

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von: Univ.-Prof. Dr. Holm Zerbe

**Etablierung und Anwendung einer
Explantkultur der Zitze zur Analyse initialer
Vorgänge bei der Mastitis des Rindes**

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

von
Monique Lind
aus Fulda

München 2011

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun

Referent: Univ.-Prof. Dr. Zerbe

Korreferenten: Univ.-Prof. Dr. Wanke
PD Dr. Dr. Scholz
Univ.-Prof. Dr. Göbel
Univ.-Prof. Dr. Köstlin

Tag der Promotion: 30. Juli 2011

Gefördert im Rahmen des DFG-Projektes FOR 585 (Pathogen-spezifische
Abwehrmechanismen in der Milchdrüse) durch Personal und Sachmittel.

Für meine Eltern

und in Andenken an meinen lieben Großvater Karl Lind

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG.....	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	4
1	Die <i>E. coli</i> -Mastitis des Rindes.....	4
1.1	Bedeutung	4
1.2	Pathogenese.....	5
2	Abwehrmechanismen der Milchdrüse	5
2.1	Die Rolle des Strichkanals und der Fürstenberg'schen Rosette bei der Infektionsabwehr.....	6
2.2	Die Rolle des milchleitenden und milchbildenden Systems bei der Infektionsabwehr.....	6
2.3	Zelluläre Abwehrmechanismen	7
2.4	Humorale Abwehrmechanismen.....	9
2.4.1	Zytokine und Chemokine.....	10
2.4.1.1	IL-1 β und TNF- α	11
2.4.1.2	IL-8/CXCL8, MIP-3 α /CCL20 und RANTES/CCL5	12
2.5	S100-Proteine.....	15
3	In-vitro-Techniken zur Untersuchung zellulärer immunologischer Mechanismen der Milchdrüse.....	17
3.1	Zellkultur.....	17
3.1.1	Milchdrüsenepithelzellen	17
3.1.2	Andere mammäre Zellen.....	19
3.2	Explantkulturen der Milchdrüse	20
3.2.1	Vor- und Nachteile der Explantkultur.....	20
3.2.2	Verwendete Methoden	22
3.2.3	Ergebnisse bisheriger Experimente mit bovinen mammären Explantkulturen.....	24
III.	MATERIAL UND METHODEN.....	27
1	Geräte.....	27
1.1	Geräte für histologische, immunhistochemische und quantitativ stereologische Untersuchungen	27
1.2	Geräte für Explantkultur und funktionelle Untersuchungen.....	27
1.3	Geräte für molekularbiologische Untersuchungen	28

2	Material	29
2.1	Klinikbedarf	29
2.2	Laborbedarf für histologische, immunhistochemische und quantitativ stereologische Untersuchungen	29
2.3	Laborbedarf für Explantkultur und funktionelle Untersuchungen.....	30
2.4	Laborbedarf für molekularbiologische Untersuchungen	31
2.5	Reagenzien für histologische, immunhistochemische und quantitativ stereologische Untersuchungen	31
2.6	Reagenzien für Explantkultur und funktionelle Untersuchungen.....	32
2.7	Reagenzien für molekularbiologische Untersuchungen	33
2.8	Versuchstiere.....	34
2.8.1	Spendertiere für die Gewebegewinnung	34
2.8.2	Spendertiere für die Blutgewinnung	36
2.9	Kulturmedien, Puffer und Lösungen.....	36
2.9.1	Puffer und Lösungen für quantitativ stereologische Untersuchungen	37
2.9.2	Kulturmedium und Zusätze.....	39
2.9.3	Lipopolysaccharidlösung (LPS) für die Stimulationsversuche.....	40
2.9.4	Material für die Separation von Zellen	40
2.9.5	Lösungen für den Chemotaxisassay.....	40
2.9.6	Lösungen für die Durchflusszytometrie.....	41
2.9.7	Puffer und Lösungen für die DNA-Analyse	41
2.10	Primer.....	41
3	Methoden	43
3.1	Klinische Untersuchung der Spendertiere für die Gewebegewinnung.....	43
3.2	Probengewinnung	44
3.2.1	Bakteriologische Untersuchung von Milch- und Tupferproben	44
3.2.2	Entnahme des Gewebes für die Explantkultur	45
3.3	Aufarbeitung und Inkubation.....	46
3.3.1	Aufarbeitung der Explants für histopathologische, immunhisto- chemische und quantitativ stereologische Untersuchungen.....	47
3.3.2	Aufarbeitung der Explants für molekularbiologische Untersuchungen	47
3.3.3	Aufarbeitung und Inkubation für funktionelle Untersuchungen.....	48

3.4	Histopathologische, immunhistochemische und quantitativ stereologische Untersuchungen	49
3.4.1	Paraffineinbettung und Schnittherstellung.....	49
3.4.2	Paraffinextraktion und Rehydrierung.....	51
3.4.3	Histologische und immunhistochemische Färbungen.....	51
3.4.4	Quantitativ stereologische Untersuchungen.....	54
3.4.4.1	Bestimmung der Volumenanteile des Bindegewebes und der Muskulatur in Explants der Zitze	55
3.4.4.2	Bestimmung der Volumenanteile des Epithels und der CD11a/18-positiven Zellen in Explants der Zitze.....	57
3.5	Molekularbiologische Untersuchungen	61
3.5.1	mRNA-Extraktion	61
3.5.2	Synthese von cDNA durch Reverse Transkription	63
3.5.3	Quantitative real time PCR (qRT-PCR).....	64
3.6	Funktionelle Untersuchungen zur Chemotaxis neutrophiler Granulozyten.....	69
3.6.1	Gewinnung von venösem Blut.....	69
3.6.2	Zellisolierung der neutrophilen Granulozyten aus dem Blut	69
3.6.3	Chemotaxisassay	70
3.6.4	Durchflusszytometrie	72
3.6.5	Ermittlung der relativen Transmigrationsrate	74
3.7	IL-8-Bestimmung mittels ELISA	74
3.8	Statistische Auswertung.....	75
IV.	ERGEBNISSE	77
1	Histopathologische und quantitativ stereologische Untersuchungen ..	77
1.1	Histopathologische Befunde	77
1.2	Immunhistochemische Untersuchungen	78
1.3	Quantitativ stereologische Untersuchungen	80
1.3.1	Volumenanteile des Bindegewebes und der Muskulatur in Explants der Fürstenberg'schen Rosette und der Zitenzisterne	80
1.3.2	Volumenanteile des Epithels und der CD11a/18-positiven Zellen in Explants der Fürstenberg'schen Rosette und der Zitenzisterne ..	80
2	Molekularbiologische Untersuchungen	82
2.1	Methodische Vorarbeiten.....	83

2.1.1	Chemokine und Zytokine	83
2.1.2	S100-Proteine	86
2.2	Expressionsstudien - Hauptversuch	89
2.2.1	Chemokine und Zytokine	89
2.2.2	S100-Proteine	91
3	Funktionelle Untersuchungen	93
3.1	Chemotaxis neutrophiler Granulozyten	93
3.2	IL-8-Konzentration in Überständen von Explantkulturen	94
V.	DISKUSSION	96
1	Volumenanteile verschiedener Gewebe- und Zelltypen in Explants der bovinen Zitze	96
1.1	Volumenanteile von Bindegewebe und Muskulatur in Explants der Zitze	98
1.2	Volumenanteil von Epithel in Explants der Zitze	98
1.3	Volumenanteil von CD11a/18-positiven Zellen in Explants der Zitze	99
2	Expression immunrelevanter Gene in Explants der Zitze	101
2.1	LPS induziert die Expression proinflammatorischer Zytokine und Chemokine in Explants der Zitze	104
2.2	Explants der Zitze exprimieren S100-Proteine	108
3	Bildung chemotaktischer Produkte in Explants der Zitze	111
3.1	Stimulierte Zitzenexplants produzieren chemotaktische Produkte ...	111
3.2	IL-8 in Überständen von Explantkulturen	113
4	Schlussbetrachtung und Ausblick	115
VI.	ZUSAMMENFASSUNG	117
VII.	SUMMARY	119
VIII.	LITERATURVERZEICHNIS	121
IX.	DANKSAGUNG	135

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celcius
A _A	Flächendichte einer Struktur
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
APS	Antibiotic-Antimycotic
<i>Aqua dest.</i>	Aqua destillata (destilliertes Wasser)
<i>Aqua tridest.</i>	Aqua tridestillata (dreifach destilliertes Wasser)
β-ME	β-Mercaptoethanol
BME-UV	permanente Zelllinie der bovinen Milchdrüsenepithelzelle
bp	base pairs (Basenpaare)
BSA	Bovines Serum Albumin
BU	Bakteriologische Untersuchung
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa (lateinisch: etwa, ungefähr)
C5a	Fragment der Komplementkomponente 5
CCL	β-Chemokin-Ligand, zwei Cysteinmoleküle in Folge („CC“)
CD	Cluster of Differentiation
CFU	Colony forming unit (Koloniebildende Einheit)
cDNA	complementary DNA
cm	Zentimeter
CMT	California Mastitis Test
CO ₂	Kohlendioxid
CpG	Cytosin-Phosphat-Guanosin (unmethylierte DNA-Motive v. a. aus Bakterien)
CSF	Colony-stimulierender-Faktor
C _t	cycle threshold
CV	Coefficient of variation (Variationskoeffizient)
CXCL	α-Chemokin-Ligand, zwei Cysteinmoleküle werden von beliebiger Aminosäure (X) getrennt
CXCR	Chemokinrezeptor
DAB	Diaminobenzidintetrahydrochlorid
DAMP	Danger associated molecular pattern
d. h.	das heißt
DMEM-F12	Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)/Ham's Nutrient Mixture F12
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTPs	Deoxynucleotide Triphosphates
DTT	Dithiothriol
€	Euro
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	ethylendiamine-tetraacetic acid (Ethylendiamintetraacetat)
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Assay
EN-RAGE	extracellular newly identified RAGE binding protein

et al.	et alii (lateinisch: und andere)
etc.	et cetera (lateinisch: und weiteres)
FACScan [®]	Fluorescence Activated Cell Scanner (Fluoreszenzaktiviertes Zellmessgerät der Firma Becton Dickinson, Heidelberg)
FBR	Fürstenberg'sche Rosette
Fc	fragment crystalline (kristallisierbarer Antikörperteil, carboxyl-terminales Fragment von Immunglobulinen nach Papain-Spaltung)
FKS	Fetales Kälberserum
FL-1; -2; -3	Messkanäle des Durchflusszytometers für emittierte Fluoreszenz FL-1 = Grünfluoreszenz, 530 ± 15 nm FL-2 = Orangefluoreszenz, 585 ± 21 nm FL-3 = Rotfluoreszenz, > 650 nm
for	forward (Vorwärts-Primer)
FSC	Forward Scatter (Vorwärtsstreuung), Messparameter des FACScan [®]
g	Gramm
G	Gauge
GRO- α	Growth related oncogene- α
h	hora (lateinisch: Stunde)
HCl	Salzsäure
HE	Hämalaun-Eosin-Färbung
HL	Euterviertel hinten links
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HR	Euterviertel hinten rechts
HRP	Horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
ICAM	intercellular adhesion molecule (interzelluläres Adhäsionsmolekül)
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IP-10	interferon-gamma induced protein 10 kD
I-TAC	Interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant
IU	International Units
kB	kilo Basen
KCl	Kaliumchlorid
kg	Kilogramm
KNS	Koagulase negative Staphylokokken
L	Liter
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
LPS	Lipopolysaccharid
LTA	Lipoteichonsäure
μ	mikro (mal 10 ⁻⁶)
μ g	Mikrogramm (10 ⁻⁶ g)
μ L	Mikroliter (10 ⁻⁶ L)
μ m	Mikrometer (10 ⁻⁶ m)
m	milli (mal 10 ⁻³)
MAC-T	Mammary Alveolar Cell-Large T antigen
MCP-1; -2; -3	Monocyte chemoattractant protein-1; -2; -3

MEC	Milchdrüsenepithelzelle
MHC	Major Histocompatibility Complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
Mig	Monokine induced by IFN-gamma
min	Minute(n)
MIP	Macrophage inflammatory protein
mL	Milliliter (10^{-3} L)
mmol	Millimol (10^{-3} mol)
mm	Millimeter
mol	Mol
mRNA	messenger RNA
MRP	myeloid-related protein
MW	molecular weight (Molekulargewicht)
MW	Mittelwert
n	nano (mal 10^{-9})
n =	Anzahl der Einzelbeobachtungen
NaCl	Natriumchlorid
NaN ₃	Natriumazid
NF _κ B	nuclear factor-kappa B (Transkriptionsfaktor)
nmol	Nanomol (10^{-9} mol)
NO	Stickstoffmonoxid
obB	ohne besonderen Befund
OD	optische Dichte
p	pico (mal 10^{-12})
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 (Polymerasekettenreaktion)
pg	Picogramm (10^{-12} g)
pH	potentia hydrogenii (lateinisch: Wasserstoffionen-Exponent)
PMN	Polymorphonuclear Neutrophils (polymorphkernige neutrophile Granulozyten)
P _p	Punktdichte einer Struktur
PTG	Peptidoglykan
qRT-PCR	quantitative real-time Polymerase Chain Reaction (quantitative Echtzeit Polymerasekettenreaktion)
R =	Korrelationskoeffizient
RAGE	multiligand receptor for advanced glycation end products
RANTES	regulated on activation normal T cell expressed and secreted
rev	reverse (Rückwärts-Primer)
rhIL-8	rekombinantes humanes Interleukin-8
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkription

s	Sekunden
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Sc.</i>	<i>Streptococcus ssp.</i>
SCC	Somatic Cell Count (Somatische Zellen in der Milch)
SD	Standardabweichung
sog.	sogenannte(r)
<i>spp.</i>	<i>subspecies</i> (lateinisch: Unterarten)
SSC	Side Scatter (Seitwärtsstreulicht), Messparameter des FACScan®
Tab.	Tabelle
TBS	Tris Buffer Saline (Tris gepufferte Kochsalzlösung)
TGF- β	Transforming growth factor β
T _{H1}	T-Helfer-Zelle Phänotyp 1
T _{H2}	T-Helfer-Zelle Phänotyp 2
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
U	enzyme unite
u. a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
v. a.	vor allem
VCAM	vascular cell adhesion molecule (vaskuläres Zelladhäsionsmolekül)
VL	Euterviertel vorne links
VR	Euterviertel vorne rechts
VRB-Agar	Violett-Red-Bile-Agar (Kristallviolett-Galle-Laktose-Agar)
V _v	Volumendichte einer Struktur
x g	multipliziert mit der Gravitationsbeschleunigung (9,81 m/s ²)
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil
ZZ	Zitzenzisterne

I. EINLEITUNG

Die Euterentzündung (Mastitis) des Rindes ist die bedeutendste Erkrankung adulter Milchkühe und geht mit erheblichen Verlusten für die Milchwirtschaft einher (SORDILLO et al., 1997). Sie kann durch Bakterien, Mykoplasmen, Hefen und Algen hervorgerufen werden. Die meisten Mastitiden werden durch bakterielle Erreger verursacht, die durch den Strichkanal in das Euter gelangen. Anatomische Gegebenheiten sowie zelluläre und lösliche Faktoren bilden die Abwehrmechanismen gegen ascendierende Keime. Die Anfälligkeit und Widerstandsfähigkeit der Milchdrüse gegen Pathogene wird vor allem durch die Effizienz des angeborenen Immunsystems bestimmt. Das klinische Bild der Erkrankung kann in Abhängigkeit von der Empfänglichkeit des Wirts und von den beteiligten Erregern stark variieren. Gram-negative Bakterien wie z. B. *Escherichia coli* (*E. coli*) sind oft an der Entstehung schwerwiegender klinischer Mastitiden beteiligt (BANNERMAN et al., 2004a). Für den akuten Verlauf von Mastitiden, die durch Gram-negative Bakterien hervorgerufen wurden, ist hauptsächlich das Lipopolysaccharid (LPS, synonym Endotoxin) verantwortlich. Als ein Bestandteil der Zellmembran wird es bei der Teilung und beim Absterben der Erreger im Euter freigesetzt (BURVENICH et al., 2003). LPS bindet an Rezeptoren der Wirtszellen, wodurch eine Immunreaktion ausgelöst wird. Die rasche Induktion dieser Antwort und die damit einhergehende schnelle Elimination der Erreger aus dem Euter, ohne gleichzeitige Schädigung des Wirtes, sind die entscheidenden Faktoren für eine effektive Abwehr. Über die letzten Jahrzehnte wurde durch genetische Selektion und technischen Fortschritt bei den Melksystemen die Milchleistung von Milchkühen enorm gesteigert. Es besteht eine negative Korrelation zwischen der Milchproduktion und der Widerstandsfähigkeit gegenüber Mastitiserregern. Die intensive Nutzung von Milchkühen scheint sich somit stark auf die mammären Abwehrmechanismen gegenüber Pathogenen auszuwirken (SORDILLO & STREICHER, 2002). Die derzeitigen Praktiken zur Mastitis-Prophylaxe basieren auf einer guten Melkhygiene, der Reduzierung des Keimdrucks in der Umwelt und dem Einsatz antibiotischer Trockensteller (SORDILLO et al., 1997). Die medikamentelle Mastitis-Therapie basiert überwiegend auf der Anwendung von Antibiotika. Durch das Einhalten der Prophylaxemaßnahmen kann das Auftreten der Krankheit reduziert werden.

Jedoch erkrankt z. B. in den USA laut des National Mastitis Council immer noch jede dritte Milchkuh an einer Mastitis. Der Einsatz von Antibiotika ist wegen oftmals unbefriedigender Therapieerfolge, aufgrund von Resistenzentwicklungen und aus Sicht des Verbraucherschutzes zunehmend umstritten. Die Suche nach neuen Prophylaxe- und Therapieansätzen gewinnt deshalb immer mehr an Bedeutung. Eine Möglichkeit die Inzidenz von Mastitiden zu vermindern, besteht darin, die natürliche Widerstandskraft der Kuh gegenüber Infektionen zu stärken. Die gegenwärtige Aufgabe der Wissenschaft liegt somit auch darin, ein besseres Verständnis der komplexen Interaktionen zwischen relevanten Bakterien und dem Wirt zu erlangen und damit Grundlagen für neue Konzepte zu finden, die die Resistenz der Milchdrüse gegenüber Infektionen steigern (SORDILLO & STREICHER, 2002).

Bislang sind initiale Vorgänge, die bei der Entstehung einer Mastitis den anschließenden Schweregrad der Erkrankung beeinflussen können, nur unvollständig aufgeklärt. Da Erreger meist über den Strichkanal in die Milchdrüse gelangen, stellt sich die Frage, in wieweit immunologische Vorgänge in den distalen Kompartimenten der Milchdrüse (Fürstenberg'sche Rosette, Zitzenzisterne) für die Induktion einer effizienten Immunantwort von Bedeutung sind. Aus vorangegangenen Analysen im Tiermodell und einem gezielten Pilotprojekt lässt sich die Hypothese ableiten, dass frühe Erreger-Wirt-Interaktionen der Zitze eine entscheidende Rolle bei Erregererkennung und -abwehr im Euter spielen. Die vorliegende Arbeit soll deshalb einen Beitrag zur Aufklärung der Immunkompetenz des distalen Milchdrüsenkompartimentes sowie der initialen Erreger-Wirt-Interaktionen bei einer Infektion der Milchdrüse leisten.

Der methodische Fokus der vorliegenden Arbeit richtet sich auf die Etablierung und Charakterisierung eines Explantkultursystems, mit dessen Hilfe frühe Immunmodulationen untersucht werden können. Zweites Ziel der Studie ist die funktionelle Analyse von Explantkulturen einzelner Abschnitte des distalen Milchdrüsenkompartimentes nach Erregerkonfrontation. Dabei soll die Genexpression proinflammatorischer Mediatoren und die Beeinflussung der Chemotaxis von Effektorzellen analysiert werden. Zur Untersuchung der Erreger- oder PAMP-modulierten Genexpression in Zitzenzisterne sollen Explants der Fürstenberg'schen Rosette (FBR) und der Zitzenzisterne (ZZ) mit LPS von *E. coli* stimuliert werden. Anschließend sollen die Transkriptabundanzen

proinflammatorischer und chemotaktischer Mediatoren in einer Expressionsstudie mittels qRT-PCR ermittelt werden. Die Kenntnis der Volumenanteile verschiedener Gewebe- und Zelltypen innerhalb der Explants ist für die Interpretation der Ergebnisse der Expressionsstudien und für einen Rückschluss auf die Vergleichbarkeit von Explants der Zitze von besonderer Bedeutung. Daher soll mittels quantitativ stereologischer Untersuchungen die Gewebezusammensetzung von Explants der FBR und der ZZ analysiert werden. Weiterhin werden Explantkultur-Überstände in einem quantitativen Chemotaxisassay auf ihre Migrations-induzierende Potenz für aus dem Blut isolierte polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN) geprüft.

Die vorliegende Dissertationsarbeit findet im Rahmen eines wissenschaftlichen Gesamtkonzeptes zur Erforschung der Mastitis-Pathogenese beim Rind statt. In assoziierten Projekten werden die lokalen und systemischen Immunmechanismen insbesondere der frühen Erreger-Wirt-Interaktionen in Zellkultursystemen und im Tiermodell analysiert. Das längerfristige Ziel besteht darin, durch prophylaktische Modulation des wirtseigenen Immunsystems einen Schutz der Milchkuh vor den Folgen schwerer Mastitiden zu erreichen.

II. LITERATURÜBERSICHT

1 Die *E. coli*-Mastitis des Rindes

Von einer *E. coli*-Mastitis spricht man im Allgemeinen, wenn eine Entzündung des Euters vorliegt, die durch die Bakterienspezies *Escherichia coli* (*E. coli*) hervorgerufen wird. Weitergefasst wird der Begriff der „koliformen“ Mastitis eingesetzt, der ebenfalls die Erreger *Klebsiella*, *Enterobacter* und *Serratia* einschließt.

