;165:618-622.
304. Mehrzad J, Desrosiers C, Lauzon K, et al. Proteases involved in mammary

tissue damage during endotoxin-induced mastitis in dairy cows. *J Dairy Sci* 2005;88:211-222.

305. Zarzynska J, Gajewska M, Motyl T. Effects of hormones and growth factors on TGF-beta1 expression in bovine mammary epithelial cells. *J Dairy Res* 2005;72:39-48.

306. Woodward TL, Dumont N, O'Connor-McCourt M, et al. Characterization of transforming growth factor-beta growth regulatory effects and receptors on bovine mammary cells. *J Cell Physiol* 1995;165:339-348.

307. Nagahata H, Sawada C, Higuchi H, et al. Fc receptor-mediated phagocytosis, superoxide production and calcium signaling of beta 2 integrin-deficient bovine neutrophils. *Microbiol Immunol* 1997;41:747-750.

## 9 Danksagung

Mein erster und besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Holm Zerbe für die Überlassung des Themas dieser Dissertation. Sein persönliches Engagement und seine motivierende Art haben wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen. Durch unmittelbare Hilfestellung und konstruktive Vorschläge konnten schwierige Hürden genommen werden.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Wolfram Petzl für die hervorragende Betreuung der Arbeit. Seine fachliche Kompetenz hat sehr geholfen, zielführende Versuchsanordnungen zu finden. Insbesondere danken möchte ich für die unerlässliche Unterstützung bei der Niederschrift dieser Arbeit.

Für die finanzielle Unterstützung danke ich der H. WILHELM SCHAUMANN STIFTUNG. Ohne ihre Sachmittelspende und die Gewährung eines Promotionsstipendiums wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen.

Für die intensive Einarbeitung in die Labormethoden und die tatkräftige Unterstützung bei den Zellkulturarbeiten möchte ich mich ganz besonders bei Frau Heidi Mayrhofer und Frau Christina Beyer bedanken.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Dr. Frank Weber, der bei methodischen Fragen immer ein offenes Ohr hatte und mit seinem enormen Wissen sowie seiner Erfahrung für die Umsetzung der In-vitro-Arbeiten unerlässlich war.

Außerdem danke ich Frau Dr. Carola Sauter-Louis herzlich für die Hilfe bei der statistischen Auswertung der Daten und für zahlreiche Tipps im Umgang mit tückischen Computerprogrammen.

Bei Herrn Prof. Dr. Hans-Joachim Schubert und Herrn Udo Rabe von der Arbeitsgruppe Immunologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover bedanke ich mich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie für die methodische Unterstützung bei den dort durchgeführten funktionellen Analysen.

Ich danke Herrn Prof. Hans-Martin Seyfert, Frau Angelika Deike und den Labormitarbeitern des FBN Dummerstorf für die Hilfestellung in der

Zellkulturtechnik und das Lösen so mancher Probleme mit der Milchdrüsenepithelzellkultur.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Keil und den Mitarbeitern des Schlachthofes in Fürstenfeldbruck für die kooperative Zusammenarbeit bei der Probengewinnung.

Ein Dank gilt zudem den Sekretärinnen Frau Rita Radloff und Frau Sybille Kirsch für die freundliche Bearbeitung großer und kleiner Anliegen.

Meinem Mitdoktoranden Herrn Dr. Tobias Pfister danke ich für die kollegiale Zusammenarbeit, die praktische Hilfe beim „Steril-Melken“ und die motivierenden Worte nach zahlreichen Rückschlägen. Ebenso gilt ein Dank Frau Monique Lind für die Unterstützung im Zelllabor.

Darüber hinaus möchte ich mich auch bei meinen Mitdoktoranden und den Tierpflegern der Klinik für Wiederkäuer der LMU München für die Hilfe bei der Gewinnung von Blutproben bedanken.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Frau Simone Kreibich für das professionelle Korrekturlesen.