1.1 Bedeutung

Bei der Mastitis handelt es sich um eine Erkrankung, die beim Tier Leiden und Schmerzen hervorrufen kann und schon allein deshalb für die Tierärzteschaft in den Bereichen Diagnostik, Prophylaxe, Therapie und Forschung eine große Herausforderung darstellt. Die Mastitis des Rindes stellt weltweit eine der bedeutendsten und verlustreichsten Erkrankungen in der Milchproduktion dar. So schätzte der National Mastitis Council, dass jede dritte Milchkuh in den USA an Mastitis erkrankt, und dass durch Mastitis jährlich über 2 Milliarden US-Dollar Verluste für die amerikanische Milchindustrie entstehen (SORDILLO & STREICHER, 2002). Auch in Deutschland erkrankt jährlich etwa jede dritte Kuh an einer Mastitis (FEHLINGS, 2008). Gram-negative umweltassoziierte Erreger sind bei klinischen Mastitiden die am häufigsten isolierten Erreger und verursachen die Mehrheit perakuter Fälle (BRADLEY, 2002; HOGAN & LARRY SMITH, 2003). Insbesondere durch Stämme von *E. coli* ausgelöste Entzündungen der Milchdrüse verursachen jährlich große Verluste für die Milchproduzenten. Ein einzelner Fall einer akuten Mastitis kostet im Durchschnitt ca. 210 € (HOGEVEEN et al., 2011). Neben den wirtschaftlichen Verlusten hat die Mastitis auch Bedeutung für die Lebensmittelsicherheit. Der gesteigerte Einsatz von Antibiotika zur Behandlung der Erkrankung wirkt sich hierbei möglicherweise auf die öffentliche Gesundheit aus. Durch den Antibiotikaeinsatz steigt das Risiko der Entstehung resistenter Keime, die in die Nahrungskette gelangen könnten (BRADLEY, 2002).

1.2 Pathogenese

E. coli ist ein natürlicher Bewohner des Darmes von Mensch und Tier. Der Keim wird mit den Fäzes in die Umwelt ausgeschieden (ROLLE & MAYR, 1966). Unter günstigen Bedingungen können die Bakterien dort längere Zeit überleben und sich vermehren. Gelangen solche Erreger aus der Umgebung in das Euter, kann dies zu akuten klinischen Mastitiden mit Störung des Allgemeinbefindens führen (ROLLE & MAYR, 1966). Die Infektion erfolgt galaktogen über den Strichkanal, wobei hoher Keimdruck durch Mängel in Stall- und Melkhygiene, ein geschwächtes Immunsystem, Anomalien oder Verletzungen des Strichkanals, Geburtsverletzungen oder eine suboptimale Fütterung als prädisponierende Faktoren wirken können. Tiere kurz vor, aber vor allem in den ersten Tagen und Wochen nach der Geburt erkranken besonders häufig und schwer, da in diesem Zeitraum das Immunsystem geschwächt ist (PYORALA, 2008). Die eingedrungenen Keime vermehren sich rasch in der Milchdrüse, und es kommt zur massiven Freisetzung von Endotoxin (Lipopolysaccharid, LPS), welches hauptverantwortlich für die Pathogenese und den Verlauf der *E. coli*-Mastitis ist. Im geburtsnahen Zeitraum ist das klinische Bild der *E. coli*-Mastitis meist geprägt von einer akuten bis perakuten, serofibrinösen lokalen Entzündung. Das Drüsenparenchym ist hochgradig geschwollen, schmerzhaft und vermehrt warm. Das Milchsekret ist wässrig, später wässrig-blutig, eitrig oder sogar jauchig mit Fibrinfetzen. Oft werden die Gefäße durch Thromben verschlossen, was ein Absterben einzelner Parenchymbezirke mit anschließender Sequesterbildung zur Folge hat (DAHME & WEISS, 2007). Außerdem kommt es im peripartalen Zeitraum meist zu starken Störungen des Allgemeinbefindens; die Tiere zeigen Fieber, erhöhte Atemfrequenz, Festliegen, Pansenparese und Durchfall. Außerhalb der peripartalen Phase geht eine *E. coli*-Mastitis meist mit mildereren Symptomen einher. Hierbei wird der Erreger schnell und vollständig eliminiert und die Erkrankung verläuft dann selbstheilend (BURVENICH et al., 2003). In den letzten Jahren häufen sich Beobachtungen chronischer intramammärer Infektionen mit *E. coli* (BRADLEY & GREEN, 2001).

2 Abwehrmechanismen der Milchdrüse

Die Milchdrüse wird durch das angeborene und das erworbene Immunsystem vor Infektionen geschützt. Außerdem verfügt sie über physikalische Abwehrmechanismen, die das Eindringen von Erregern verhindern sollen.

2.1 Die Rolle des Strichkanals und der Fürstenberg'schen Rosette bei der Infektionsabwehr

Da pathogene Keime meist über den Strichkanal eindringen, bildet dieser die erste Abwehr gegen eine Infektion der Milchdrüse. Er entspricht einer mechanischen Barriere und wird zwischen den Melkzeiten aktiv durch den *M. sphincter papillaris* und passiv durch einen Keratinpfropf verschlossen. Dieser wird durch das mehrschichtig verhornte Plattenepithel des Strichkanals gebildet und verhindert als physikalische Sperre das Eindringen von Keimen (RAINARD & RIOLLET, 2006). Außerdem enthält das Keratin Bestandteile mit antimikrobieller Wirkung (J. M. TREECE, 1966; HIBBITT et al., 1969). Die Fürstenberg'sche Rosette, die am Übergang vom Strichkanal zur Zitzenzisterne liegt, bildet einen zusätzlichen mechanischen Verschluss, da ihre Schleimhautfalten durch die Kontraktion des *M. sphincter papillaris* erhöht werden (MOSIMANN & KOHLER, 1990). Durch den Druck der Milch werden diese Falten in den Strichkanal gepresst (POUNDEN & GROSSMAN, 1950). Mehrfach beschrieben wurden leukozytäre bzw. lymphoplasmazelluläre Infiltrate im Bereich der FBR (NICKERSON & PANKEY, 1983; J. RIEDL, 2004). Diesen Zellen wird eine Rolle bei der Infektionsabwehr zugeschrieben.

2.2 Die Rolle des milchleitenden und milchbildenden Systems bei der Infektionsabwehr

Die Milchdrüsenepithelzellen sind für die Synthese vieler Milchkomponenten verantwortlich. Als Grenzgewebe zwischen Körper und Organlumen bilden sie aber auch eine weitere Barriere gegenüber eingedrungenen Keimen. Milchdrüsenepithelzellen erkennen über Toll-like-Rezeptoren (TLR) hochkonservierte Pathogenmuster von Erregern (pathogen associated molecular patterns, PAMPs). Durch die Bildung proinflammatorischer Mediatoren, wie Zytokinen, Chemokinen, Peptiden und Arachidonsäure-Metaboliten, aktivieren sie das Immunsystem und rekrutieren neutrophile Granulozyten (PMN) sowie Lymphozyten in die Milch (RAINARD & RIOLLET, 2006; GRIESBECK-ZILCH et al., 2008). In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass Milchdrüsenepithelzellen an einer Immunantwort beteiligt sind, indem sie Signale senden oder antimikrobielle Moleküle bilden (GOLDAMMER et al., 2004; WELLNITZ & KERR, 2004; STRANDBERG et al., 2005; LAHOUASSA et al., 2007; GRIESBECK-ZILCH et al., 2008; GUNTHER et al., 2009). RINALDI et al. (2010) zeigten, dass Gewebe

aus den Bereichen der FBR, der ZZ und der Drüsenzisterne auf eine experimentelle *E. coli*-Infektion mit einer gesteigerten Expression verschiedener Chemokine, Zytokine und Toll-like-Rezeptoren reagiert. Das Gewebe der Zitzen- und der Drüsenzisterne reagierte hierbei früher als das Drüsengewebe. Dies weist darauf hin, dass neben den Milchdrüsenepithelzellen auch das Gewebe der Drüsenzisterne, der ZZ und der FBR entscheidend an einer frühen Erregererkennung und der Bildung von Entzündungsmediatoren beteiligt ist.

2.3 Zelluläre Abwehrmechanismen

Zellen des Immunsystems liegen im Euter sowohl im Gewebe als auch in der Milch vor. Die Milch einer gesunden Kuh enthält sehr wenige Zellen mit einem Zellgehalt < 100.000/mL. Der Anteil an PMN ist gering. Im Verlauf der Laktation steigt die Zellzahl und der Anteil der PMN an den Zellen der Milch nimmt zu (CONCHA, 1986).

Makrophagen

Die Angaben über den Anteil von Makrophagen an den Zellen der Milch variieren von ca. 10 % bis zu ca. 70 % (DOSOGNE et al., 2003; KOESS & HAMANN, 2008). Im Gewebe der Zitze stellen Makrophagen die dominante Immunzellpopulation dar (DÜVEL, 2010). Makrophagen sind ein Teil des angeborenen Immunsystems. Sie sind Phagozyten und Antigen-präsentierende Zellen, die der Erkennung von eingedrungenen Erregern und der Initiierung einer Immunantwort dienen (RAINARD & RIOLLET, 2006). Zur Pathogenerkennung sind sie mit TLRs, CD-14-, Mannose- und Scavenger-Rezeptoren ausgestattet. Makrophagen können aber auch indirekt über Komplement oder Fc-Rezeptoren aktiviert werden. Sobald sie pathogene Bestandteile erkannt haben, beginnen sie diese zu phagozytieren und sowohl zytotoxische als auch proinflammatorische Stoffe zu synthetisieren. Dadurch werden weitere Effektorzellen, wie PMN, an den Ort der Entzündung gelockt (PAAPE et al., 2002).

Polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN)

PMN sind ein weiterer Teil des unspezifischen Immunsystems. Nach einer Erregererkennung durch Makrophagen oder Milchdrüsenepithelzellen und die darauf folgende Freisetzung von Chemokinen wandern PMN in die Milchdrüse ein. Durch diese Rekrutierung beherrschen die neutrophilen Granulozyten das Zellbild sowohl im Gewebe als auch im Milchsekret während einer Mastitis.

Ihr Anteil an den Leukozyten steigt auf über 90 % (PAAPE et al., 2002). Die eingewanderten PMN phagozytieren sehr effektiv Komplement- und/oder Antikörper-opsonierte Erreger. Phagozytose durch PMN gilt als effektivste Abwehr gegen bakterielle Infektionen der Milchdrüse (PAAPE et al., 2002). Ein weiterer Wirkmechanismus der PMN ist der sauerstoffabhängige „Respiratory Burst“. Bei diesem werden große Mengen Superoxid und Hydrogenperoxid freigesetzt, die mit der Membran des Phagosoms interagieren und Hydroxyl- und Sauerstoffradikale bilden, welche Proteine, RNA und DNA der Bakterien schädigen (PAAPE et al., 2003). Die Granula der PMN enthalten Proteine wie Laktoferrin, Bactenezin, Lysozym, Peroxidase, Defensine und weitere hydrolytisch aktive Enzyme, die allesamt antimikrobiell wirken (SORDILLO et al., 1997). Die Anzahl und die Aktivität der eingewanderten PMN sind für die Schwere und die Dauer einer Mastitis von entscheidender Bedeutung (RAINARD & RIOLLET, 2006).

Lymphozyten

Die B-Lymphozyten können spezifische Antigene/Erregerbestandteile erkennen, aufnehmen, prozessieren und den T-Zellen präsentieren. Überdies sind sie die Vorläufer der Antikörper-sezernierenden Plasmazellen. Die Erreger werden über membranständige Antikörper erkannt, internalisiert, verarbeitet und antigene Epitope werden über MHC-II (major histocompatibility complex II) den T-Helferzellen präsentiert. Diese T-Lymphozyten aktivieren dann wiederum B-Lymphozyten, so dass diese proliferieren und sich zu antikörperproduzierenden Plasmazellen oder zu Gedächtniszellen differenzieren (SORDILLO et al., 1997).

T-Lymphozyten werden in zwei Subtypen unterschieden. Zu den $\alpha\beta$ -T-Lymphozyten werden die CD4- und die CD8- positiven T-Zellen gerechnet. Die zweite Gruppe bilden die $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten. Die jeweilige Anzahl und Verteilung im Milchdrüsengewebe hängt vom Laktationsstadium ab und kann stark variieren (SHAFER-WEAVER & SORDILLO, 1997). CD8-positive T-Zellen sind im Gegensatz zum Blut der dominierende Phänotyp der Milchdrüse und des Milchsekrets. Beide T-Zellsubtypen (CD4+, CD8+) in der Milch weisen eher Charakteristika von Gedächtniszellen auf und stellen demnach T-Zellen dar, die bereits einen Antigenkontakt erlebt haben und damit sehr schnell auf erneuten Antigenkontakt reagieren und zu Effektorzellen (T-Helferzellen, zytotoxische Zellen) ausdifferenzieren können (TAYLOR et al., 1994). Die biologische Rolle der

$\gamma\delta$ -T-Zellen in der Milchdrüse ist noch nicht hinreichend geklärt (SORDILLO & STREICHER, 2002).

Natürliche Killerzellen (NK)

Als ein weiterer Zelltyp des angeborenen Immunsystems sind die natürlichen Killerzellen (NK) zu nennen. Sie sind vor allem für die Elimination intrazellulärer Pathogene von Bedeutung. Sie töten infizierte Zellen mit einer reduzierten Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen (RAINARD & RIOLLET, 2006). Natürliche Killerzellen vermitteln ebenso die Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität. Sie binden mit ihren Fc-gamma-Rezeptoren Antikörper auf den zu tötenden Zielzellen und sezernieren daraufhin zytotoxische Moleküle wie Perforin und TNF- α .

2.4 Humorale Abwehrmechanismen

Das Immunsystem umfasst neben den zellulären Abwehrmechanismen auch eine Reihe humoraler Abwehrmechanismen, die für die Resistenz der Milchdrüse gegenüber Infektionen von Bedeutung sind. Dem unspezifischen Immunsystem wird das Komplementsystem zugeordnet. Über verschiedene Aktivierungswege induzieren Komplementfaktoren die Migration von PMN durch das Milchdrüsenepithel (z. B. C5a), fördern durch Opsonierung von Bakterien die Phagozytose und wirken bakteriolytisch (SORDILLO & STREICHER, 2002). Ebenfalls ein Teil der angeborenen Immunität ist Laktoferrin (Lf), ein eisenbindendes Protein. Es wirkt bakteriostatisch und bietet Schutz vor, durch freies Eisen katalysierten, Sauerstoffradikalen. Über das N-terminale Fragment Laktoferrizin kann Lf eine bakterizide Wirkung entfalten. Da es LPS bindet werden Lf des Weiteren anti-inflammatorische Eigenschaften zugesprochen (RAINARD & RIOLLET, 2006). Die Enzyme Lysozym, Laktoperoxidase und Xanthinoxidase kommen in der Milch in unterschiedlichen Konzentrationen vor und wirken allesamt antibakteriell (RAINARD & RIOLLET, 2006). Weitere lösliche Faktoren sind Antikörper. Die Antikörperisotypen IgG2 und IgM werden auch ohne externen Antigenstimulus produziert und dienen der Opsonierung (RAINARD & RIOLLET, 2006). In der Milchdrüse sind die Antikörper IgG1, IgG2, IgA und IgM für die Erregerabwehr von Bedeutung. Sie dienen der Opsonierung oder Neutralisierung. Während der Bildung von Kolostrum und während einer Entzündung liegen sie in den höchsten Konzentrationen vor (SORDILLO & STREICHER, 2002). Lösliches CD14 (sCD14; soluble CD14) ist ein weiterer

humoraler Faktor, der in Kolostrum und Milch vorkommt. Lösliches CD14 wird von Monozyten und Makrophagen freigesetzt und verstärkt als Korezeptor für LPS die Immunantwort des Wirts auf dieses, wodurch eine schnelle Erregereliminierung gefördert wird (FILIPP et al., 2001). Verschiedene lösliche Faktoren leisten somit einen Beitrag zur Abwehrbereitschaft des Euters. Im Folgenden soll auf eine weitere Gruppe humoraler Faktoren, die Zytokine und Chemokine, genauer eingegangen werden, da sie im Rahmen dieser Arbeit im Fokus der molekularbiologischen Untersuchungen lagen.

2.4.1 Zytokine und Chemokine

Zytokine und Chemokine sind endogene Mediatoren, die durch exogene Stimuli wie bakterielle und virale Produkte induziert werden und der Rekrutierung zirkulierender Leukozyten dienen. Diese Leukozyten werden dann an der Stelle der Entzündung aktiviert und eliminieren die Erreger. Zytokine spielen eine Schlüsselrolle in der Attraktion von Leukozyten, da sie wirkungsvolle Chemokin-Induktoren sind. Deshalb kann man Zytokine, wie Interleukin-1 (IL-1) und Interferon- γ (IFN- γ) als primäre Induktoren einer Immunantwort bezeichnen, während Chemokine als sekundäre Mediatoren wirken, die in der Lage sind Entzündungszellen anzulocken und zu aktivieren. Bei einer Entzündungsreaktion werden Zyto- und Chemokine gleichzeitig freigesetzt und interagieren in einem komplexen Netzwerk sowohl als Stimulatoren als auch als Inhibitoren der Immunantwort (GOUWY et al., 2005). Fast jeder Säugetier-Zelltyp kann Zytokine bilden und auf sie reagieren. Unter den Immunzellen produzieren T-Helferzellen (T_{H1} und T_{H2}) und Makrophagen am meisten Zytokine. Da Zytokine eine hohe Affinität zu ihren spezifischen Rezeptoren besitzen und hoch potent sind, können sie bereits in femtomolaren bis nanomolaren Konzentrationsbereichen biologische Reaktionen auslösen. Zytokine wirken, indem sie in den Zielzellen eine differentielle Expression bestimmter Gene induzieren. Das Spektrum der induzierten Gene variiert je nach Zelltyp und Interaktion mit anderen Zytokinen (GOUWY et al., 2005). Zu den Hauptgruppen der Zytokine zählen Interferone (IFN), Interleukine (IL), Kolonie-stimulierende-Faktoren (CSF, colony stimulating factor) und Tumornekrosefaktoren (TNF) (SORDILLO & STREICHER, 2002). Im Folgenden wird lediglich auf die in dieser Arbeit untersuchten inflammatorischen Zytokine IL-1 β und TNF- α und die Chemokine IL-8/CXCL8, RANTES/CCL5 und MIP-3 α /CCL20 eingegangen.

2.4.1.1 IL-1 β und TNF- α

Interleukin-1 β (IL-1 β)

Interleukin-1 (IL-1) ist ein proinflammatorisches Zytokin und einer der stärksten endogenen Fieber-Induktoren. IL-1 wird in zwei strukturell und funktionell ähnlichen Formen exprimiert. Man unterscheidet IL-1 α und IL-1 β . Ersteres verbleibt im Allgemeinen intrazellulär, während IL-1 β sezerniert wird. Deshalb wird davon ausgegangen, dass IL-1 α vor allem der Regulation intrazellulärer und lokaler Mechanismen dient und IL-1 β sowohl lokale als auch systemische Entzündungsreaktionen vermittelt (BANNERMAN, 2009). IL-1 β aktiviert Endothelzellen und Leukozyten und die Synthese Akuter-Phase-Proteine. Es besitzt die Fähigkeit Schock, Gefäßimpermeabilität und Multiorganversagen auszulösen (BANNERMAN, 2009). Bei einer Immunantwort der Milchdrüse vermittelt IL-1 β die Akute-Phase-Antwort, es fördert die Erhöhung der Anzahl an PMN, indem es deren Migration in die Milchdrüse in Gang setzt und es stimuliert die Phagozytose und antimikrobielle Aktivität der PMN (SORDILLO & STREICHER, 2002). Gebildet wird IL-1 durch Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen, Lymphozyten, Endothel- und Epithelzellen sowie Fibroblasten. Ausgelöst wird die Expression von IL-1 durch bakterielle, virale, parasitäre und Pilz-Infektionen, aber auch durch TNF- α , IL-12 und den Komplementfaktor C5a. IL-1 wiederum induziert die Produktion anderer Zytokine und Chemokine, darunter TNF- α , IL-6, IL-8 und verstärkt auto- wie parakrin seine eigene Produktion. Es wirkt synergistisch mit TNF- α und IL-6, wodurch deren Effekte verstärkt werden (BANNERMAN, 2009). Nach verschiedenen experimentellen intramammären *E. coli*-Infektionen konnte ein Anstieg der IL-1-Konzentration in der Milch festgestellt werden (BANNERMAN, 2009) und in verschiedenen Versuchsansätzen mit mammären Epithelzell-Kulturen konnte nach Zugabe von *E. coli* oder Produkten von *E. coli* ein Anstieg der IL-1-mRNA beobachtet werden (MCCLENAHAN et al., 2005; STRANDBERG et al., 2005; LAHOUASSA et al., 2007).

Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α)

Auf lokaler Ebene fördert TNF- α die Endothelzellaktivierung und die Rekrutierung von Leukozyten und aktiviert diese. Auf systemischer Ebene induziert TNF- α Fieber und die Synthese Akuter-Phase-Proteine. TNF- α kann, wie IL-1, jedoch auch Schock, Gewebeschädigung, Gefäßimpermeabilität, Multiorganversagen und disseminierte intravasale Koagulopathie hervorrufen (BANNERMAN, 2009).

Bei der perakuten coliformen Mastitis ist TNF- α der hauptauslösende Faktor des Toxin-vermittelten Schocksyndroms, der zum Tod des Tieres führen kann (SORDILLO & STREICHER, 2002). Gebildet wird TNF- α von verschiedenen Zellen, vor allem Makrophagen, aber auch Lymphozyten, PMN und Epithelzellen. Induziert wird die Produktion durch virale und parasitäre Pathogene, durch Pilze, durch bakterielle Zellwandprodukte und bakterielle Toxine, durch andere Zytokine, wie IL-1 und IFN- γ , sowie durch Faktoren des Komplementsystems (BANNERMAN, 2009). TNF- α wirkt, indem es die Produktion sekundärer Mediatoren stimuliert. Während einer koliformen Mastitis wird TNF- α produziert und konnte nach experimenteller Infektion mit *E. coli* und LPS von *E. coli* sowohl in Milch als auch im Blut in erhöhter Konzentration nachgewiesen werden. Andere gram-negative Bakterien rufen ähnliche TNF- α -Antworten hervor wie *E. coli* (BANNERMAN, 2009). Es wurde sowohl in experimentellen Infektionen als auch bei natürlich auftretenden koliformen Mastitiden beobachtet, dass die TNF- α -Konzentration mit der Schwere der Erkrankung korreliert (OHTSUKA et al., 2001). Demgegenüber rufen gram-positive Keime eine verminderte und verzögerte TNF- α -Reaktion hervor. In zwei unabhängigen Studien zur TNF- α -Konzentration in Milch nach experimenteller Infektion mit *S. aureus* konnte keinerlei Produktion dieses Zytokins festgestellt werden (RIOLLET et al., 2000; BANNERMAN et al., 2004b). In Zellkulturen konnte gezeigt werden, dass Milchdrüsenepithelzellen (sowohl MAC-T als auch pbMEC) nach Stimulation mit LPS das Zytokin TNF- α verstärkt exprimieren (WELLNITZ & KERR, 2004; MCCLENAHAN et al., 2005).

2.4.1.2 IL-8/CXCL8, MIP-3 α /CCL20 und RANTES/CCL5

Chemokine sind Peptid-Zytokine, die als chemoattraktive Substanzen an der Rekrutierung von Entzündungszellen in das Gewebe beteiligt sind. Chemokine werden durch Zytokine wie IL-1 und TNF- α , aber auch direkt durch verschiedene exogene Stimuli, wie mikrobielle Produkte (TLR-Liganden), induziert. Chemokine werden nach der Anzahl und der Gruppierung von konservierten Cysteinresten am Aminoende des Peptids in vier Familien unterschieden: C, CC, CXC und CX₃C (PAREEK et al., 2005). Die CXC-Chemokine enthalten eine Aminosäure zwischen den beiden Cysteinresten und werden des Weiteren in ELR⁺- und ELR⁻-Chemokine unterteilt. Die Einteilung beruht darauf, ob den beiden ersten Cysteinresten die drei Aminosäuren Glutamat-Leucin-Arginin vorangestellt sind

(ELR-Tripeptidstrukturmotiv). ELR⁺-Chemokine (IL-8/CXCL8, GRO- α /CXCL1) wirken aktivierend und chemotaktisch auf PMN während ELR⁻-Chemokine (IP-10/CXCL10, Mig/CXCL9, I-TAC/CXCL11) vor allem chemotaktisch auf Lymphozyten wirken (GOUWY et al., 2005). Die CC-Chemokine sind dadurch gekennzeichnet, dass die beiden konservierten Cysteinreste des Aminoendes direkt nebeneinanderliegen. Im Gegensatz zu den CXC-Chemokinen besitzen die CC-Chemokine ein breiteres Spektrum an Zielzellen (GOUWY et al., 2005).

Interleukin-8 (IL-8/CXCL8)

Das Chemokin IL-8/CXCL8 dient vor allem der Rekrutierung und Aktivierung neutrophiler Granulozyten. Es reagiert mit den spezifischen Rezeptoren CXCR1 und CXCR2, welche von neutrophilen Granulozyten exprimiert werden. PMN sind daher die primären Zielzellen des IL-8 und reagieren auf dieses mit Chemotaxis, Freisetzung von Granulaenzymen und Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies. IL-8 wirkt in geringerem Maße auch auf Monozyten chemotaktisch (GOUWY et al., 2005). Im Gegensatz zu anderen Chemokinen ist IL-8 in der Lage einen länger anhaltenden Effekt hervorzurufen, da es eine hohe Resistenz gegen proteolytische Degeneration und somit eine langsame Elimination aus dem Gewebe zeigt (HEBERT & BAKER, 1993). Gebildet wird IL-8 von einer ganzen Reihe von Zellen unter anderem Monozyten, Makrophagen, Endothel- und Epithelzellen, Fibroblasten, PMN und T-Lymphozyten. Es wird als Antwort auf proinflammatorische Stimuli gebildet, die exogenen Ursprungs (Viren, Bakterien, Pilze, Parasiten und deren Produkte) oder endogen (TNF- α , IL-1 β) sein können. TNF- α stimuliert die IL-8-Sekretion zeit- und dosisabhängig, IL-1 β wirkt dabei synergistisch (GOUWY et al., 2005; BANNERMAN, 2009). Verschiedene Studien konnten zeigen, dass IL-8 in der Milch während einer *E. coli*-Mastitis im Vergleich zu gesunden Vierteln in erhöhter Konzentration vorliegt. Im Gegensatz zu anderen gram-negativen Erregern, die ebenfalls einen Anstieg von IL-8 in der Milch hervorrufen, ist dieser Effekt nach einer Infektion mit *S. aureus* vermindert oder fehlt ganz (BANNERMAN, 2009). In der Zellkultur konnte gezeigt werden, dass Euter-epithelzellen nach Stimulation mit LPS von *E. coli* IL-8 bilden (WELLNITZ & KERR, 2004).

Macrophage inflammatory protein-3 α (MIP-3 α /CCL20)

Das CC-Chemokin MIP-3 α (macrophage inflammatory protein-3 α)/CCL20 wirkt chemotaktisch auf T-Lymphozyten, vor allem auf T-Gedächtniszellen, und dendritische Zellen. MIP-3 α wird von Fibroblasten, intestinalen Epithelzellen und Keratinozyten gebildet, weshalb ihm eine wichtige Rolle an der Kontaktfläche zwischen Organismus und Umwelt zugeschrieben wird (HOMEY et al., 2000). Die Induktion von MIP-3 α erfolgt durch verschiedene Zytokine, insbesondere TNF- α (GOUWY et al., 2005). CCL20 ist als Chemokin auch an der Rekrutierung von Immunzellen im Rahmen der Erregerbekämpfung bei der bovinen Mastitis beteiligt. So konnten RINALDI et al. (2010) zeigen, dass bei Kühen die Genexpression von CCL20 in Gewebe aus der FBR, der ZZ und der Drüsenzisterne nach experimenteller Infektion mit *E. coli* signifikant hochreguliert wird. GÜNTHER et al. (2009) konnten die gleichen Beobachtungen an Kulturen primärer boviner Milchdrüsenepithelzellen (pbMEC) machen. Sie stellten fest, dass die MEC auf eine Stimulation mit hitzeinaktivierten *E. coli* mit einer Hochregulation verschiedener Chemokine, darunter CCL20 reagierten. Diese Reaktion konnte auch im Eutergewebe von Kühen, das 24 h nach experimenteller *E. coli*-Infektion entnommen wurde, nachgewiesen werden.

Regulated on activation normal T cell expressed and secreted (RANTES/CCL5)

RANTES (regulated on activation normal T cell expressed and secreted)/CCL5 ist ein Chemokin, das ursprünglich als Produkt aktivierter T-Lymphozyten identifiziert wurde. Es wird aber auch von einigen anderen Zelltypen, wie Endothel- und Epithelzellen, Fibroblasten und Keratinozyten nach Stimulation durch verschiedene Zytokinkombinationen gebildet (GOUWY et al., 2005). Über spezifische Rezeptoren wirkt CCL5 chemotaktisch auf Blut-Monozyten, Makrophagen, T-Gedächtniszellen und eosinophile Granulozyten. Es dient der Aktivierung von T-Lymphozyten und der Degranulation von basophilen Zellen. In Zellkulturen boviner Milchdrüsenepithelzellen zeigt RANTES sowohl nach Kontakt der Zellen mit *E. coli* als auch nach Kontakt mit LPS eine verstärkte Genexpression (PAREEK et al., 2005; GRIESBECK-ZILCH et al., 2008; GUNTHER et al., 2009). Auch im infizierten Euter wird CCL5 als Reaktion auf Pathogenkontakt herauf reguliert (GUNTHER et al., 2009).

2.5 S100-Proteine

Die S100-Proteine sind kleine saure Proteine, die durch zwei Kalzium-bindende EF-Hand-Motive gekennzeichnet sind (HEIZMANN et al., 2002). Die ersten Mitglieder der S100-Protein-Familie wurden vor mehr als 40 Jahren aus bovinem Gehirn gewonnen. Sie erhielten ihren Namen „S100“ aufgrund ihrer Löslichkeit in 100 %iger Ammonium-Sulfat-Lösung. Mittlerweile kennt man mehr als 20 Mitglieder dieser Proteinfamilie (HEIZMANN et al., 2002). Die S100-Proteine können der Gruppe der „damage-associated molecular patterns“ (DAMPs) zugeordnet werden. Diese Molekülgruppe bildet mit ihren wichtigen proinflammatorischen Faktoren einen Teil des angeborenen Immunsystems. DAMPs werden bei zellulärem Stress durch aktivierte, geschädigte oder zerstörte Zellen freigesetzt. Weitere Namen für diese Gruppe sind „Endokine“ und „Alarmine“ (ROTH et al., 2003). DAMPs binden an RAGE (multiligand receptor for advanced glycation end products) und TLRs. Letztere erkennen bei einer Infektion also nicht nur Erregerstrukturen (PAMPs), sondern auch die endogen von geschädigten Zellen freigesetzten DAMPs. Somit vermitteln DAMPs eine Entzündungsreaktion und rekrutieren Immunzellen (FOELL et al., 2007). Die drei S100-Proteine S100A8 (Calgranulin A; myeloid-related protein 8, MRP8), S100A9 (Calgranulin B; MRP14) und S100A12 (Calgranulin C; extracellular newly identified RAGE binding protein, EN-RAGE) spielen durch ihre Expression in myeloiden Zellen eine besondere Rolle in der angeborenen Immunität. Sie werden aufgrund ihrer Kalzium-bindenden Fähigkeit und ihrer hohen Expression in Granulozyten als Calgranuline bezeichnet. Als intrazelluläre, zytoplasmatische Proteine sind sie aufgrund ihrer Kalzium-, Zink- und Kupfer-bindenden Fähigkeit an der Zellhomöostase beteiligt und spielen eine wichtige Rolle in der Zellmigration und dem Zytoskelett-Metabolismus. Nach Freisetzung in den Extrazellularraum, durch Zellschädigung oder Aktivierung von Granulozyten, verwandeln sie sich in proinflammatorische Gefahrensignale, die Immunzellen und Gefäßendothel aktivieren. Extrazellulär besitzen die S100-Proteine außerdem antibakterielle und antiparasitäre Eigenschaften (FOELL et al., 2007).

S100A8 (Calgranulin A; myeloid-related protein 8, MRP8) und S100A9 (Calgranulin B; MRP14)

S100A8 und S100A9 werden im Zytoplasma von Granulozyten, Monozyten und Frühstadien von Makrophagen exprimiert. Außerdem kann die Expression dieser S100-Proteine bei Entzündungsvorgängen in Keratinozyten und Epithelzellen

induziert werden, in gesunder Haut kommt es jedoch nicht vor (FROSCH et al., 2005; GOYETTE & GECZY, 2010). S100A8 und S100A9 können sowohl als Homodimer als auch als Heterodimer vorliegen. Das Heterodimer wird als Calprotectin bezeichnet. Im Zytosol bindet es an Microtubuli und die Zellmembran, stabilisiert diese und unterstützt somit die Migration von Phagozyten (FOELL et al., 2007). Extrazellulär zeigt es ein weites Spektrum an antimikrobieller Aktivität gegen Mikroorganismen, unter anderem *E. coli* und *S. aureus* (CHAMPAIBOON et al., 2009). S100A8/S100A9 wird von aktivierten Phagozyten sezerniert und liegt bei Infektionen und Entzündungen in erhöhtem Maße in Serum und Körperflüssigkeiten vor. Es dient als Markerprotein für aktivierte Phagozyten. (FOELL et al., 2007). Nach ihrer Freisetzung binden S100A8 und S100A9 spezifisch an Endothelzellen und induzieren dort eine prothrombotische und inflammatorische Antwort, indem sie die Expression proinflammatorischer Zytokine, wie IL-8 und Adhensionsmoleküle wie ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) heraufregulieren. Zusätzlich sorgen sie für eine erhöhte vaskuläre Permeabilität. In Phagozyten induzieren sie die Heraufregulation der Adhensionsmoleküle CD11b/CD18 und unterstützen somit die Migration dieser Zellen (FOELL et al., 2007).

S100A12 (Calgranulin C; extracellular newly identified RAGE binding protein, EN-RAGE)

S100A12 wird von Granulozyten exprimiert und liegt in deren Zytosol als Homodimer vor. Es zeigt keine Interaktionen mit S100A8/S100A9 (VOGL et al., 1999). Bei Entzündungsvorgängen wird es überexprimiert. Es wird durch aktivierte Granulozyten sezerniert und bindet an RAGE, welches auf Makrophagen, Lymphozyten und Endothelzellen exprimiert wird. Die Bindung führt zur Aktivierung der NF- κ B-Kaskade und damit zur Synthese und Sekretion proinflammatorischer Faktoren (HOFMANN et al., 2002). Des Weiteren erhöht S100A12 die Expression der Adhensionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) auf Endothelzellen und fördert somit die Migration von Entzündungszellen ins Gewebe (FOELL et al., 2007). Es wirkt chemotaktisch und aktivierend auf Mastzellen (GOYETTE & GECZY, 2010). In Zellkulturen boviner Keratinozyten induzierten IL-1 α und TNF- α die Expression von S100A12 (GOTTSCHE et al., 1999). LUTZOW et al. (2008) konnten zeigen, dass in Zellkulturen primärer boviner Epithelzellen (pbMEC) S100A12 exprimiert wird. Die Expression zeigte nach Stimulation mit LPS oder LTA

(Lipoteichonsäure) einen signifikanten Anstieg. In der Molke von mit *S. aureus* infizierten Eutervierteln konnte mittels ELISA eine erhöhte Konzentration von S100A12 festgestellt werden. Die erhöhte Menge an S100A12 in der Milch infizierter Viertel korrelierte signifikant mit der somatischen Zellzahl (SCC). Rekombinantes S100A12 inhibierte das Wachstum von *E. coli* dosisabhängig. Das deutet darauf hin, dass es eine direkte Rolle im Schutz des Eutergewebes vor Infektionen mit koliformen Keimen spielen könnte (LUTZOW et al., 2008).

3 In-vitro-Techniken zur Untersuchung zellulärer immunologischer Mechanismen der Milchdrüse

Die Milchdrüse stellt ein ideales Modellsystem zur Untersuchung grundlegender Vorgänge auf zellulärer Ebene dar. In-vitro-Techniken bieten dabei die Möglichkeit, unter definierten Bedingungen und mit relativ wenig Aufwand und geringen Kosten, Zellen in ihrem Wachstum und in ihrer Differenzierung zu manipulieren und physiologische, pathophysiologische oder endokrinologische Vorgänge an ihnen zu untersuchen. Die dabei verwendeten Methoden reichen von Experimenten am isolierten Gesamtorgan, über die Kultivierung von Organteilen (Explantkulturen) bis hin zu Zellkulturen primärer Milchdrüsenzellen und Zellkulturen immortalisierter Zelllinien. Im Folgenden sollen Anwendungsmöglichkeiten, methodische Herangehensweisen sowie Vor- und Nachteile von mammären Zell- und Explantkultursystemen vorgestellt werden.

3.1 Zellkultur

Unter Zellkultur versteht man die in-vitro-Kultivierung isolierter Zellpopulationen. Man kann hierbei unterscheiden, ob die Zellen direkt aus einem Organ gewonnen und unverändert eingesetzt werden (= „primäre Zellen“), oder ob immortalisierte Zelllinien verwendet werden, die aus Tumoren oder veränderten primären Zellen stammen (MATITASHVILI et al., 1997).

3.1.1 Milchdrüsenepithelzellen

Primäre bovine Milchdrüsenepithelzellen (pbMEC)

Unter primären Epithelzellen versteht man direkt aus dem Tier isolierte Zellen, die unverändert in den in-vitro-Kultursystemen eingesetzt werden. Ihr morphologischer Status, sowie ihre physiologischen und metabolischen Reaktionen entsprechen nahezu der Situation *in vivo*. In den 1980er Jahren wurde die Methode

für die Gewinnung und Kultivierung von pbMEC entwickelt (MACKENZIE et al., 1982; MACKENZIE et al., 1985). Nachfolgend wurde diese Methode vor allem zur Untersuchung laktationsphysiologischer und immunologischer Fragestellungen genutzt (CIFRIAN et al., 1994; WELLNITZ & KERR, 2004).

Zelllinien

Da bei primären Epithelzellkulturen bereits eine geringe Anzahl an Passagen dazu führt, dass die Zellen Anteile ihrer ursprünglichen Eigenschaften verlieren, die Gewinnung relativ aufwendig ist und die Zellen sich aufgrund der individuellen Unterschiede der Donortiere in ihren Eigenschaften unterscheiden können, kann die Arbeit mit gut charakterisierten und immortalisierten bovinen mammären (Epithel-) Zelllinien von Vorteil sein. Diese Zellen sind vergleichsweise homolog und können problemlos mehrfach passagiert werden. Deren Verwendung in verschiedenen Labors macht die Ergebnisse besser vergleichbar. Eine solche klonale Zelllinie stellt die MAC-T (Mammary Alveolar Cell-Large T-antigen) dar, die durch die Transfektion von primären bovinen Milchdrüsenepithelzellen mit Simian Virus-40 (SV-40) T-Antigen hergestellt wurde. Dabei wurden Plasmide des Virus in das Genom der Zellen eingebaut, wodurch sie immortal wurden. Sie besitzen dabei eine ganze Reihe von morphologischen und physiologischen Eigenschaften einer Milchdrüsenepithelzelle (HUYNH et al., 1991). Diese Zelllinie wurde vermehrt genutzt, um den Einfluss verschiedener Wachstumshormone und die Interaktion mit pathogenen Erregern zu untersuchen. Weitere Zelllinien sind die HH2a-Zelllinie, eine spontan immortalisierte bovine Milchdrüsenepithelzelllinie, die für die Untersuchung von Zell-zu-Zell-Kontakten geeignet erscheint (HUYNH & POLLAK, 1995) sowie die Zelllinien BME-UV und BME-UV1, die durch Transfektion mittels Mikroinjektion des SV-40 T-Antigens immortalisiert wurden und sich aufgrund ihrer Reaktion auf Epithelial growth factor (EGF) für die Erforschung von dessen Rolle bei Proliferation und Differenzierung von Milchdrüsenepithelzellen eignen (ZAVIZION et al., 1996). Ein Nachteil von Zelllinien besteht darin, dass sie nicht so homogen sind, wie es zunächst erschien (ZAVIZION et al., 1995), und dass sie auf einem einzigen Genotyp basieren, was die Unanfechtbarkeit der gewonnenen Daten limitiert (WELLNITZ & KERR, 2004).

Die Milchdrüsenepithelzellenkultur bietet somit ein geeignetes Modell, um Interaktionen zwischen Bakterien und Epithel zu untersuchen und die Rolle der

Milchdrüsenepithelzelle bei der Immunabwehr weiter aufzuklären. So erlauben Epithelzellkulturen von der ZZ und den Milchgängen die Vorgänge von Adhäsion, Invasion und Zytotoxizität von Bakterien zu untersuchen (CIFRIAN et al., 1994). Außerdem kann man die Reaktion des Drüsenepithels auf Mastitiserreger wie *E. coli* oder *S. aureus* und auf deren Bestandteile untersuchen. So wurden MAC-T-Zellen verwendet um zu zeigen, dass mamäre Epithelzellen auf Inkubation mit *E. coli* oder LPS mit einer Hochregulierung verschiedener Zytokine reagieren (MCCLLENHAN et al., 2005). Auch primäre Epithelzellkulturen eignen sich dafür, diese Effekte aufzuzeigen (WELLNITZ & KERR, 2004; GUNTHER et al., 2009). Es ist in solchen Modellen möglich, alle Zellen gleichzeitig einem definierten Infektionsdruck auszusetzen, ohne dass Einflüsse der Umgebung hinzukommen. Außerdem ist die Beobachtung zeitabhängiger Effekte und Mechanismen möglich; das erlaubt die Bestimmung früher und später Antwortmechanismen des Wirts auf Pathogene. Die Kryokonservierung von Epithelzellen macht es möglich, aufeinander folgende Experimente mit der gleichen Zellpopulation durchzuführen.

3.1.2 Andere mamäre Zellen

Die Bedingungen in der Zellkultur entsprechen nur sehr bedingt den in-vivo-Bedingungen im Organ. Im Euter bilden die Zellen keinen Monolayer wie in der Petrischale. Natürlicherweise zeigen sie, umgeben von Myoepithelzellen und in Abhängigkeit von der Extrazellulären Matrix, ein dreidimensionales Wachstum (DARCY et al., 2000). Das sezernierende Gewebe der Milchdrüse besteht aus Alveoli, ausgekleidet mit einschichtigen sekretorischen Epithelzellen. Diese Epithelzellen sind korbartig von Myoepithelzellen umgeben, die auf Oxytozin mit Kontraktion reagieren und so die Milchejektion induzieren. So wurden Kulturen verwendet, um Interaktionen zwischen den natürlich nebeneinander vorliegenden Zellen zu untersuchen. ZAVIZION et al. (1992a, 1992b) haben Myoepithelzellen sowohl allein als auch in Kombination mit Epithelzellen in Kultur genommen. Sie fanden heraus, dass Myoepithelzellen auch *in vitro* kontraktile auf Oxytozin reagieren und in der Lage sind, auf einzelne Epithelzellen und auf Epithelzellansammlungen zuzuwandern und diese in Kolonien zu organisieren. Außerdem wuchsen sie auf Epithelzellmonolayern. Daraus wurde geschlossen, dass Myoepithelzellen für die Organisation der typischen Architektur von Milchdrüsenengewebe verantwortlich sind. An Zellen von Mäusen untersuchten

DARCY et al. (2000) die parakrine Interaktion von Epithelzellen und Fibroblasten. Dabei wurden im Unterschied zu vorangegangenen Arbeiten primäre Epithelzellen verwendet und die verschiedenen Zelltypen ohne direkten Kontakt in Transwell-Einsätzen inkubiert. Die Anwesenheit der Fibroblasten stimulierte das Wachstum der Epithelzellen; gleichzeitig induzierte sie alveolare Morphogenese und gesteigerte Kasein-Produktion.

3.2 Explantkulturen der Milchdrüse

Unter Explantkulturen versteht man die Inkubation von Gewebeteilen *in vitro*, wobei Zellen in der sie umgebender Extrazellulärmatrix belassen werden. Dadurch werden in entsprechenden Modellexperimenten die *in-vivo*-Bedingungen besser simuliert. Ein „Explant“ ist ein Gewebestück, das einem Organismus entnommen wurde, um es in Wachstumsmedium in Kultur zu nehmen. Solche Gewebekulturen stellen einen Kompromiss zwischen Zellkulturmethoden und den viel komplexeren Organkulturen dar. Erstmals wurde über diese Methode in den 1920er Jahren berichtet (WARBURG, 1923). Seitdem wurde sie weit genutzt und mit verschiedenen Organen (Gehirn, Niere, Leber, Lunge, Herz- und glatte Muskulatur, Lymphgewebe, Plazenta, Euter, Nebenniere, Schilddrüse, Gastrointestinaltrakt etc.) und verschiedenen Spezies (Primaten, zahlreiche Labor- und Haussäugetiere und einige exotische Arten) durchgeführt (BACH et al., 1996).

3.2.1 Vor- und Nachteile der Explantkultur

Die Hauptvorteile der Kultivierung ganzer Gewebestreifen oder -stücke liegen darin, dass alle Zelltypen des Organs in ihren ursprünglichen räumlichen Beziehungen und mit der Möglichkeit zu nahezu physiologischer interzellulärer Kommunikation und zellulärer Interaktion vorliegen. Die Anwesenheit verschiedener Zelltypen erlaubt sowohl die regionalen organspezifischen als auch die zellspezifischen Effekte *in vitro* zu untersuchen. Ein weiterer Vorteil ist die Möglichkeit das Gewebe verschiedener Organe zusammen in Kokulturen untersuchen zu können. Außerdem erleichtert diese Methode das Anfertigen histologischer Präparate als Alternative oder zusätzlich zu anderen Untersuchungsverfahren (BACH et al., 1996). Schwierigkeiten bereitet dagegen die Anfertigung von gleichgroßen, vergleichbaren Gewebeteilen für die Explantkultur, insbesondere für den „Anfänger“. Vor allem bei manueller Präparation leidet deshalb oft die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse (BACH et al., 1996).

Auch ist es schwierig, in einem solchen System bestimmte Zelltypen (z. B. Epithelzellen) und ihre Reaktionen einzeln und differenziert zu betrachten, da eine Mischung verschiedener Zellen vorliegt. Die Interpretation wird außerdem durch die Möglichkeit der Verschleppung von Wachstumsfaktoren/-inhibitoren oder Hormonen im Gewebe, die dann während der Inkubation aktiviert werden, und der Schwierigkeit die Zellzahl in den Explants zu bestimmen, erschwert (MATITASHVILI et al., 1997). Im Gegensatz zur Zellkultur ist es nicht möglich lebensfähige Zellen anzureichern (BACH et al., 1996). Außerdem ist bei Exposition der Zellen mit Pathogenen oder deren Bestandteilen die Reaktionsweise der Explants variabler als in der Zellkultur (WELLNITZ & KERR, 2004). Die freiliegenden Schnittbereiche der Explants, welche unter in-vivo-Bedingungen für Erreger nicht zugänglich sind, erschweren beispielsweise die Untersuchung zur Bakterienadhäsion an Euterepithelzellen (CIFRIAN et al., 1994). Das Modell wird des Weiteren dadurch eingeschränkt, dass Explants lediglich eine limitierte Zeit in Kultur tolerieren (MATITASHVILI et al., 1997). Die Vor- und Nachteile der Explant-Kultivierung gegenüber der Zellkultivierung sind in den Tabellen 1 und 2 zusammengefasst.

Tab. 1: Vor- und Nachteile der Explantkultur nach BACH et al. (1996)

Explantkultur – Vorteile	Explantkultur – Nachteile
Repräsentiert die Komplexität des intakten Organs	Kurze Lebensdauer von Explants in Kultur
Alle Zelltypen in ursprünglicher räumlicher Beziehung erhalten	Keine Anreicherung lebensfähiger Zellen möglich
Zellkommunikation und Zellinteraktionen möglich	Freiliegen von <i>in vivo</i> nicht freiliegenden Gewebebestandteilen, an die sich z. B. Bakterien anheften können
Untersuchung von hormonellen Effekten in ursprünglicher Umgebung möglich	Genaue Bestimmung der kultivierten Zellzahl bereitet Schwierigkeiten
Kokulturen verschiedener Organe möglich	Variabilität in der Exposition der Zellen
Ermöglicht Studium der Morphologie und deren Genese (Dreidimensionale Anordnung möglich)	Schwierigkeit reproduzierbare Daten zu erheben, da Erstellung gleich großer Explants (v.a. per Hand und für Ungeübten) schwierig
Erleichtert die Histologie als Alternative oder zusätzliche Untersuchungsmethode	Differenzierte Betrachtung einzelner Zelltypen (Zielzellen für bestimmte Substanzen) ist schwierig
	Relativ neue Methode, die sich noch in der Entwicklung befindet

Tab. 2: Vor- und Nachteile der Zellkultur nach BACH et al. (1996)

Zellkultur – Vorteile	Zellkultur – Nachteile
Gut bewährte, gut charakterisierte und weit genutzte Methode	Kulturbedingungen entsprechen nur sehr bedingt den Bedingungen <i>in vivo</i>
Lebensfähigkeit der Zellen bleibt unter spezifischen Bedingungen bis zu vier Wochen erhalten	Nur vorselektierte Zellen können untersucht werden
Ermöglicht Beobachtung von Zeitverläufen	Zellisolation kann sehr aufwendig und zeitraubend sein
Anreicherung lebensfähiger Zellen möglich	Studium zellulärer Interaktionen schwieriger
Kryokonservierung lebensfähiger Zellen möglich	Durch Zellisolation werden Zellen geschädigt (Nutzung proteolytischer Enzyme)
Bietet Möglichkeit zur Untersuchung definierter Zelltyp-Interaktionen (Kokulturen)	Verlust typischer Zellmerkmale nach wiederholter Passage
Alle Zellen der Kultur können gleichzeitig einem gleichen definierten Infektionsdruck ausgesetzt werden	Bei Verwendung immortalisierter Zelllinien besteht die Schwierigkeit der Interpretation, da Ursachen für die Fähigkeit der Zellen, verlängert in Kultur zu wachsen, unbekannt sind

3.2.2 Verwendete Methoden

Während für Explantkulturen der murinen Milchdrüse schon viele Erfahrungen vorliegen, wurde mit der Milchdrüse von Wiederkäuern bisher relativ selten gearbeitet.

Die Methode der Explantgewinnung aus dem Organ spielt eine entscheidende Rolle, da von ihr sowohl die Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit der gewonnenen Daten als auch die Qualität und somit Lebensdauer des verwendeten Gewebes abhängen. Die Methoden reichen von der Präparation per Hand mit Skalpell und Schere bis zu voll automatischen Schneidegeräten. Die Nachteile der Präparation mit Skalpell und Schere liegen vor allem darin, dass die Gewebegröße schwer zu reproduzieren ist und das Gelingen der Methode stark von der Erfahrung des Anwenders abhängig ist. Die Vorteile dieser Herangehensweise liegen darin, dass sie billig, leicht etablierbar und – in der Hand erfahrener Anwender – auch erfolgreich ist. Mit zunehmender Technisierung des Zerkleinerungsvorgangs werden zwar die Explants gleichförmiger, aber der Aufwand und die Kosten der Methode auch erheblich höher (BACH et al., 1996). Bei der Präparation von Milchdrüsengewebe wurde meist die Methode per Hand gewählt und das Gewebe mit einem Skalpell oder einer feinen Schere in 1 – 2 mm³ große

Stücke zerschnitten (SHAMAY et al., 1988; THOMAS et al., 1992; HURLEY & REJMAN, 1993). Es wurden jedoch auch schon Stadie-Riggs-Hand-Mikrotome und McIlwain Tissue Chopper für die Anfertigung von Milchdrüsenexplants verwendet (FEKRY et al., 1989; KEYS et al., 1991; MOUNT et al., 2009). RABOT et al. (2007) benutzten ein BARD[®] Magnum[®] Biopsy Instrument mit der zugehörigen Biopsienadel zur Entnahme von Milchdrüsengewebe und nahmen die gewonnenen Biopsien direkt in Kultur. Als von Vorteil wurde hierbei bezeichnet, dass die Gewebeproben in Form und Gewicht gleichförmig waren, und dass die sehr dünnen und langen Gewebeproben eine große Kontaktfläche zum Kulturmedium besaßen, was die Absorption von Stoffen erleichterte. Außerdem benötigte das Gewebe keine weiteren Aufbereitungsschritte.

Die Dicke der Explants sollte so gewählt werden, dass ein schneller Austausch von Nahrungs- und Abfallstoffen erleichtert wird. Als Anhaltspunkt kann hierbei das Gewicht der Gewebeprobe dienen (BACH et al., 1996). Bei Versuchen mit der Milchdrüse lag dieses im Bereich zwischen 0,6 – 1 mg und 3 – 6 mg (JUERGENS et al., 1965; SHAMAY et al., 2005). Die Entnahme der Proben sollte, wenn möglich, am lebenden Tier oder direkt nach dem Tod stattfinden, und die Explants sollten sofort in eine Pufferlösung mit +4°C überführt werden. Deutliche Schwankungen in der Osmolalität während Transport, Zerkleinerung und Inkubation sollten vermieden werden (BACH et al., 1996). Bei der Wahl des Mediums spielt die gewünschte Inkubationszeit die entscheidende Rolle. Für kurzzeitige Kulturen eignet sich eine physiologische Salzlösung (Balanced salt solution) oder auch ein Gewebekultur-Medium mit den entsprechenden Zusätzen (z. B. Fetales Kälber Serum [FKS] 5 – 10 % und die Hormone Insulin oder Hydrocortison), während sich für eine Langzeit-Kultur nur letzteres eignet. Soll das Gewebe über längere Zeit in Kultur bleiben, sollten auch Antibiotika (Gentamycin, Streptomycin, Penizillin) und ein Antimykotikum zugesetzt werden. Für die meisten Systeme ist ein Verhältnis von einem Explant pro mL Medium erfolgreich (BACH et al., 1996). Für Explantkulturen der Milchdrüse wurden verschiedene Medien verwendet. Regelmäßig wurden Insulin und Hydrocortison sowie, je nach Versuchsansatz, zusätzlich Antibiotika, Antimykotikum, Glukose, Bovines Serumalbumin (BSA) oder Prolaktin zugesetzt. Die Inkubation der Explants erfolgte bei 37°C und 5 % CO₂ über 3 h bis hin zu 10 Tagen. Einige Autoren legten die Explants auf imprägniertes Linsenpapier (JUERGENS et al.,

1965; BARASH et al., 1999; SHAMAY et al., 2005; MENZIES et al., 2009) oder Metallsiebe (FEKRY et al., 1989; HOM et al., 1996), damit sie nicht frei im Medium herumschwimmen konnten.

Eine Methode, die zur Auswertung der Ergebnisse herangezogen werden kann, ist die Lichtmikroskopie (THOMAS et al., 1992; BRENNAN et al., 2008). MOUNT et al. (2009) verwendeten zum Beispiel die H.E.-Färbung, um die Lebensfähigkeit der Explants nach der Inkubation zu überprüfen. Mit der immunhistochemischen Darstellung von Vimentin bestimmten sie das ungefähre Verhältnis von Epithel- zu Mesenchymzellen. Weitere zur Auswertung herangezogene Methoden waren Immunopräzipitation und Fluorographie (HURLEY & REJMAN, 1993), Dünnschichtchromatographie und Radioimmunoassay (FEKRY et al., 1989; KEYS et al., 1991), Zellkernextraktion und Elektrophorese (YANG et al., 2000) sowie RNA-Extraktion mit anschließendem Northern Blot oder RT-PCR (YANG et al., 2000; BAUMGARD et al., 2002; SHAMAY et al., 2005; RABOT et al., 2007; MOUNT et al., 2009).

3.2.3 Ergebnisse bisheriger Experimente mit bovinen mammären Explantkulturen

Explants der Milchdrüse wurden häufig für Untersuchungen von Vorgängen, die während des Milchdrüsenwachstums und der Morphogenese der verschiedenen Entwicklungsstadien ablaufen, verwendet. Hierbei wurden endokrinologische Vorgänge, Zellkommunikation und Interaktionen zwischen verschiedenen Zelltypen untersucht. Außerdem wurden die Synthese verschiedener Milchbestandteile und immunologischer Vorgänge in der Milchdrüse im Zusammenhang mit Mastitis untersucht.

Anhand von Explants fand man heraus, dass außer der Leber auch mammäre Epithelzellen Albumin synthetisieren und sezernieren, und dass die Synthese und Sekretion bei Mastitis und nach Zugabe von LPS dosisabhängig erhöht sind. Dies führte zu der Annahme, dass die Sekretion von Albumin einen Mechanismus der angeborenen Immunität darstellt (SHAMAY et al., 2005). Als weiterer Bestandteil des angeborenen Immunsystems gilt das bovine Laktoferrin, ein eisenbindendes Glycoprotein. In einer Studie an Explants wurde gezeigt, dass mammäre Epithelzellen bovines Laktoferrin bilden, welches dann basal in diesen Zellen zu finden ist. Es zeigte sich auch, dass diese Synthese während der ersten

zwei Wochen der Euterinvolution in der Trockenphase anstieg, während milchspezifische Proteine abnahmen (HURLEY & REJMAN, 1993). THOMAS et al. (1992) verwendeten Explants um die Adhäsion, den Tropismus und die Zytotoxizität von *Streptococcus ssp.*, *S. aureus* und *E. coli* zu untersuchen und fanden dabei heraus, dass keines dieser Bakterien die Fähigkeit besaß, sich am Milchdrüsengangepithel anzuheften. *S. aureus* und *E. coli* wiesen aber nach 6 h Inkubation einen deutlichen zytotoxischen Effekt auf. Das Ziel der Arbeit von RABOT et al. (2007) war die Entwicklung eines Explant-Modells, um die Reaktion mammary Epithelzellen auf eine Infektion genauer definieren zu können. Besonderes Augenmerk lag hierbei auf der Rolle der Epithelzellen in der frühen Wirtsabwehr und somit den kurzfristigen Änderungen auf molekularer Ebene. Dafür wurden Explants der Milchdrüse für 3 h und 6 h mit 10 µg/mL LPS von *E. coli* inkubiert. Per RT-PCR fand man heraus, dass die Zellen auf die LPS-Stimulation mit einer Hochregulierung der mRNA von IL-1β, IL-8 und IL-6 reagierten. IL-1β zeigte erst nach 6 h einen signifikanten Anstieg; es wurde zu diesem Zeitpunkt dreifach stärker exprimiert. Auch IL-6- und IL-8-mRNA zeigten erst nach 6 h einen Anstieg um das 1,5-fache. Auch die mRNA für verschiedene Immunglobulinrezeptoren (FcRn, pIGR) war erhöht, während ein Effekt auf TNF-α ausblieb. Das α-Laktalbumin wurde als Kontrollprotein für die Lebensfähigkeit und Funktionalität der Epithelzellen herangezogen und zeigte einen Anstieg während der LPS-Stimulation. Die Autoren kamen zu dem Schluss, dass sich ihr Modell für die Untersuchung immunologischer Fragestellungen bei Milchdrüsenepithelzellen eignet. MOUNT et al. (2009) verfolgten die Fragestellung, ob die Ex-vivo-Exposition von Explants der Milchdrüse mit LPS oder Peptidoglycan (PTG) + Lipoteichonsäure (LTA) verschiedenartige Veränderungen in der Expression verschiedener Chemokin-Gene hervorruft. Sie stellten die Hypothese auf, dass diese pathogenspezifischen PAMPs differenzierte Muster in der Chemokin-Genexpression hervorrufen, was die unterschiedliche Immunantwort des Wirtes auf *E. coli*- und *S. aureus*-Infektionen erklären könnte. Außerdem stimulierten die Autoren die Explants mit einem synthetischen Nucleotid (cpG-ODN2135), welches bakterieller DNA entspricht, um die Immunreaktion auf diese zu überprüfen. Während cpG-ODN keinerlei Reaktion hervorrief, wurde gezeigt, dass LPS und LTA + PTG tatsächlich unterschiedliche Chemokinmuster aktivieren. LPS (10 µg/mL) führte zu verstärkter Expression von MCP-1 (Monocyte chemoattractant Protein) (2,99-fach), MCP-2 (2,88-fach),

MCP-3 (2,17-fach) und CXCL-8 (2,08-fach), welche stark chemoattraktiv auf Monozyten und PMN wirken und somit zum akuten Verlauf der *E. coli*-Mastitis beitragen könnten. LTA + PTG stimulierten lediglich die Expression von MCP-1 (2,11-fach) und in geringem Maß MCP-3 (1,62-fach), was zu einer schwächeren Chemotaxis von Monozyten führen könnte und somit den subklinischen bis chronischen Verlauf der *S. aureus*-Mastitis erklären könnte.

III. MATERIAL UND METHODEN

1 Geräte

1.1 Geräte für histologische, immunhistochemische und quantitativ stereologische Untersuchungen

Ausgießstation „TBS 88 Paraffin Embedding System“	(Medite Medizintechnik, Burgdorf)
Einbettungsautomaten „Histomaster 2050/DI“	(Bavimed, Birkenau)
Labor-pH-Meter „Piccolo [®] plus“ HI 1295	(HANNA instruments, Inc., Woonsocket, RI, USA)
Laborwaage „Sartorius laboratory“	(Sartorius GmbH, Göttingen)
Leica FireCam „DFC 320“	(Leica Camera AG, Solms)
Mikrowellenherd „MG-3837“	(LG Electronics Deutschland GmbH, Willich)
Photomakroskop „M 400“	(Wild, Heerbrugg, Schweiz)
Pinzette, gebogen, anatomisch	(Eickemeyer, Tuttlingen)
Pipetten, einstellbar „pipetman“ (1-10 μ L, 1-20 μ L, 10-100 μ L)	(Gilson, Villers Le Bel, Frankreich)
Pipette, einstellbar „Transferpette [®] “ (100-1.000 μ L)	(Brand, Wertheim)
Rotationsmikrotom „HM 315“	(Microm, Walldorf)
Standardlabormikroskop „BX41“	(Olympus Deutschland GmbH, Hamburg)
Taumler „Modell 4010“	(Kottermann, Haningsen)
Universalkamera „DP72“	(Olympus Deutschland GmbH, Hamburg)
Wärmeschrank	(Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach)
Wasserbad	(Daglef Platz, Wankendorf)

1.2 Geräte für Explantkultur und funktionelle Untersuchungen

Autoklav „D-65“	(Systec, Wettenberg)
Automatisches Hämatologiegerät „Sysmex poch-100iV Diff“	(Sysmex Corporation, Kobe, Japan)
Automatisches Kolonienzählgerät „flash&go“	(IUL Instruments, Königswinter)
Bard [®] Magnum [®] Biopsy Instrument	(C.R. Bard, Inc., Covington, USA)
Brutschrank „Incucell“	(MMM Medcenter, Planegg)

Bunsenbrenner mit automatischer Zündung	(Wartewig, Göttingen)
CO ₂ Brutschrank „Forma 3121“	(Thermo Electron, Dreieich)
Eismaschine „ZBE 70-35“	(Ziegra, Isernhagen)
Fluoreszenz-Durchflusszytometer, Modell FACScan [®] , mit angeschlossener Computereinheit	(Becton Dickinson, Heidelberg)
Gefriertruhe -80°C „Forma ULT Freezer“	(Thermo Electron, Dreieich)
Heizblock „Thermostat 5320“	(Eppendorf, Hamburg)
Kühlschrank mit Gefrierfach (-20°C)	(Einzelhandel)
Laborwaage „SBC22“	(Scaltec Instruments, Heiligenstadt)
Mikroskopier-Schere, gerade	(neoLab, Heidelberg)
Minishaker „MS 1“	(IKA, Staufen)
Multipette	(Eppendorf, Hamburg)
Photometer „Spectra Classic“	(Tecan, Crailsheim)
Pinzette	(Aesculap, Tuttlingen)
Pipetten, einstellbar (1-10 µL, 10-100 µL, 20-200 µL, 100-1.000 µL, 1-5 mL)	(Biohit, Köln)
Pipettierhilfe „accu-jet [®] “	(Brand, Wertheim)
Präzisionspinzette mit rutschfestem Griff	(neoLab, Heidelberg)
Reinstwassersystem „GenPure“	(TKA, Niederelbert)
Rüttler für Mikrotiterplatten „MTS 4“	(IKA, Staufen)
Schüttler „Vortex Genius 3“	(IKA, Staufen)
Sicherheitswerkbank „Biowizard 130 GL“	(Kojair, Vilppula, Finnland)
Skalpell	(Bayha, Tuttlingen)
Standzentrifuge „Rotixa 50 RS“	(Hettich, Tuttlingen)
Tischzentrifuge „Universal 32 R“	(Hettich, Tuttlingen)
Tischzentrifuge „Z 233 MK-2“	(Hermle, Gosheim)
Transmigrationskammer, 10-Well mit Polycarbonatmembran 25 x 80 mm, Porengröße 3 µm	(NeuroProbe, Gaithersburg, USA)
Vakuumpumpe „KNF LAB Laboport N920“	(KNF Neuberger, Trenton, USA)
Wasserbad „WBU-45“	(Mettler, Schwabach)

1.3 Geräte für molekularbiologische Untersuchungen

Autoklav „Typ GE406“	(Getinge AB, Getinge/Schweden)
Biometra T-Gradient	(Biometra-Biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen)
BioPhotometer	(Eppendorf, Hamburg)

Eismaschine „Typ UBE 30-10“	(Ziegra, Isernhagen)
Kühlschrank mit Gefrierfach (-20°C)	(Einzelhandel)
Minizentrifuge	(National Labnet CO., Woodbridge, NJ, USA)
Micropistill	(Eppendorf, Hamburg)
Pinzette, gebogen, anatomisch	(Eickemeyer, Tuttlingen)
Pipette, einstellbar „Transferpette“ [®] (2-20 µL)	(Brand, Wertheim)
Pipetten, einstellbar „pipetman“ (1-20 µL, 10-100 µL, 20-200 µL, 100-1.000 µL)	(Gilson, Villers Le Bel, Frankreich)
Plattenzentrifuge „Multifuge 1S-R“	(Thermo Scientific, Osterode)
Rüttler für Mikrotiterplatten „AM69 Mikroshaker“	(Dynatec, Zug, Schweiz)
Spatel	(Roth, Karlsruhe)
StepOnePlus [®] Real-Time PCR System	(Applied Biosystems, Darmstadt)
Tiefkühltruhe -80°C	(Kendro, Hanau)
Tischzentrifuge „Hermle Z230M“	(Hermle, Gosheim)

2 Material

2.1 Klinikbedarf

Butterfly-Kanüle „Micro-Flo“ [™] , 21G x 0,8mm	(Fa. Industria Biomedica, Mailand/Italien)
CMT-Test	(WDT, Garbsen)
Einmal-Untersuchungshandschuhe “Gentle skin“ [®] sensitive“	(Meditrade, Kiefersfelden)
Polystyrol-Röhrchen, steril	(Sarstedt, Nümbrecht)
Staukette nach Witte	(Eickemeyer, Tuttlingen)
Vacutainer Brand Luer Adapters	(Becton Dickinson, Heidelberg)
Vacutainer [®] System, Halter	(Fa. Becton Dickinson, Heidelberg)
Vacutainer Röhrchen, 10 mL, Heparin (170 IU)	(Becton Dickinson, Heidelberg)

2.2 Laborbedarf für histologische, immunhistochemische und quantitativ stereologische Untersuchungen

Deckgläschen	(Menzel GmbH & Co. KG, Braunschweig)
--------------	---

Einbettungskassetten	(Unilink, Engelbrecht, Edermunde)
Eppendorf-Reaktionsgefäß, 1,5 mL	(Greiner, Frickenhausen)
geschliffene Objektträger, 76 x 26 mm	(VWR International, Darmstadt)
Histokitt	(Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co. KG, Sondheim/Rhon)
Pipettenspitzen, 10-100 µL, 100-1.000 µL	(Biohit, Köln)
Pipettenspitzen, 1-10 µL	(Gilson, Villers Le Bel/Frankreich)

2.3 Laborbedarf für Explantkultur und funktionelle Untersuchungen

Bard [®] Magnum [®] Core Tissue Biopsy Needle	(C.R.Bard, Inc., Covington, USA)
Becherglas, 250 mL	(Roth, Karlsruhe)
Becherglas, 1.000 mL	(Zefa Laborservice, Harthausen)
Cryotubes, 1,0 mL	(Roth, Karlsruhe)
Einmal-Küvetten, 2,5 mL makro PMMA	(Brand, Wertheim)
Eppendorf-Reaktionsgefäß, 0,5 mL	(Sarstedt, Nümbrecht)
Eppendorf-Reaktionsgefäß, 1,5 mL	(Greiner, Frickenhausen)
Gewebekulturplatte 24 well, steril mit Abdeckplatte	(Greiner, Frickenhausen)
Isolierbox mit Deckel	(STOROpack, Vechta)
Kryoboxen aus Karton	(Zefa Laborservice, Harthausen)
Kanülen „BD Microlance [™] 3“, 18G x 40 mm	(Becton Dickinson, Heidelberg)
Laborflaschen mit Gewinde, 250 mL, 500 mL, 1.000 mL	(Roth, Karlsruhe)
Mandrin für Vasuflo [®] -T., steril, G20 x 32 mm	(Dispomed, Gelnhausen)
Multipetteneinsatz	(Eppendorf, Hamburg)
Pasteurpipetten, 22,5 mm aus Glas	(Brand, Wertheim)
Petrischale aus Glas	(Zefa Laborservice, Harthausen)
Pipettenspitzen, 1-10 µL, 10-100 µL, 100-1.000 µL	(Sarstedt, Nümbrecht)
Pipettenspitzen, 100-5.000 µL	(Biohit, Köln)
Pipettenspitzen MultiFlex [®] -Tips, 0,5-200 µL	(Roth, Karlsruhe)
Reaktionsgefäße, 2 mL	(Zefa Laborservice, Harthausen)
Röhrchen, 15 mL Polypropylen	(Greiner, Frickenhausen)
Röhrchen, 50 mL Polypropylen	(Greiner, Frickenhausen)
Röhrchen für die Durchflusszytometrie, 5 mL	(Becton Dickinson, Heidelberg)
Rotilabo [®] -Probendosen mit Schnappdeckel, 50 mL, steril	(Roth, Karlsruhe)

Rundboden-Mikrotiterplatten mit Abdeckung; steril, 96-well	(Gechno Plastic Products TPP [®] , Trasadingen/Schweiz)
Saugpipetten, 10 mL	(Sarstedt, Nümbrecht)
Serologische Pipetten, 10 mL, 25 mL	(Roth, Karlsruhe)
Skalpellklingen BAYHA [®]	(Roth, Karlsruhe)
TruCount tubes, 5 mL	(Becton Dickinson, Heidelberg)
Wägeschiffchen, einmal	(Zefa Laborservice, Harthausen)

2.4 Laborbedarf für molekularbiologische Untersuchungen

Abdeckung für PCR-Platten optical adhesive covers	(Applied Biosystems, Darmstadt)
Combitips, 1,25 mL und 2,5 mL	(Eppendorf, Hamburg)
Cryo-Freezing-Container	(Nalgen Co., Rochester, USA)
Einmal-Küvetten UltraVette, 8,5 mm	(Brand, Wertheim)
Eppendorf-Reaktionsgefäß, 1,5 mL	(Greiner, Frickenhausen)
PCR-Platten Micro Amp [™] Fast 96-well plate	(Applied Biosystems, Darmstadt)
PCR-Reaktionsgefäß, 0,2 mL	(Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf)
Pipettenspitzen, 200 µL, 1.000 µL	(Sarstedt, Frickenhausen)
Pipettenspitzen safe seal Tipps, 10 µL, 100 µL, 1.000 µL	(Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf)
Zentrifugenröhrchen, 15 mL aus Polypropylen (steril)	(Sarstedt, Nümbrecht)

2.5 Reagenzien für histologische, immunhistochemische und quantitativ stereologische Untersuchungen

Anilinblau	(Merck, Darmstadt)
Äthylendiamintetraessigsäure (EDTA)	(Merck, Darmstadt)
Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB)	(Kem-En-Tec Diagnostics A/S, Kopenhagen, Dänemark)
Eosin G	(Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)
Essigsäure, 96 %	(Merck, Darmstadt)
Ethanol, 100 %	(Bundesmonopolverwaltung für Branntwein, Offenbach a. Main)
Ethanol, 96 %	(Bundesmonopolverwaltung für Branntwein, Offenbach a. Main)
Ethanol, 70 %	(Bundesmonopolverwaltung für Branntwein, Offenbach a. Main)

FCV S1-9 Monoclonal Mouse Anti-Feline Calici Virus (Verwendung als irrelevanter Erstantikörper für Negativkontrollen)	(Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg)
Hämalaun	(Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
Mayers Hämalaun	(Merck, Darmstadt)
Molybdato-phosphorsäure x H ₂ O	(Merck, Darmstadt)
Monoclonal Mouse Anti CD11a/18 (BAT75A)	(VMRD, Pullmann, WA, USA)
Monoclonal Mouse Anti-Human Cytokeratin Clones AE1/AE3	(Dako North America, Inc., Carpinteria, CA, USA)
Natriumchlorid, reinst (NaCl)	(neoLab, Migge)
neutral gepufferte Formaldehydlösung, 4 %	(SAV LP, Flintsbach a. Inn)
Paraffin	(SAV LP, Flintsbach a. Inn)
Pikrinsäure	(Merck, Darmstadt)
Proteinase K, Ready-to-use	(Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark)
Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulins/HRP	(Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark)
Rabbit Serum	(MP Biomedicals, Inc., Solon, OH, USA)
Säurefuchsin (Rubin S)	(Merck, Darmstadt)
Salzsäure (HCl)	(Merck, Darmstadt)
Tris-Hydroxymethylaminomethan	(neoLab, Heidelberg)
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂), 30 %	(neoLab, Heidelberg)
Weigerts Eisenhämatoxin	(Merck, Darmstadt)
Xylidine Ponceau	(Waldeck, Münster)
Xylol	(SAV LP, Flintsbach a. Inn)
Xylol, Isomerengemisch	(SAV LP, Feldkirchen-Westerham)

2.6 Reagenzien für Explantkultur und funktionelle Untersuchungen

Antibiotic-Antimycotic (APS), Antibiotikum und Antimykotikum	(Invitrogen, Karlsruhe)
Biocoll [®]	(Biochrom, Berlin)
Bovines Serum Albumin (BSA)	(Sigma-Aldrich, Steinheim)
BU-Tupfer mit Amies-Transportmedium	(Herenz, Hamburg)
Columbia Schafblut-Agar	(Oxoid, Wesel)

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)/Ham's Nutrient Mixture F12	(Sigma-Aldrich, Steinheim)
Edwards-Nährboden mit Schafblut (mod.)	(Oxoid, Wesel)
Ethanol, 70%	(Roth, Karlsruhe)
FACS Clean	(Becton Dickinson, Heidelberg)
FACS Flow	(Becton Dickinson, Heidelberg)
FACS Rinse	(Becton Dickinson, Heidelberg)
Hydrocortison	(Sigma-Aldrich, Steinheim)
Insulin	(Sigma-Aldrich, Steinheim)
Interleukin-8, human, rekombinant	(CellConcept, Umkirch)
Kristallviolett-Galle-Lactose-Agar (VRB-Agar)	(Oxoid, Wesel)
Lipopolysaccharid von <i>E. coli</i> O111:B4	(Sigma-Aldrich, Steinheim)
Lipopolysaccharid von <i>E. coli</i> 1303	(AG Holst, Borstel)
Methanol, 99,8%ig	(Merck, Darmstadt)
Natriumazid (NaN ₃), 10%ig	(Sigma-Aldrich, Steinheim)
Natriumhydroxid (NaOH), M 40,01g/mol	(Roth, Karlsruhe)
Percoll [®]	(Biochrom, Berlin)
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) Dulbecco, ohne Ca ⁺⁺ /Mg ⁺⁺	(Biochrom, Berlin)
Quantikine [®] , CXCL8/IL-8 ELISA	(R&D Systems, Minneapolis, USA)
RNAlater [®]	(Sigma-Aldrich, Steinheim)
Sheath-fluid für Durchflusszytometrie	(Becton Dickinson, Heidelberg)

2.7 Reagenzien für molekularbiologische Untersuchungen

β-Mercaptoethanol	(Sigma-Aldrich, Steinheim)
Deoxynucleotide Triphosphates (dNTPs)	(Promega, Mannheim)
DNase/RNase-Free distilled water	(Invitrogen, Karlsruhe)
EDTA (Ethyldiamine-Tetraacetic Acid)	(Sigma-Aldrich, Steinheim)
Ethanol 641, absolut, vergällt	(CG Chemikalien, Laatzten)
Oligo (dt) 12-18 Primer	(Invitrogen, Karlsruhe)

Rneasy [®] Mini Kit	(QIAGEN GmbH, Hilden)
RNase free DNase Set	(QIAGEN GmbH, Hilden)
RNaseOUT [™] Ribonuclease Inhibitor	(Invitrogen, Karlsruhe)
Superscript [™] II Reverse Transkriptase	(Invitrogen, Karlsruhe)
SYBR Green [®] PCR Master Mix	(Applied Biosystems, Darmstadt)
Tris (Trizma Base)	(Sigma-Aldrich, Steinheim)

2.8 Versuchstiere

2.8.1 Spendertiere für die Gewebegewinnung

Für die Gewinnung von Euter- und Zitzengewebe für die Explantkulturen wurden weibliche laktierende Schlachttiere anhand definierter Kriterien (III.3.1 und III.3.2.1) ausgewählt. Es handelte sich um Kühe unterschiedlicher Rassen. Die Auswahl erfolgte vor Ort am Schlachthof. Detaillierte Angaben zu den Spendertieren finden sich in den Tabellen 3 bis 5.

Tab. 3: Gewebe-Spendertiere für methodische Vorarbeiten

Tier-Nr.	Rasse	Adsp./Palp.	Sekret makrosk.	CMT	BU (48 h)
1_090714	BV	obB	obB	VL: ++ - VR: ++ - HL: ++ - HR: ++ -	Milch: HL: KNS Tupfer: HL: KNS
2_090721	BV	obB	obB	VL: (+) - - VR: + - - HL: ++ - HR: + - -	Milch: HL: <i>Sc.</i> Tupfer: HL: <i>Sc.</i>

BV = Braunvieh; Adsp./Palp. = Adspektion und Palpation; Sekret makrosk. = makroskopische Beschaffenheit des Eutersekrets; CMT = California Mastitis Test; BU (48 h) = Bakteriologische Untersuchung, abgelesen nach 48 h; KNS = Koagulase negative Staphylokokken; *Sc.* = *Streptococcus ssp.*; obB = ohne besonderen Befund; VR = vorne rechts; HR = hinten rechts; VL = vorne links; HL = hinten links; CMT-Ergebnisse: - - -: negativ, (+) - -: zweifelhaft, + - -: schwach positiv, + + -: deutlich positiv (siehe auch Tab. 7).

Tab. 4: Gewebe-Spendertiere für quantitativ stereologische und molekularbiologische Untersuchungen

Quantitativ stereologische Untersuchungen					
Tier-Nr.	Rasse	Adsp./Palp.	Sekret makrosk.	CMT	BU (48 h)
1_100602	BV	obB	obB	VL: (+) -- VR: (+) -- HL: (+) -- HR: (+) --	Milch: VR, VL, HR: kont. Mischflora Tupfer: VR, VL, HR: kont. Mischflora
2_100602	BV	obB	obB	VL: + -- VR: + -- HL: + -- HR: + --	Milch: 4/4: negativ Tupfer: 4/4: negativ
Molekularbiologische Untersuchungen					
Tier-Nr.	Rasse	Adsp./Palp.	Sekret makrosk.	CMT	BU (48 h)
1_100311	BV	obB	obB	VL: (+) -- VR: + -- HL: --- HR: ---	Milch: 4/4: negativ Tupfer: 4/4: negativ
2_100316	HF, sb	obB	obB	VL: --- VR: --- HL: --- HR: ---	Milch: 4/4: negativ Tupfer: 4/4: negativ
3_100316	BV	obB	obB	VL: ++- VR: ++- HL: ++- HR: ++-	Milch: 4/4: Coryne- forme Tupfer: 4/4: Coryne- forme
4_100325	BV	obB	obB	VL: + -- VR: + -- HL: + -- HR: + --	Milch: 4/4: negativ Tupfer: 4/4: negativ
5_100427	HF, sb	obB	obB	VL: --- VR: (+) -- HL: --- HR: ---	Milch: VL: <i>Sc.</i> Tupfer: VL: <i>Sc.</i> → VL ausgeschlossen
6_100427	BV	obB	obB	VL: --- VR: + -- HL: --- HR: ---	Milch: VL: <i>Sc.</i> Tupfer: VL: <i>Sc.</i> → VL ausgeschlossen

BV = Braunvieh; HF, sb = Holstein-Friesian, schwarz-bunt; Adsp./Palp. = Adspektion und Palpation; Sekret makrosk. = makroskopische Beschaffenheit des Eutersekrets; CMT = California Mastitis Test; BU (48 h) = Bakteriologische Untersuchung, abgelesen nach 48 h; KNS = Koagulase negative Staphylokokken; *Sc.* = *Streptococcus ssp.*; obB = ohne besonderen Befund; VR = vorne rechts; HR = hinten rechts; VL = vorne links; HL = hinten links; CMT-Ergebnisse: - - -: negativ, (+) - -: zweifelhaft, + - -: schwach positiv, + + -: deutlich positiv (siehe auch Tab. 7).

Tab. 5: Gewebe-Spendertiere für funktionelle Untersuchungen

Tier-Nr.	Rasse	Adsp./Palp.	Sekret makrosk.	CMT	BU (48 h)
1_091014	BV	obB	obB	VL: + + - VR: + - - HL: (+) - - HR: (+) - -	Milch: HR: Coryneforme Tupfer: HR: Coryneforme
2_091014	BV	obB	obB	VL: - - - VR: - - - HL: + - - HR: + - -	Milch: HL: Coryneforme Tupfer: HL: Coryneforme
3_091111	DFV	obB	obB	VL: + - - VR: + - - HL: + - - HR: + - -	Milch: 4/4: Coryneforme Tupfer: 4/4: Coryneforme HR: kont. Mischflora
4_091111	BV	obB	obB	VL: + - - VR: + - - HL: - - - HR: + - -	Milch: 4/4: Coryneforme Tupfer: 4/4: Coryneforme
5_091203	BV	obB	obB	VL: - - - VR: - - - HL: (+) - - HR: - - -	Milch: 4/4: negativ Tupfer: 4/4: negativ

BV = Braunvieh; HF, sb = Holstein-Friesian, schwarz-bunt; DFV = Deutsches Fleckvieh; Adsp./Palp. = Adspektion und Palpation; Sekret makrosk. = makroskopische Beschaffenheit des Eutersekrets; CMT = California Mastitis Test; BU (48 h) = Bakteriologische Untersuchung, abgelesen nach 48 h; obB = ohne besonderen Befund; VR = vorne rechts; HR = hinten rechts; VL = vorne links; HL = hinten links; CMT-Ergebnisse: - - -: negativ, (+) - -: zweifelhaft, + - -: schwach positiv, + + -: deutlich positiv (siehe auch Tab. 7).

2.8.2 Spendertiere für die Blutgewinnung

Die Tiere, deren Blut für die Isolierung neutrophiler Granulozyten gewonnen wurde (III.3.6.1), waren Versuchskühe der Rasse Deutsche Holstein-Friesian, Typ Schwarzbunte, aus der Klinik für Wiederkäuer der Ludwig-Maximilians-Universität München. Alle verwendeten Tiere waren klinisch gesund.

2.9 Kulturmedien, Puffer und Lösungen

Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) ohne EDTA

Die Bestandteile lagen in den folgenden Konzentrationen vor:

NaCl	8,00 g
KCl	1,24 g
Na ₂ HPO ₄	0,20 g

KH_2PO_4	0,20 g
<i>Aqua dest. ad</i>	1.000 mL

Die PBS-Trockensubstanz wurde in *Aqua dest.* gelöst. Der Puffer hatte einen pH-Wert von 7,4. Für den Transport von Explantgewebe wurde PBS im Autoklav sterilisiert. Die Lagerung erfolgte bei 4°C im Kühlschrank.

2.9.1 Puffer und Lösungen für quantitativ stereologische Untersuchungen

Tris Buffer Saline (TBS), pH 7,6

0,5 mol/L Stock-Solution (für 1.000 mL Lösung):

60,5 g Tris-Hydroxymethylaminomethan in 700 mL *Aqua dest.* lösen

mit 25 %iger HCl auf pH 7,6 einstellen

auf 1.000 mL mit *Aqua dest.* auffüllen

pH-Wert überprüfen

90 g NaCl darin lösen

pH-Wert prüfen und gegebenenfalls einstellen

Diese 0,5 mol/L Stock-Solution wurde 1:10 mit *Aqua dest.* auf eine 0,05 mol/L TBS-Puffer-Gebrauchslösung verdünnt. Der Puffer hatte einen pH von 7,6 und wurde bei Raumtemperatur gelagert.

TRIS/EDTA-Puffer für die Mikrowelle, pH 9,0

Für 2.000 mL Gebrauchslösung:

2,42 g Tris-Hydroxymethylaminomethan in 2.000 mL *Aqua dest.* lösen

pH-Wert mit 1 molarer HCl auf 9,0 einstellen

4 mL EDTA-Lösung dazugeben

pH-Wert überprüfen und gegebenenfalls auf 9,0 einstellen

Die Lagerung dieser Gebrauchslösung erfolgte bei Raumtemperatur.

1 %ige Eosin-Lösung

Eosin G	10 g
erhitztes <i>Aqua dest.</i>	ad 1.000 mL
Hinzufügen von 1,5 mL filtrierter 96 %iger Essigsäure.	

Bouin-Lösung

Gesättigte wässrige Pikrinsäure	15 mL
Formalin, 37 %	5 mL
Essigsäure, 96 %	1 mL

*Rote Farbe****Lösung A***

Säurefuchsin (Rubin S)	10 g
Essigsäure, 96%	10 mL
<i>Aqua dest.</i>	1.000 mL

Lösung B

Xylidine Ponceau	10 g
<i>Aqua dest.</i>	1.000 mL
Essigsäure, 96 %	10 mL

Das *Aqua dest.* wurde zum Sieden erhitzt. Anschließend wurde der Farbstoff darin gelöst und danach die Essigsäure zugeben. Vor Gebrauch wurden *Lösung A* und *Lösung B* im Verhältnis 1:2 zusammen gegeben und filtriert.

Anilinblau

Anilinblau	10 g
<i>Aqua dest.</i>	1.000 mL
Essigsäure, 96 %	10 mL

Die Lösung wurde kalt angesetzt und vor Gebrauch filtriert.

1 % Phosphormolybdänsäure

Molybdatophosphorsäure x H ₂ O	10 g
<i>Aqua dest.</i>	1.000 mL

Wasserstoffperoxidlösung (H₂O₂) (1 %)

30 %ige H ₂ O ₂ - Lösung	6 mL
<i>Aqua dest.</i>	180 mL

Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB) Chromogen

Eine 10 mg Tablette DAB wurde in 10 mL *Aqua dest.* im Dunkeln gelöst und anschließend filtriert. Unmittelbar vor dem Auftragen auf die Schnitte wurde pro 1 mL DAB-Lösung jeweils 1 µL H₂O₂-Lösung (30 %) als Substrat zugegeben.

2.9.2 Kulturmedium und Zusätze

Als Medium für die Explantkultur wurde DMEM-F12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Ham's Nutrient Mixture F12) verwendet (1 mL Medium pro Well) und mit Zusätzen versetzt. Trockensubstanzen wurden gelöst und steril filtriert. Bereits gelöste Zusätze wurden portioniert. Die aliquotierten Zusätze wurden bei -20°C gelagert und vor Gebrauch bei 37°C im Wasserbad aufgetaut.

Medium für die Inkubation von Explants der bovinen Zitze

DMEM-F12	100 mL
Insulin (5 mg/mL)	200 mL
(Endkonzentration	10,0 µg/mL)
Hydrocortison (1mg/mL)	50,0 µL
(Endkonzentration	0,5 µg/mL)
Antibiotic-Antimycotic (APS)	1 mL
(Endkonzentration:	
Penicillin G	100,0 µg/mL
Streptomycin	100,0 µg/mL
Amphotericin B	2,5 µg/mL)

Das Kulturmedium wurde bis zu 14 Tage bei 4°C aufbewahrt.

2.9.3 Lipopolysaccharidlösung (LPS) für die Stimulationsversuche

LPS für methodische Vorarbeiten

Zunächst wurden methodische Vorarbeiten durchgeführt, bei denen LPS von *E. coli* O111:B4 (L2630) der Firma Sigma-Aldrich verwendet wurde. Die LPS-Trockensubstanz wurde in PBS (III.2.9) zu einer Stammlösung (1.000 µg/mL) gelöst. Diese wurde in Aliquoten von 1 mL bei -20°C aufbewahrt. Für den Gebrauch wurde die Stammlösung mit Kulturmedium (III.2.9.2) auf eine Konzentration von 20 µg/mL final verdünnt.

LPS von E. coli 1303

Die Stimulationsversuche wurden mit hochaufgereinigtem LPS von *E. coli* 1303 (AG Holst, Borstel) durchgeführt. Die LPS-Trockensubstanz wurde in einer Konzentration von 92,5 µg/mL in *Aqua dest.* angesetzt und in Aliquoten von 420 µL bei -20°C aufbewahrt. Um die Gebrauchslösung mit der Konzentration von 1 µg/mL herzustellen, wurden je Tier (entsprechend 16 zu stimulierende Explants) 0,2 mL der Stammlösung entnommen und in 17,8 mL Medium (III.2.9.2) verdünnt. Somit erhielt man 18 mL gebrauchsfertige Lösung mit 1 µg/mL LPS final. Ein Aliquot enthielt also die Menge zur Stimulation von zwei Tieren beziehungsweise 36 Explants.

2.9.4 Material für die Separation von Zellen

Biocoll[®]

Die neutrophilen Granulozyten wurden durch eine Dichtegradientenzentrifugation über unverdünntes Biocoll[®], einer Separationslösung mit der Dichte von 1,077 g/mL, von den übrigen Leukozyten getrennt.

Phosphatpuffer, doppelt konzentriert (2 x PBS)

Zur Herstellung wurden 19,08 g PBS-Trockensubstanz in 1.000 mL *Aqua dest.* gelöst.

2.9.5 Lösungen für den Chemotaxisassay

Percoll[®]

Um ein Haften der migrierten PMN am Boden und den Wänden der unteren Vertiefungen (Wells) der Transmigrationskammer zu verhindern, wurden sowohl die Zellkulturüberstände als auch die Positiv- und Negativkontrollen mit unverdünntem Percoll[®] unterschichtet. Percoll[®] ist ein synthetisches Sol aus

Polyvinyl-Pyrolidon-beschichteten Silikatteilchen mit einem spezifischen Gewicht von 1,130 g/mL. Gewöhnlich wird es zur Separation von Leukozyten verwendet.

Rekombinantes, humanes Interleukin-8 (rhIL-8)

Als Positivkontrolle für die in-vitro-Transmigration diene rekombinantes, humanes IL-8 (rhIL-8), da das Chemokin IL-8 eine chemotaktische Wirkung primär für PMN hat. Lyophilisiertes rhIL-8 wurde in sterilem PBS (III.2.9) mit 1 % BSA (Bovines Serum Albumin) auf eine Konzentration von 1 µg/mL verdünnt, aliquotiert und bei -20°C gelagert. Vor Gebrauch wurde die Lösung mit Kulturmedium (III.2.9.2) auf die gewünschte Endkonzentration von 100 ng/mL eingestellt.

2.9.6 Lösungen für die Durchflusszytometrie

Zur Reinigung des Gerätes wurde das Messkanalsystem nach den Messungen mit steril filtriertem *Aqua dest.*, FACS Rinse und FACS Clean gespült.

Trägerflüssigkeit

Als Trägerflüssigkeit für die durchflusszytometrischen Messungen wurde steril filtriertes PBS mit 0,1 mg/mL NaN₃ (Natriumazid) verwendet.

2.9.7 Puffer und Lösungen für die DNA-Analyse

TE-Puffer, pH 7,5

TRIS	10,0 mmol/L
EDTA	1,0 mmol/L

Gelöst in *Aqua tridest.* wurde der Puffer 20 min bei 123°C und 2,8 bar autoklaviert, aliquotiert und bei Raumtemperatur gelagert.

2.10 Primer

Die Oligonukleotid-Primer wurden aufgrund von bereits veröffentlichten Sequenzen ausgewählt. Bezogen wurden alle Primer von der Firma MGW aus Ebersberg. Die optimale Konzentration der Primer im StepOnePlus-PCR System wurde durch eine vom Hersteller beschriebene Primer-Optimierung ermittelt. Die Sequenzen der verwendeten Primer, die eingesetzte Konzentration sowie die Länge des Amplikons und die Referenzen sind in Tab. 6 dargestellt.

Tab. 6: Primer-Sequenzen.

Gen	Vorwärts- (for) und Rückwärts- (rev) Primer (5' → 3') und Konzentrationen (nmol/L)	Länge des Amplikons	Referenz
IL-1 β	for TTCTCTCCAGCCAACCTTCATT (300) rev ATCTGCAGCTGGATGTTCCAT (300)	198	(NEUVIANS et al., 2004)
TNF- α	for CTTCTGCCTGCTGCACTTCG (300) rev GAGTTGATGTCGGCTACAACG (300)	156	(YANG et al., 2008)
CCL5	for CCTGCTGCTTTGCCTATATCT (300) rev AGCACTTGCTGCTGGTGTAG (300)	78	(WIDDISON et al., 2008)
CCL20	for GACTGCTGTCTCCGATATAACA (300) rev GCCAGCTGCTGTGTGAAGC (300)	71	novel design Acc. No.: NM_174263
CXCL8	for CCTCTTGTTCAATATGACTTCCA (300) rev GGCCCACTCTCAATAACTCTC (50)	170	(YANG et al., 2008)
S100A8	for CTTTTGGCAACTCTATTTTGGG (300) rev CTATAGACGGCGTGGTAATTC (300)	144	novel design Acc. No.: NM_001113725
S100A9	for GGCTAGGGCACTATGACAC (300) rev GGCCACCAGCATAATGAAC (300)	179	novel design Acc. No.: NM_001046328
S100A12	for CATTTCGACACCCTCAACAA (300) rev CTGTTTTTCAGCACCCCTGGAC (900)	184	(LUTZOW et al., 2008)

^a Acc. No: Accession-Nummer der Nukleotid-Sequenz der NCBI Gen-Datenbank, welche für die Erzeugung der Primer benutzt wurde.

3 Methoden

Die Gewinnung von Zitzengewebe für die Explantkultur erfolgte am Schlachthof A. Moksel AG in 86807 Buchloe. Die Aufarbeitung und Inkubation der Explants sowie die Durchführung des Chemotaxisassays erfolgte im Zelllabor der Klinik für Wiederkäuer der Ludwig-Maximilians-Universität München. Die Durchführung der Histologie und Stereologie erfolgte im Institut für Tierpathologie der Ludwig-Maximilians-Universität München. Die qRT-PCR wurde im Institut für Immunologie der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover durchgeführt.

3.1 Klinische Untersuchung der Spendertiere für die Gewebegewinnung

Die zu verwendenden Tiere wurden am Schlachthof unmittelbar nach Anlieferung herausgesucht. Sie sollten keine klinischen Anzeichen einer Mastitis aufweisen. Die Kühe wurden für die Untersuchung auf eine Tierwaage getrieben und mit einem Kopfstrick fixiert. Es erfolgte eine adspektorische und palpatorische Untersuchung des Euters (ROSENBERGER, 1990). Anschließend wurde das Eutersekret makroskopisch in einer Vierviertelgemelksschale und mittels California-Mastitis-Test (CMT) beurteilt. Hierfür wurde nach Verwerfen des Vorgemelks das Viertelanfangsgemelk ermolken, bis zur Markierungslinie (2 mL) abgekippt, anschließend zu gleichen Teilen mit der Testflüssigkeit versetzt und kreisförmig geschwenkt. Die Schlieren- bzw. Gel-Bildung wurde unverzüglich beurteilt und einer Kategorie zugeordnet (Tab. 7).

Die Entscheidung, ein Tier in die Studie aufzunehmen oder davon auszuschließen, wurde anhand der klinischen Untersuchung und der Sekretuntersuchung getroffen. In die Studie aufgenommen wurden nur Tiere, deren Euter adspektorisch und palpatorisch keine pathologischen Befunde zeigten. Da der überwiegende Anteil der beprobten Tiere weitgehend ausgemolken zur Schlachtung kamen und bekannt ist, dass End- und Residualgemelke relativ hohe Zellzahlen aufweisen, wurden in diesen Fällen erhöhte Zellzahlen akzeptiert (CMT zweifelhaft bis deutlich positiv; Tabellen 3 – 5). Dabei wurde jedoch darauf geachtet, dass die Viertel relativ gleiche Werte aufwiesen. Außerdem wurde die Bakteriologische Untersuchung (BU) von sterilen Milch- und Tupferproben herangezogen, um eine bakterielle Infektion der beprobten Viertel mit *E. coli*, *S. aureus* oder *Sc. spp.* auszuschließen (Tabellen 3 – 5).

Tab. 7: Beurteilung des California-Mastitis-Test (CMT) (modifiziert nach Rosenberger 1990 (ROSENBERGER, 1990)).

Reaktion	Beurteilung	Zellzahl
Die Probe bleibt flüssig, keine Kennzeichen einer Konsistenzveränderung oder Schlierenbildung	Negativ - - -	0 – 100.000
Leichte Konsistenzveränderung bzw. leichte Schlierenbildung	Zweifelhaft (+) - -	50.000 – 500.000
Verstärkte Schlierenbildung, aber noch keine Tendenz zur Gelbildung	Schwach positiv + - -	400.000 – 1.500.000
Die Mischung verdickt sich augenblicklich, geringgradige Gelbildung. Bei kreisförmigen Bewegungen hat die Mischung die Tendenz, sich in der Mitte der Schalen anzusammeln, der Rand des Bodens in den Aufsätzen bleibt frei von dem Gemisch. Beim Aufhören der kreisförmigen Bewegungen verteilt sich die Mischung wieder gleichförmig.	Deutlich positiv + + -	800.000 – 5.000.000
Starke Konsistenzänderung, Gelformung, die eine konvexe Oberfläche der Mischung bedingt. Nach Aufhören der Bewegung ballt sich das Gel kuppenförmig im Zentrum der Schale zusammen, der Boden der Testschale ist nicht mehr ganz bedeckt.	Stark positiv + + +	Über 5.000.000

3.2 Probengewinnung

Am Schlachthof wurde zum einen das Gewebe für die Explantkultur und die quantitativ stereologischen Untersuchungen gewonnen, zum anderen wurden Proben für eine bakteriologische Untersuchung (BU) entnommen, um retrospektiv Rückschlüsse auf die Eutergesundheit der beprobten Tiere schließen zu können.

3.2.1 Bakteriologische Untersuchung von Milch- und Tupferproben

Nach der klinischen Untersuchung des Euters inklusive Verwerfen des Vorge- melks und Zellzahlbestimmung am Anfangsgemelk erfolgte die Entnahme einer sterilen Milchprobe jedes Viertels für eine BU. Dafür wurde die Zitze mit einer in 70 %igem Alkohol getränkten Kompresse gereinigt und einige kräftige Strahlen Milch waagrecht in das sterile Probenröhrchen ermolken. Die Milchproben wurden unmittelbar daraufhin auf Eis gelagert und am selben Tag im Bakterio- logischen Labor der Klinik für Wiederkäuer der Ludwig-Maximilians-Universität München ausplattiert.

Zusätzlich wurden vor der Gewebeentnahme von jeder Zitze BU-Tupferproben (mit Amies Transport-Medium) aus dem Bereich der ZZ entnommen. Dies erfolgte nachdem die Zitze mittels Skalpell der Länge nach eröffnet und aufgespannt worden war. Mit einem sterilen Tupfer wurde unter Drehen über die Schleimhautoberfläche gestrichen. Der Transport erfolgte auf Eis. Die Milch- und Tupferproben wurden jeweils auf Columbia-Schafblut-Agar und den Selektivnährböden Edwards-Agar und Violet-red-bile-Agar ausgestrichen. Die Auswertung erfolgte jeweils nach 24 h und 48 h Bebrütungszeit bei 37°C. Nur die Gewebeprobe der Viertel, deren Proben kein Keimwachstum oder lediglich eine durch Kontamination bedingte Mischflora oder Wachstum coryneformer Keime aufwiesen, wurden im Chemotaxisassay und in der Expressionsstudie verwendet.

3.2.2 Entnahme des Gewebes für die Explantkultur

Unmittelbar (6 – 12 min) nach dem Schlachten wurde das Euter im Verlauf des gängigen Zerlegeprozesses am Schlachtband entnommen und in einer gesäuberten Kunststoff-Kiste zur Probenentnahme bereitgestellt. Das gesamte Euter wurde zuerst zur groben Reinigung mit Wasser abgespritzt. Anschließend wurden die Zitzen einzeln gesäubert und mittels eines Messers an der Basis abgetrennt. Die Zitzen wurden mit 70 %igem Alkohol desinfiziert und in den Strichkanal wurde ein steriler Mandrin für Vasuflo[®]-T eingeführt. Anschließend wurde die Zitze mitsamt des Strichkanals mit einem Skalpell (Größe 21) der Länge nach auf einer Seite eröffnet und mit Hilfe von vier Kanülen (18 G x 40 mm) auf einer mit zuvor sterilisierten Alufolie abgedeckten Styropor-Unterlage aufgespannt. Die Fixierung der Zitze erfolgte dabei durch die Kanülen in der Gefäß-Muskelschicht (Abb. 1).

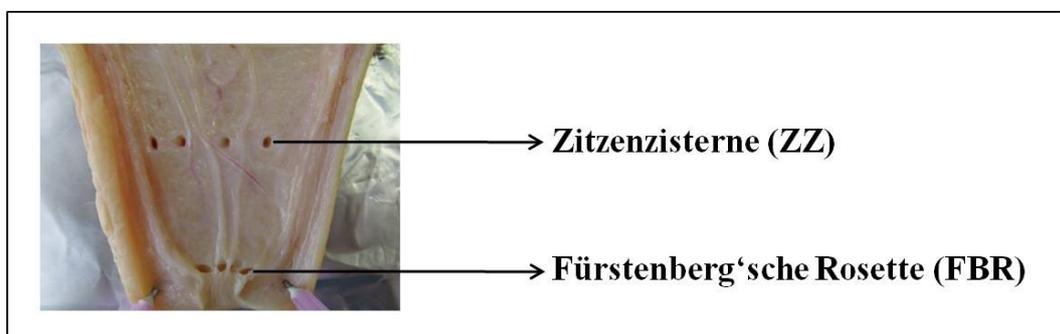


Abb. 1: **Gewebegewinnung aus unterschiedlichen Lokalisationen der Zitze.** Die Gefäß-Muskelschicht der Zitze wurde durch Kanülen fixiert. Die Entnahme erfolgte mittels sterilen BARD Magnum[®] Core Tissue Biopsy Needles aus der Mitte der Zitzenzisterne und dem Bereich der Fürstenberg'schen Rosette.

Das Gewebe für die Explantkultur wurde mit Hilfe eines BARD® Magnum™ Biopsy Instruments entnommen. Die Entnahme erfolgte an zwei unterschiedlichen Lokalisationen der Zitze. Für die Lokalisation Fürstenberg'sche Rosette (FBR) befanden sich die vier nebeneinander liegenden Entnahmestellen direkt am Übergang von der unverhornten Schleimhaut der Zitzenzisterne zum verhornten Strichkanalepithel. Dabei wurde zwischen den einzelnen Entnahmestellen ein schmaler Gewebesteg belassen. Für die Lokalisation Zitzenzisterne (ZZ) befand sich die Entnahmestelle auf Höhe der Hälfte der ZZ, wobei ein größerer Abstand zwischen den einzelnen Biopsiestellen bestand (Abb. 1). Für jeweils eine Lokalisation (FBR, ZZ) einer Zitze wurde eine sterile BARD Magnum® Core Tissue Biopsy Needle (12 g x 13 cm – Länge Sample Notch 1,9 cm) in das Biopsiegerät eingespannt. Die Spitze der Biopsienadel wurde auf die Schleimhaut aufgesetzt. Durch Auslösen des Biopsieinstrumentes wurde an der entsprechenden Stelle ein Gewebestückchen aus der Zitzenwand herausgestanzt. Es wurde darauf geachtet, dass keine äußere Haut in dem Biopat vorhanden war. Diese wurde im Bedarfsfall durch Scherenschlag abgesetzt. Im Rahmen methodischer Vorarbeiten wurden bei zwei Schlachtkühen zusätzliche Biopate aus dem Euterparenchym entnommen. Hierfür wurde mit einem Messer die Haut großflächig entfernt und mit einem zweiten desinfizierten Messer ein ca. 5 x 5 cm großes Stück Parenchym herausgeschnitten. Aus diesem Gewebestück wurden dann, wie bereits für die Zitzen beschrieben, mittels BARD® Magnum™ Biopsy Instruments vier Biopate ausgestanzt.

Das gewonnene Gewebe wurde mit einer Pinzette in gekühltes PBS (4°C) überführt. Nach der Entnahme von vier Biopaten (= eine Lokalisation einer Zitze) wurde die Nadel gewechselt. Es wurden jeweils die vier Proben derselben Lokalisation derselben Zitze in ein Probengefäß gegeben und während des Transportes ins Labor auf Eis gelagert.

Die Entnahme der Gewebeproben für histopathologische, immunhistochemische und quantitativ stereologische Untersuchungen (III.3.4) erfolgte nach dem gleichen Prinzip wie für die Explantkultur.

3.3 Aufarbeitung und Inkubation

Die Präparation der Explants aus den Biopaten erfolgte unter der Sterilwerkbank. Dabei wurde das Gewebe in einer mit PBS gefüllten Petriglasschale mittels

Präzisionspinzette und Skalpell präpariert. Die Bioptate wiesen einen Durchmesser von ca. 2 mm auf und wurden auf eine Länge von etwa 2 mm gekürzt, so dass zylindrische Explants entstanden, welche auf einer Seite die Schleimhaut aufwiesen (Abb. 2).

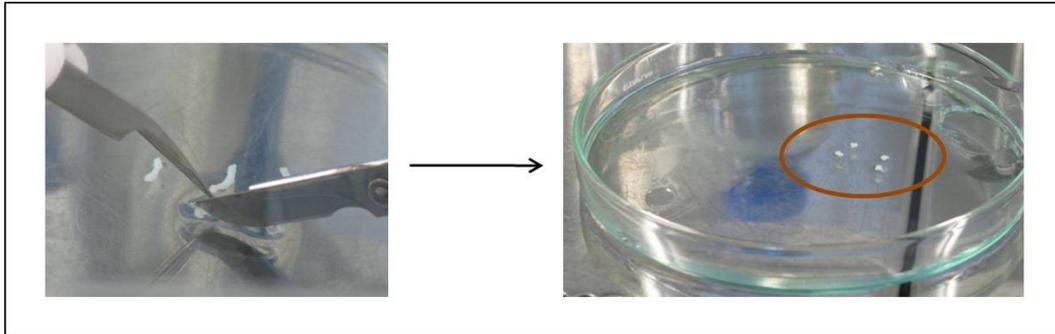


Abb. 2: **Präparation der Explants mittels Präzisionspinzette und Skalpell.** In einer mit PBS gefüllten Petriglasschale wurde die Schleimhautwärts gerichtete Seite der Biopate auf ca. 2 mm gekürzt. Somit entstanden zylindrische Explants, welche die Schleimhaut enthielten.

3.3.1 Aufarbeitung der Explants für histopathologische, immunhistochemische und quantitativ stereologische Untersuchungen

Zur Bestimmung der Volumenanteile der verschiedenen Gewebekompartimente und Zelltypen in Explants der Zitze wurden analog zu der in Kapitel III.3.2.2 beschriebenen Technik von zwei Kühen jeweils vier Explants der FBR und vier Explants der ZZ pro Euterviertel entnommen ($n = 16$ Explants FBR/Tier und $n = 16$ Explants ZZ/Tier). Das Probenmaterial wurde nach der Präparation mittels Präzisionspinzette und Skalpell (Abb. 2) in Einbettungskassetten verbracht und auf einem Taumler 24 h bei 8°C in 4%iger neutral gepufferter Formaldehydlösung fixiert.

3.3.2 Aufarbeitung der Explants für molekularbiologische Untersuchungen

Für die Untersuchung der Expression verschiedener immunrelevanter Gene in Explants der Zitze wurden nach der in Kapitel III.3.2.2 beschriebenen Technik von sechs Kühen jeweils vier Explants der FBR und vier Explants der ZZ pro Euterviertel entnommen. Das Gewebe wurde nach der Präparation mittels Präzisionspinzette und Skalpell (Abb. 2) in Zellkulturmedium aufgenommen. Das Medium wurde am Vortag, wie in Kapitel III.2.9.2 beschrieben, angefertigt und bei 4°C aufbewahrt. Am Morgen des Versuchstages wurde es in

24-well-Gewebekulturplatten vorgelegt, wobei 1 mL Medium in jede Vertiefung gegeben wurde. Die Platten wurden für 1 h bei 37°C und 5 % CO₂ im Brutschrank vorinkubiert und anschließend wieder auf 4°C im Kühlschrank abgekühlt.

Die Explants wurden direkt in die Wells mit je 1 mL 4°C kalten Medium überführt (1 Explant pro Well) und für ca. 1 h in den Kühlschrank gestellt. In dieser Zeit erfolgte das Anmischen der LPS-Lösung. Nach Entnahme aus dem Kühlschrank wurde bei je zwei Explants von jeder Lokalisation jeder Zitze das Kulturmedium mit einer Pasteurpipette und Vakuumsauger entfernt und durch 1 mL LPS-Lösung mit der Konzentration 1 µg/mL (III.2.9.3) ersetzt. Für die methodischen Vorarbeiten (IV.2.1) wurde bei einem Tier in keinem Well das Medium gewechselt (Kontrolltier), bei einem zweiten Tier wurde in allen Wells das Kulturmedium entfernt und durch 1 mL LPS-Lösung mit der Konzentration 20 µg/mL ersetzt (III.2.9.3). Anschließend erfolgte die Inkubation im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ für 3 h. Nach der Inkubation wurde jedes Explants in ein Eppendorf-Gefäß (1,5 mL) mit vorgelegten 200 µL RNAlater[®] überführt und über Nacht im Kühlschrank gelagert. Am nächsten Tag wurde das Gewebe aus dem RNAlater[®] entnommen, in Cryotubes (1,0 mL) umgesetzt und sofort bei -80°C eingefroren. Bei dieser Temperatur wurden die Proben bis zur mRNA-Extraktion über mehrere Wochen aufbewahrt.

3.3.3 Aufarbeitung und Inkubation für funktionelle Untersuchungen

Zum Nachweis der Bildung chemotaktischer Faktoren durch Explants der Zitze wurden, nach der in Kapitel III.3.2.2 beschriebenen Technik, von fünf Kühen jeweils vier Explants der FBR und vier Explants der ZZ pro Euterviertel entnommen. Das Gewebe wurde zunächst, analog der in Kapitel III.3.3.2 beschriebenen Methode, in Kultur genommen. Nach der Ruhezeit im Kühlschrank wurde jeweils bei zwei Explants jeder Lokalisation einer Zitze das Medium mittels einer Pasteurpipette und eines Vakuumsaugers entfernt. Es wurde durch je 1 mL LPS-Lösung mit der Konzentration 1 µg/mL ersetzt (III.2.9.3). Nach Zugabe des Stimulus wurden die Explants für 18 h im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Danach wurde das Medium in Eppendorf-Gefäße (1,5 mL) pipettiert. Pro Well wurden jeweils 1 Eppendorf-Gefäß mit 700 µL Überstand für den Chemotaxisassay und ein Gefäß mit 300 µL Überstand für den IL-8-ELISA befüllt. Die Überstände wurden unmittelbar nach Gewinnung bei -80°C eingefroren.

3.4 Histopathologische, immunhistochemische und quantitativ stereologische Untersuchungen

Um den möglichen Einfluss unterschiedlicher Gewebezusammensetzungen der in den geplanten Expressionsstudien (III.3.5) zu untersuchenden Explants auf die Abundanz einzelner mRNA-Transkripte abzuschätzen, wurden die Volumenanteile verschiedener Gewebekompartimente und Zelltypen in Explants der Zitze durch quantitativ stereologische Analysen (III.3.4.4) bestimmt. Die Untersuchungen wurden im Institut für Tierpathologie der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt.

3.4.1 Paraffineinbettung und Schnittherstellung

Zur Herstellung von histologischen Schnittpräparaten aus in Paraffin eingebetteten Explants für die histopathologische Untersuchung und quantitativ stereologische Analysen wurden die fixierten Proben nach folgendem Schema maschinell in einem Einbettungsautomaten prozessiert:

Spülen mit <i>Aqua dest.</i> :	30 min
Ethanol 70 %:	2 x 1,5 h
Ethanol 96 %:	2 x 1,5 h
Ethanol 100 %:	2 x 1,5 h
Xylol:	2 x 30 min
Xylol:	1,5 h
Paraffin bei 60°C:	2 h
Paraffin bei 60°C:	3 h

Die prozessierten Gewebeproben wurden anschließend an einer Ausgießstation in Paraffin ausgegossen. Sämtliche Explants der FBR (n = 16) bzw. ZZ (n = 16) eines Tieres wurden in gleichartiger Orientierung zusammen in jeweils einem einzigen Paraffinblock ausgegossen. Zur Orientierung und als Positiv-Kontrollgewebe für immunhistochemische Untersuchungen wurden gleichartig prozessierte Proben von bovinem Leber- und Lymphknotengewebe mit eingebettet (Abb. 3). An einem Rotationsmikrotom wurden über die gesamte Höhe der eingebetteten Explants ca. 4 µm dicke äquidistante Serienschnitte der Paraffinblöcke angefertigt. Jeder 30. bis 36. Schnitt wurde nach Streckung auf

einem 40°C warmen Wasserbad auf geschliffene Objektträger gezogen (Abb. 3) und danach für mindestens 24 h bei 37°C in einem Wärmeschrank getrocknet.

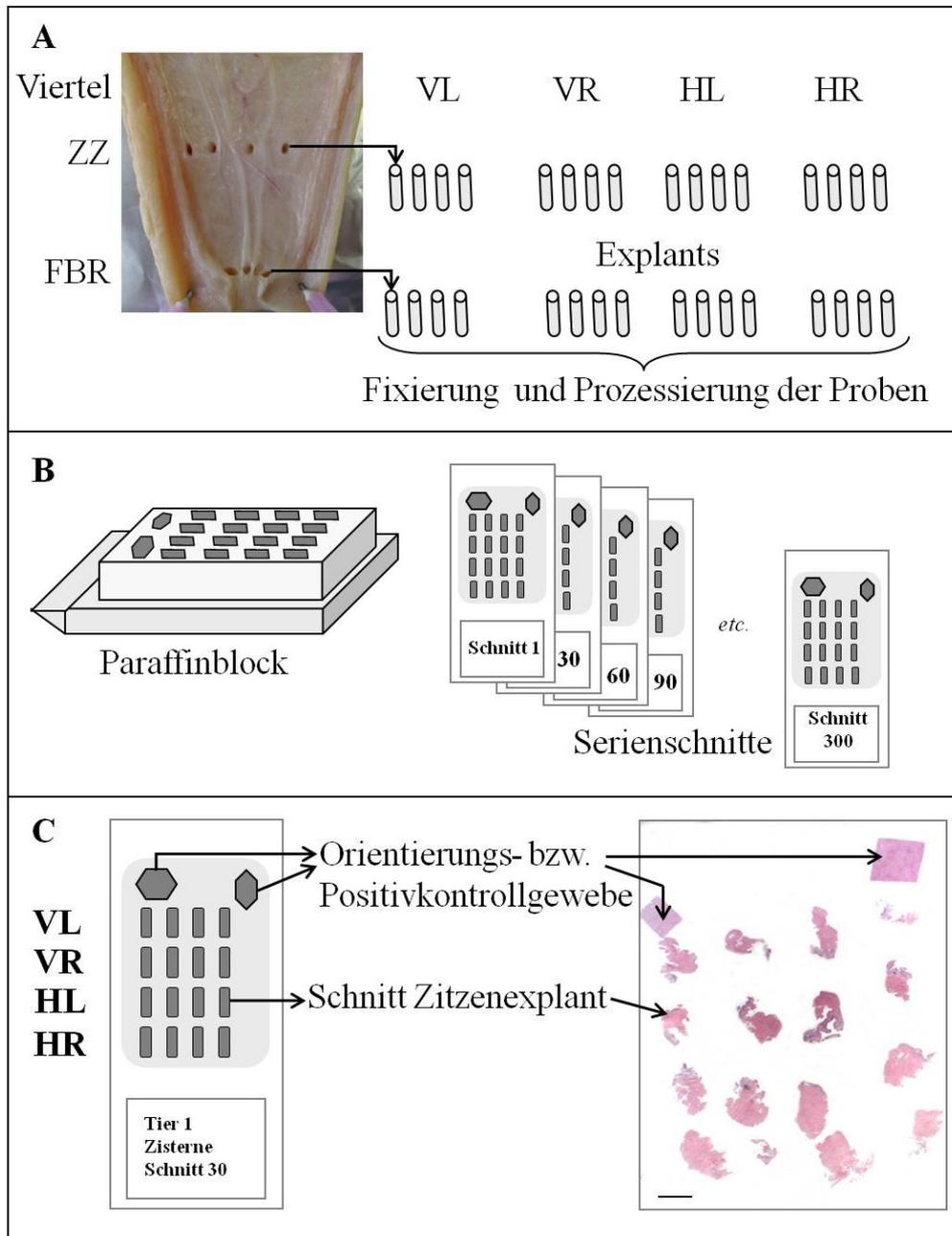


Abb. 3: Schematische Darstellung der Herstellung von Explantgewebe-Arrays zur Bestimmung der Volumenanteile verschiedener Gewebekompartimente/Zelltypen in Explants der Zitze. Von zwei eutergesunden Kühen wurden jeweils vier Explants der FBR und der ZZ pro Euterviertel entnommen ($n = 16$ Explants FBR/Tier; $n = 16$ Explants ZZ/Tier). Viertel: VL = vorne links, VR = vorne rechts; HL = hinten links; HR = hinten rechts (A). Sämtliche Explants der FBR bzw. der ZZ eines Tieres wurden in gleichartiger Orientierung zusammen in jeweils einem Paraffinblock ausgegossen. Zur Orientierung und als Positiv-Kontrollgewebe für immunhistochemische Untersuchungen wurden gleichartig prozessierte Proben von bovinem Leber- und Lymphknotengewebe mit eingebettet (C). Am Mikrotom wurden über die gesamte Höhe der eingebetteten Explants ca. 4 μm dicke Serienschritte der Paraffinblöcke angefertigt (B). Unten rechts (C): Hämalaun-Eosin (HE)-gefärbter Schnitt. Balken = 1 mm.

3.4.2 Paraffinextraktion und Rehydrierung

Zur Extraktion des Paraffins wurden die Schnitte für 20 min in Xylol verbracht. Anschließend erfolgte die Rehydrierung durch kurzes Eintauchen der Schnitte in einer absteigenden Ethanolreihe: 2 x 100 %ig, 2 x 96 %ig, 1 x 70 %ig, 1 x *Aqua dest.*

3.4.3 Histologische und immunhistochemische Färbungen

Hämalaun-Eosin-Färbung (HE)

Zur allgemeinen histologischen Untersuchung auf eventuelle pathomorphologische Veränderungen der Zitzengewebeproben wurde jeder 30. Schnitt, der aus den Paraffinblöcken erstellten Schnittserien, wie folgt mit Hämalaun-Eosin gefärbt (ROMEIS, 1968):

Mayers Hämalaun	4 min
Wässern in fließendem Leitungswasser	5 min
Eintauchen in 1 %ige Eosin-Lösung (III.2.9.1)	3-5 mal
Spülen mit <i>Aqua dest.</i>	3 s
Dehydrierung:	
<i>Aqua dest.</i>	2 s
Ethanol 70 %	2 s
Eintauchen in Ethanol 96 %	2 x 1 s
Eintauchen in Ethanol 100 %	2 x 1 s
Eintauchen in Xylol, fraktioniert	1 min

Anschließend wurden die Schnitte mit Deckgläschen und Histokitt eingedeckt.

Trichrom-Masson Färbung

Zur Bestimmung der Volumenanteile des Muskel- und Bindegewebes in den Explants wurde jeder 31. Schnitt, der aus den Paraffinblöcken erstellten Schnittserien, wie folgt der Trichromfärbung nach Masson (ROMEIS, 1968) unterzogen:

Inkubation in Bouinlösung (III.2.9.1) im Wasserbad (60°C)	10 min
Weigerts Eisenhämatoxin	5 min
Spülen in fließendem Leitungswasser	15 min
Essigsäure 0,5 %	2 s
Färben in Roter Farbe (III.2.9.1)	7 min
Spülen in <i>Aqua dest.</i>	5 min
Inkubieren in 1 % Phosphormolybdänsäure (III.2.9.1)	2 x 3 min
Färben in Anilinblau (III.2.9.1)	4 min
Spülen in <i>Aqua dest.</i>	5 min
Eintauchen in Essigsäure 1 %	2 x 1 s
Eintauchen in Ethanol 96 %	2 x 1 s
Eintauchen in Ethanol 100 %	2 x 1 s
Eintauchen in Xylol, fraktioniert	1 min

Anschließend wurden die Schnitte mit Deckgläschen und Histokitt eingedeckt.

Immunhistochemische Darstellung von Zytokeratin (Epithelmarker) und CD11a/18 (Leukozytenmarker)

Zur Bestimmung des Volumenanteils des Epithelgewebes und der Leukozyten in den Explants wurde das Epithelgewebe durch den immunhistochemischen Nachweis von Zytokeratin in jedem 62. Schnitt und die Leukozyten durch den immunhistochemischen Nachweis von CD11a/18 in jedem 63. Schnitt, der aus den Paraffinblöcken erstellten Schnittserien, dargestellt. Bei den immunhistochemischen Nachweisen von Zytokeratin und CD11a/18 wurde nach der indirekten Methode verfahren (BURNETT et al., 1997). Bei dieser Methode bindet ein nicht markierter Antikörper das Antigen und wird von einem zweiten, markierten Antikörper gebunden, der zur Detektion dient. Dies führt zu einer Verstärkung des Effektes, da mehrere Sekundärantikörper an verschiedene Bindungsstellen eines Primärantikörpers binden können (BURNETT et al., 1997).

Zur immunhistochemischen Darstellung von Zytokeratin (Epithelmarker) und CD11a/18 (Leukozytenmarker) wurden folgende Protokolle angewandt:

Zunächst erfolgte die Trocknung der Schnitte für 24 Stunden im Trockenschrank bei 37°C. Anschließend wurden die Schnitte in Xylol (Isomerengemisch) für 20 min entparaffiniert und anschließend rehydriert (III.3.4.2). Für die Demaskierung der Schnitte wurden für die Darstellung von Zytokeratin und CD11a/18 unterschiedliche Verfahren angewendet:

Für die immunhistochemische Darstellung von Zytokeratin: Es erfolgte zunächst das Blockieren der Schnitte über 15 min in 1 %iger Wasserstoffperoxidlösung (H₂O₂). Danach wurden die Schnitte in TBS, pH 7,6 (III.2.9.1) für 10 min gespült. Die Demaskierung erfolgte mit Proteinase K, die für maximal 10 min auf den Schnitten verblieb. Anschließend wurden die Schnitte in TBS, pH 7,6 für 10 min gespült.

Für die immunhistochemische Darstellung von CD11a/18: Das Demaskieren erfolgte durch Kochen der Schnitte in TRIS/EDTA-Puffer, pH 9,0 (III.2.9.1) in einer Mikrowelle bei 700 W für 2 x 10 min. Nach zwanzig minütigem Abkühlen im Demaskierungspuffer erfolgte das Blockieren der Schnitte in 1 %iger Wasserstoffperoxidlösung (H₂O₂) für 15 min. Danach wurden die Schnitte in TBS, pH 7,6 für 3 x 5 min gespült.

Anschließend wurde für beide immunhistochemischen Darstellungen wieder das gleiche Protokoll angewendet: Das Inkubieren mit Kaninchen-Normalserum, das zuvor 1:10 in TBS verdünnt wurde, erfolgte in einer Feuchtkammer für 30 min. Anschließend wurden die Schnitte mit dem primären Antikörper inkubiert. Für die immunhistochemische Darstellung von Zytokeratin wurde der monoklonale Antikörper „monoclonal Mouse Anti-Human Cytokeratin“ mit einer Verdünnung von 1:50 in TBS verwendet. Er verblieb für 1 h bei Raumtemperatur in einer Feuchtkammer auf den Schnitten. Für die immunhistochemische Darstellung von CD11a/18 wurde der monoklonale Antikörper „BAT75A“ (Mouse Anti-CD11a/18) verwendet. Auch dieser Antikörper wurde 1:50 in TBS verdünnt und für 1 h bei Raumtemperatur in einer Feuchtkammer inkubiert. Daran schloss sich ein erneutes Spülen der Schnitte in TBS, pH 7,6 für 3 x 5 min an. Es folgte die Inkubation mit dem 2. Antikörper. Sowohl für die immunhistochemische Darstellung von Zytokeratin als auch für die immunhistochemische Darstellung von CD11a/18 wurde der polyklonale Antikörper „polyclonal Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulins/HRP“, in einer Verdünnung von 1:100 in TBS verwendet und die Inkubation erfolgte erneut in einer Feuchtkammer für 1 h. Dann folgte Spülen

mit TBS, pH 7,6 für 3 x 5 min. Nach dem Spülen wurde das Chromogen DAB (3,3-Diaminobenzidintetrahydrochloriddihydrat) (III.2.9.1) mit H_2O_2 als Substrat für 5 min auf die Objektträger aufgetragen. Die Reaktion wurde durch 5-minütiges Wässern in fließendem Leitungswasser gestoppt. Die Diaminobenzidin (DAB) Reaktion dient der Detektion der an den Sekundärantikörper gebundenen Meerrettichperoxidase (HRP). Bei dieser Reaktion wird Wasserstoffperoxid (H_2O_2) als Substrat umgesetzt, dabei ergibt sich eine braune Färbung des DAB. Die Gegenfärbung erfolgte für wenige Sekunden in Hämalun. Daran schloss sich das Bläuen in Leitungswasser für 5 min und die Entwässerung der Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe (1 x 70 %, 2 x 96 %, 2 x 100 % Ethanol) an. Daraufhin wurden die Schnitte für ca. 1 min in Xylol gestellt und anschließend mit Deckgläschen und Histokitt eingedeckt.

Im Rahmen der immunhistochemischen Untersuchungen wurden in jedem Ansatz Positiv- und Negativkontrollen mitgeführt. Als Positivkontrollen dienten die zusammen mit den jeweiligen Zitzenexplantgewebe-Arrays in Paraffin eingebetteten Proben (Abb. 3) bovinen Leber- (Gallengansepithel als Positivkontrolle für Zytokeratin, Abb. 14) und Lymphknotengewebes (Positivkontrolle für CD11a/18, Abb. 14). Als Negativkontrolle wurde in jedem immunhistochemischen Untersuchungsdurchgang, unter Beibehaltung der übrigen in oben genannten Protokoll aufgeführten Schritte, jeweils ein zusätzlicher Schnitt des Zitzenexplantgewebe-Arrays mit einem irrelevanten Erstantikörper (FCV S1-9 Monoclonal Mouse Anti-Feline Calici Virus, 1:50 in TBS) anstelle des Anti-Zytokeratin-, bzw. Anti-CD11a/18-Erstantikörpers inkubiert (siehe Ergebnisse Abb. 14).

3.4.4 Quantitativ stereologische Untersuchungen

Die Bestimmung der Volumenanteile des Bindegewebes ($V_{V(BG/Exp)}$), der Muskulatur ($V_{V(M/Exp)}$), des Epithels ($V_{V(E/Exp)}$) und der CD11a/18-positiven Zellen ($V_{V(CD11a/18 \text{ pos } Z/Exp)}$) in den Explants der Zitze erfolgte nach dem Prinzip von Delesse (ROYET, 1991). Hierbei wird die Volumendichte durch Ermittlung der Flächendichte der jeweiligen Kompartimente (Bindegewebe, Muskulatur, Leukozyten) an der Gesamtfläche der Anschnitte der entsprechenden Explants in den äquidistanten Serienschnitten bestimmt. Die Ermittlung der Flächendichten des Bindegewebes ($V_{V(BG/Exp)}$) und der Muskulatur ($V_{V(M/Exp)}$) sowie der CD11a/18-positiven Zellen ($V_{V(CD11a/18 \text{ pos } Z/Exp)}$) in den Explants erfolgte durch Punktzählung (WEIBEL, 1979) (Abb. 4 und Abb. 6), die des Epithels ($V_{V(E/Exp)}$) durch

automatische planimetrische Messung an dem computergestützten Stereologie-system Visiopharm-Visiomorph A/S[®] (Abb. 5).

Gleichung nach dem Prinzip von Delesse:

$$V_V = A_A = P_P$$

V_V: Volumendichte einer Struktur im Referenzkompartiment

A_A: Flächendichte einer Struktur im Referenzkompartiment

P_P: Punktdichte einer Struktur im Referenzkompartiment

$$V_{v(X/Exp)} = \sum P_{(KompartimentX)} / \sum P_{(Explant)}$$

X: Kompartiment (z. B. Bindegewebe, Muskulatur)

V_{V(X/Exp)}: Volumendichte des Kompartimentes X im Explant

ΣP_{Kompartiment X}: Summe der in den ausgewerteten äquidistanten Serienschnitten des Explants auf das Kompartiment X fallenden Trefferpunkte

ΣP_{Explant}: Summe der in den ausgewerteten äquidistanten Serienschnitten des Explants auf das Explant fallenden Trefferpunkte

3.4.4.1 Bestimmung der Volumenanteile des Bindegewebes und der Muskulatur in Explants der Zitze

Zur Bestimmung der Volumendichten des Bindegewebes ($V_{V(BG/Exp)}$) und der Muskulatur ($V_{V(M/Exp)}$) in Explants der FBR und der ZZ wurden von sämtlichen auszuwertenden Trichrom-Masson gefärbten (III.3.4.3) äquidistanten Serienschnitten der entsprechenden Explants unter 16-facher Vergrößerung mit einer an die Stereolupe gekoppelten Kamera Fotografien angefertigt und digital gespeichert. Pro Explant wurden durchschnittlich 17 ± 3 Aufnahmen angefertigt und ausgewertet. Zur Ermittlung der Volumendichten von $V_{V(BG/Exp)}$ und $V_{V(M/Exp)}$ wurden die Aufnahmen mit einem Testpunktraster mit 391 Punkten im Abstand von 10 mm überlagert und die entsprechend auf das Anschnittsprofil des Explants fallenden, sowie die auf Bindegewebe beziehungsweise Muskulatur fallenden Testpunkte (Trefferpunkte) gezählt (Abb. 4). Die notwendige Anzahl der bei der Punktzählung auszuwertenden Trefferpunkte pro Explant (ca. 1.500) wurde einem

Nomogramm (WEIBEL, 1979) entnommen. Pro Explant wurden durchschnittlich 1.766 ± 732 Trefferpunkte gezählt. Die Volumendichten von $V_{V(BG/Exp)}$ und $V_{V(M/Exp)}$ wurden nach der in Kapitel III.3.4.4 beschriebenen Gleichung mit einem computergestützten Tabellenkalkulationsprogramm (Microsoft ExcelTM) errechnet.

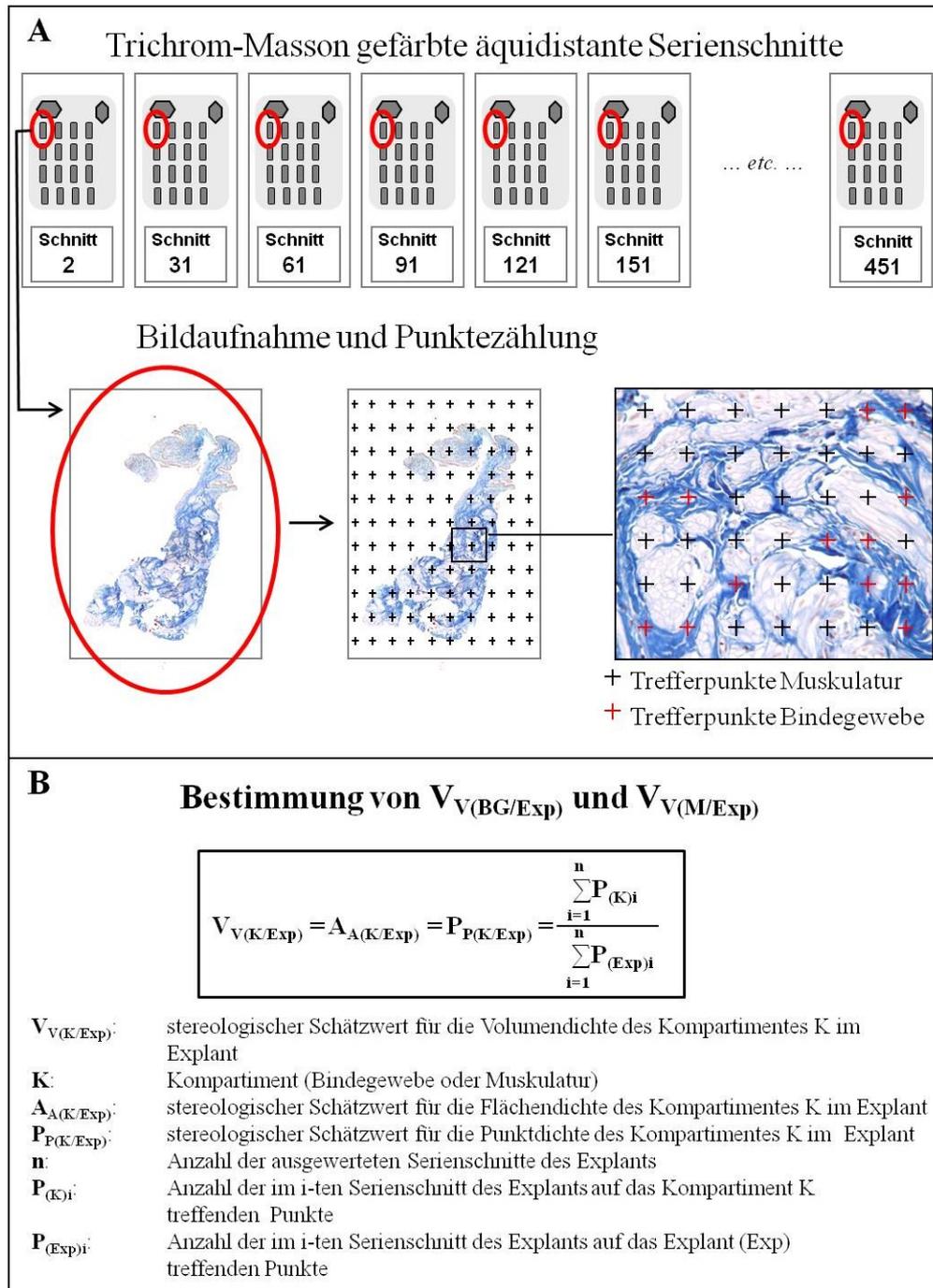


Abb. 4: Schematische Darstellung der quantitativ stereologischen Untersuchung. **A**: Bestimmung der Volumendichten von Bindegewebe ($V_{V(BG/Exp)}$) und Muskulatur ($V_{V(M/Exp)}$) in den Explants der Zitze. **B**: Bestimmung der Zielstruktur im Referenzkompartiment.

3.4.4.2 Bestimmung der Volumenanteile des Epithels und der CD11a/18-positiven Zellen in Explants der Zitze

Die Bestimmung der Volumendichten des Epithels ($V_{V(E/Exp)}$) und der Leukozyten ($V_{V(CD11a/18 \text{ pos } Z/Exp)}$) in Explants der Zitze erfolgte an den immunhistochemisch gefärbten Präparaten der äquidistanten Serienschritte der entsprechenden Explants (immunhistochemische Darstellung von Zytokeratin zur Schätzung von $V_{V(E/Exp)}$; immunhistochemische Darstellung von CD11a/18 zur Schätzung von $V_{V(CD11a/18 \text{ pos } Z/Exp)}$). Die Flächeninhalte der Anschnitte der Explants sowie des Epithels innerhalb der Explantanschnitte wurden mit Hilfe des halbautomatischen computergestützten Stereologiesystems Visiopharm-Visiomorph V/S[©] gemessen. Hierzu wurden in 12,5-facher Vergrößerung komplette Übersichtsaufnahmen sämtlicher auszuwertender Schnitte digital aufgenommen. Die Flächen der Gewebeanschnittprofile der Explants sowie die Flächen des immunhistochemisch markierten Epithels wurden durch Anwendung der Visiomorph[®]-Software markiert, die korrekte Markierung in jedem Einzelfall manuell überprüft und die Flächeninhalte der entsprechenden markierten Flächen automatisch gemessen (Abb. 5). Pro Explant wurden durchschnittlich 9 ± 1 Gewebeanschnitte ausgewertet (insgesamt 574 Anschnitte). Die Volumendichten des Epithels in Explants der Zitze wurden nach der in Kapitel III.3.4.4 beschriebenen Gleichung automatisch durch die Visiomorph[®]-Software des VIS-Visiomorph Integrator Systems, Version 3.4.1.0 errechnet.

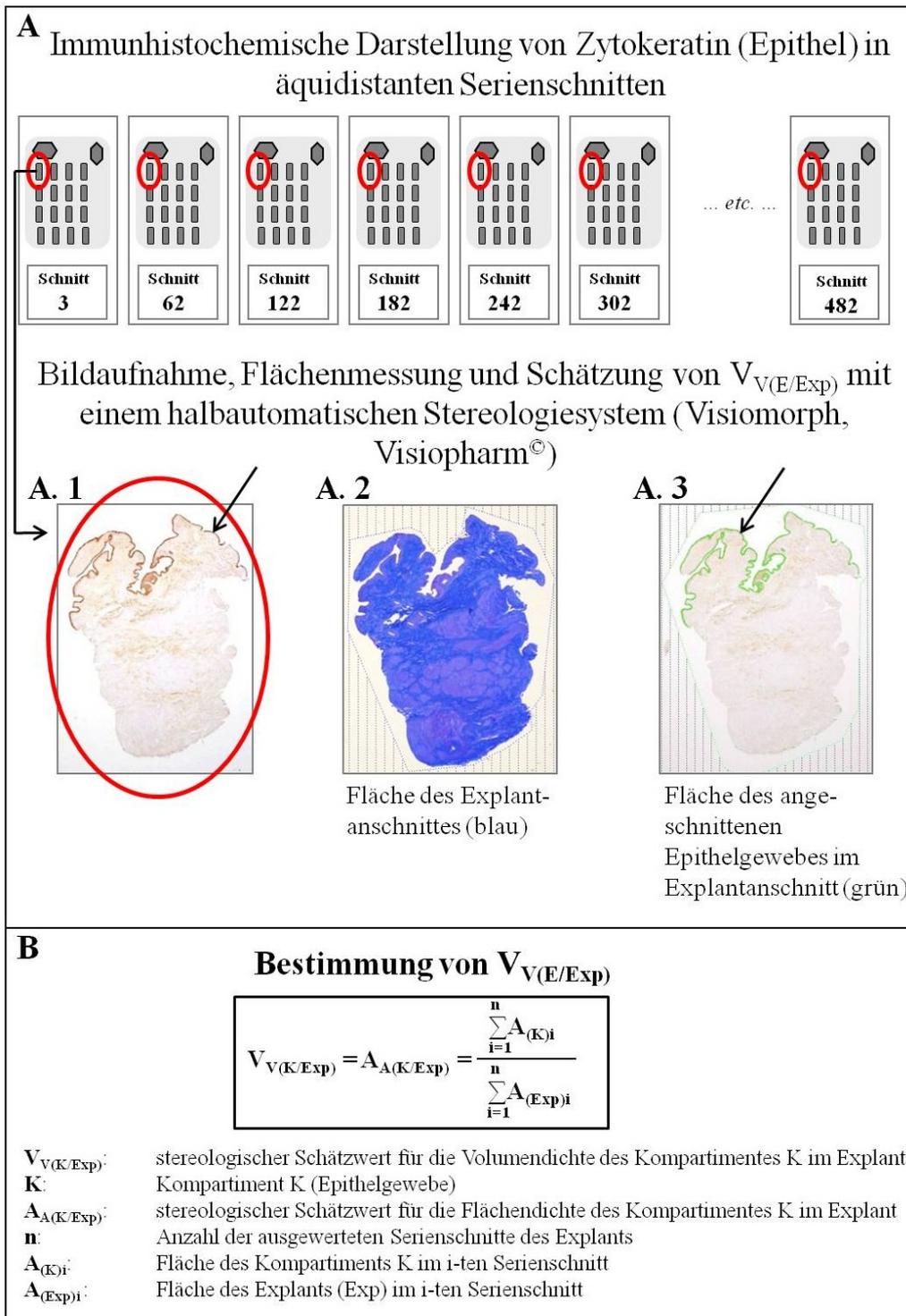


Abb. 5: Schematische Darstellung der quantitativ stereologischen Untersuchungen zur Bestimmung der Volumenanteile des Epithels in Explants der Zitze. **A:** Immunhistochemische Darstellung von Zytokeratin im Anschnitt eines Zitzenexplants. Das immunhistochemisch Zytokeratin-positive Epithel (braunes DAB-Reaktionsprodukt) ist durch einen Pfeil angezeigt (**A.1**). Markierung des gesamten Gewebes im Anschnitt des Zitzenexplants (blau, **A.2**) zur Bestimmung des Flächeninhaltes des gesamten Zitzenexplantanschnittes durch die Software des Stereologiesystems. Markierung des immunhistochemisch Zytokeratin-positiven Gewebes innerhalb des Anschnittes des Zitzenexplants (grün, Pfeil in **A.3**) zur Bestimmung des Flächeninhaltes des Zytokeratin-positiven Gewebes im Zitzenexplantanschnitt durch die Software des Stereologiesystems. **B:** Bestimmung der Volumendichte des Epithels ($V_{V(E/Exp)}$) in Explants der Zitze.

Die Bestimmung der Volumendichte CD11a/18-positiver Zellen in den Explants erfolgte durch Punktzählung am Visiopharm-Visiomorph V/S[®] Stereologiesystem (Abb. 6). Pro Explant wurden durchschnittlich 10 äquidistante immunhistochemisch gefärbte (CD11a/18) Schnittpräparate ausgewertet. Die Auswahl systematisch zufälliger Testfelder innerhalb der auszuwertenden Explantanschnittprofile erfolgte automatisch durch Anwendung der Newcast[®]-Software des Stereologiesystems. Der Flächenanteil der pro Fall ausgewerteten Testfelder an der Gesamtfläche der Anschnittprofile eines Explants betrug 75 %. Pro Explant wurden durchschnittlich 429 ± 220 systematisch zufällige Testfelder ausgewertet (insgesamt 6.859). Mikroskopische Aufnahmen des innerhalb der Testfelder liegenden Explantgewebes wurden in 200-facher Vergrößerung auf einem Monitor abgebildet und mit einem Testpunktraster mit 4.900 Punkten überlagert. Die auf das Anschnittprofil des Explantgewebes bzw. die auf die Anschnittprofile CD11a/18-positiver Zellen innerhalb des Explantgewebes fallenden Testpunkte (Trefferpunkte) wurden gezählt. Pro Explant wurden durchschnittlich $1.931.369 \pm 615.851$ Trefferpunkte ausgewertet (insgesamt 30.901.900 Trefferpunkte). Die Volumendichte von CD11a/18-positiven Zellen im Explant ($V_{V(\text{CD11a/18 pos Z/Exp})}$) wurde nach der in Kapitel III.3.4.4 beschriebenen Gleichung mit einem computergestützten Tabellenkalkulationsprogramm (Microsoft Excel[™]) errechnet.

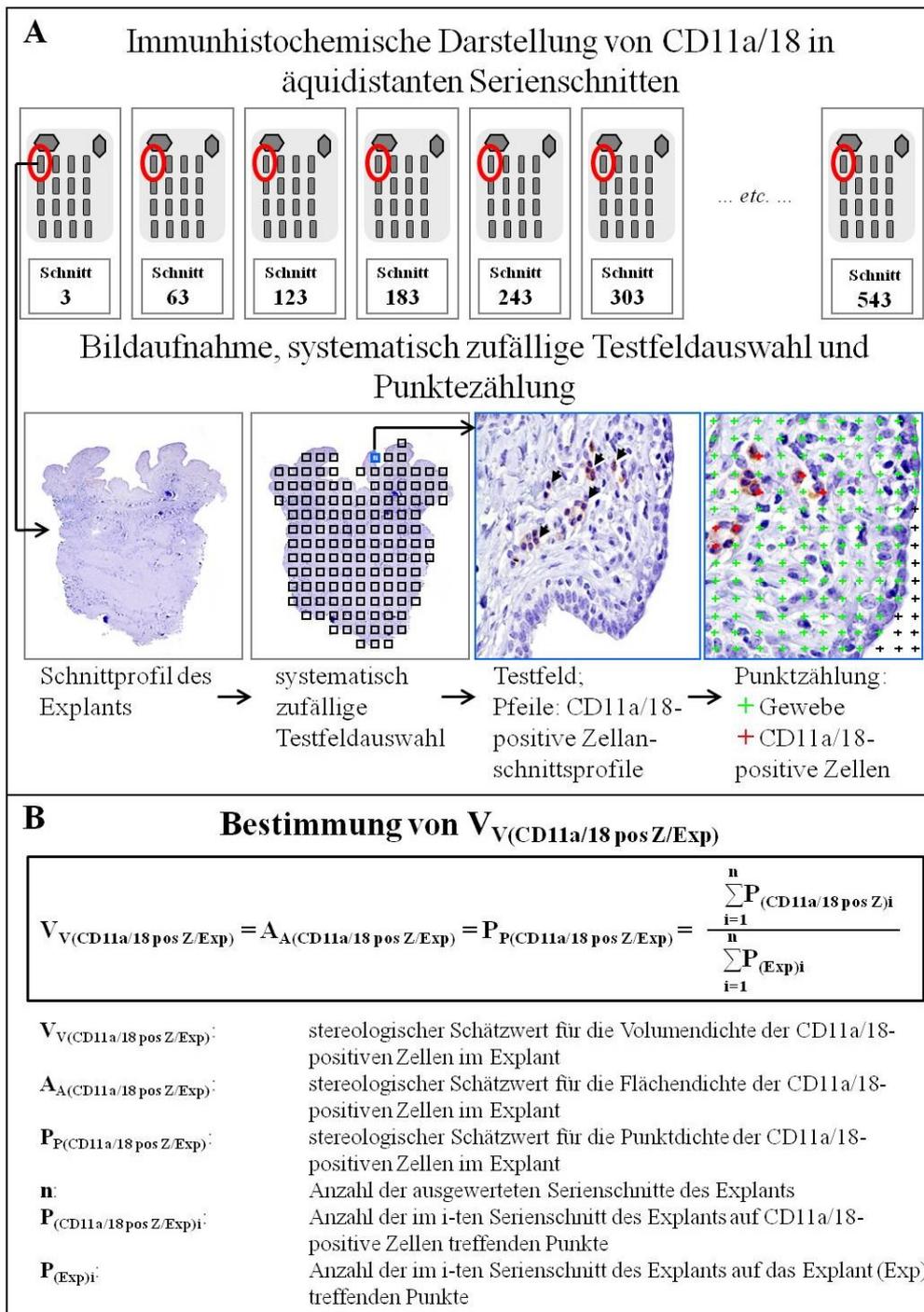


Abb. 6: Schematische Darstellung der quantitativ stereologischen Untersuchungen zur Bestimmung des Volumenanteils der immunhistochemisch CD11a/18-positiven Zellen in Explants der Zitze. **A**: Zweite Reihe (von links nach rechts): Übersichtsaufnahme eines Explantanschnittsprofils; systematisch zufällige Testfeldauswahl (75 % des Anschnittsprofils eines Explants) durch die angewandte Stereologie-Software; die immunhistochemisch CD11a/18-positiven Zellen (braunes DAB-Reaktionsprodukt) im dargestellten Testfeld sind durch Pfeile angezeigt; Projektion eines Punktrasters auf das Bild des Testfeldes und Auszählung der auf das Anschnittsprofil des Explantgewebes bzw. auf die Anschnittsprofile der CD11a/18-positiven Zellen innerhalb des Explantgewebes fallenden Testpunkte (Trefferpunkte). **B**: Bestimmung von $V_{V(\text{CD11a/18 pos Z/Exp})}$

3.5 Molekularbiologische Untersuchungen

Die Reverse Transkription (RT) mit folgender Polymerase Kettenreaktion (PCR) dient dem Nachweis einer spezifischen mRNA. Mittels real time PCR ist es dabei möglich, einen quantitativen Nachweis (qRT-PCR) zu erhalten. Diese Methode wurde zur Durchführung einer Expressionsstudie verschiedener immunrelevanter Gene in Explants der bovinen Zitze angewendet. Die Untersuchung erfolgte am Institut für Immunologie der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover. Der Transport der zu untersuchenden Proben von München nach Hannover erfolgte auf Trockeneis.

3.5.1 mRNA-Extraktion

Die Aufbereitung der mRNA erfolgte mit Hilfe des RNeasy[®] Mini Extraktionskit der Firma Qiagen (III.2.7). Hierzu wurden die in RNAlater[®] stabilisierten und tiefgefrorenen Explants mit einer Pinzette in 1,5-mL Eppendorf-Gefäße überführt. Im Rahmen der methodischen Vorarbeiten (IV.2.1) wurde jedes Explant in ein eigenes Gefäß gegeben. Bei den nachfolgenden Tests wurden jeweils zwei Proben derselben Lokalisation einer Zitze, die beide der gleichen Behandlung unterzogen worden waren, gemeinsam („gepoolt“) in ein Gefäß gegeben (Abb. 7).

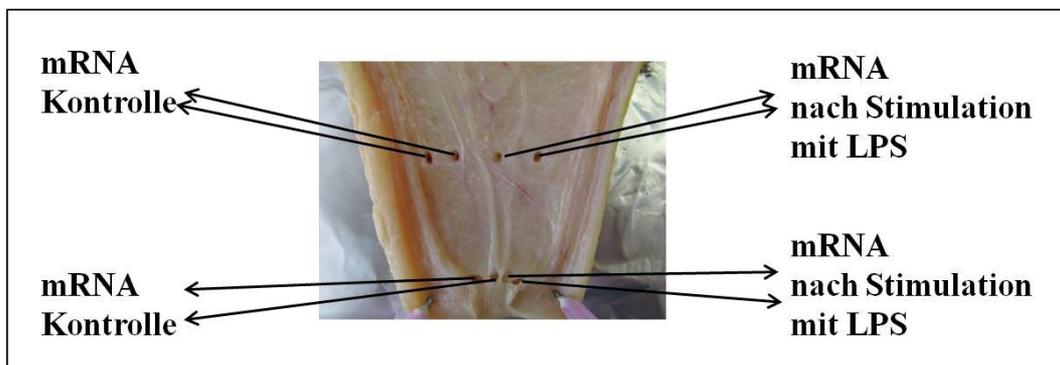


Abb. 7: „Poolen“ der Gewebeproben für die molekularebiologischen Analysen. Die Extraktion der mRNA erfolgte jeweils gemeinsam von zwei Proben der gleichen Lokalisation einer Zitze, die derselben Behandlung unterzogen worden waren.

Vor Beginn der Extraktion wurden je 350 μ L RLT-Puffer des Extraktionskits pro Probe mit je 10 μ L β -Mercaptoethanol (β -ME) pro 1 mL RLT-Puffer gemischt. Diese Lösung kann bei Raumtemperatur bis zu einem Monat lang aufbewahrt werden. Zur Zerkleinerung des Gewebes wurde dieses mit je 350 μ L des zuvor angefertigten RLT-Puffer + β -ME versetzt und mit einem Eppendorf-Pistill unter drehenden Bewegungen mechanisch zerkleinert. Das Lysat wurde für 3 min in

einer Eppendorf-Tischzentrifuge bei $\geq 8.000 \times g$ zentrifugiert, wodurch sich noch vorhandene Gewebereste am Boden des Gefäßes sammelten. Nun wurde der Überstand vorsichtig mit einer Pipette entfernt und in ein neues Eppendorf-Gefäß gegeben. Diesem Überstand wurde das gleiche Volumen 70 %igen Ethanol hinzugefügt und durch Schwenken gemischt. Das Ethanol bewirkt die Ausfällung der in der Probe enthaltenen DNA und RNA. Anschließend wurden jeweils 700 μL dieses Gemisches auf das im Kit enthaltene Filter-System (RNeasy spin column in einem 2 mL-Sammelröhrchen) gegeben und für 15 s bei $\geq 8.000 \times g$ zentrifugiert. Dabei wurden selektiv RNA- und DNA-Moleküle an der Glasfibrermembran des Filters adsorbiert. Der sich im 2 mL-Sammelgefäß befindliche Durchfluss wurde verworfen. Im Anschluss erfolgte der Verdau kontaminierender DNA unter Anwendung des RNase-Free DNase Set. Hierfür wurde bereits vor Beginn der Extraktion eine DNase I Stock-Lösung hergestellt, indem die lyophilisierte DNase I (1.500 Kunitz units) in 550 μL RNase-freiem Wasser gelöst wurde. Diese Lösung kann bei $2 - 8^\circ\text{C}$ bis zu 6 Wochen lang aufbewahrt werden. Zunächst erfolgte ein Waschschrift, für den 350 μL RW1-Puffer auf das Filter-System gegeben wurden und dieses für 15 s bei $\geq 8.000 \times g$ zentrifugiert wurde. Der Durchfluss wurde verworfen. Jeweils 10 μL DNase I Stock-Lösung pro Probe wurden mit je 70 μL RDD-Puffer verdünnt. Anschließend wurden jeweils 80 μL dieser DNase I-Lösung direkt auf den Filter pipettiert. Der DNA-Verdau erfolgte über 15 min bei Raumtemperatur.

Um kontaminierendes Material zu entfernen, wurde die RNA danach dreimal gewaschen. Dabei wurden jeweils 350 μL der Pufferlösung RW1 und zweimal 500 μL der Pufferlösung RPE über das Filter-System gegeben und bei den ersten zwei Waschschriften jeweils für 15 s bei $\geq 8.000 \times g$, beim dritten Waschschrift für 2 min bei $\geq 8.000 \times g$, zentrifugiert. Der bei den einzelnen Schritten erzeugte Durchfluss wurde nach jeder Zentrifugation verworfen. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Filter-System einmal für 1 min leer zentrifugiert, um Rückstände der Waschlösungen vollständig zu entfernen. Zum Schluss wurde das Filter-System in ein neues 1,5 mL-Sammelröhrchen eingebracht und die im Filter verbliebene RNA mittels 50 μL RNase-freiem Wasser durch Zentrifugieren für 1 min ausgewaschen. Der sich nun im Sammelröhrchen befindliche Durchfluss enthielt somit die RNA-Probe, welche sofort auf Eis gelagert wurde. Das Filtersystem wurde verworfen.

3.5.2 Synthese von cDNA durch Reverse Transkription

Die aus den Explants gewonnene RNA wurde in der Reversen-Transkriptase-Reaktion durch das Enzym Superscript™ II Reverse Transcriptase in komplementäre cDNA umgeschrieben. Um ausschließlich die für die Genexpressionsanalyse relevante mRNA in cDNA umzuschreiben, wurden Oligo-(dt)₁₂₋₁₈-Primer verwendet. Diese lagerten sich an das Poly-A-Ende der mRNA-Moleküle an und dienten damit als Startregion für die Reverse Transkriptase. 10 µL der RNA, 1 µL Oligo-(dt)₁₂₋₁₈-Primer und 1 µL Trinukleotide wurden in einem 200 µL-Reaktionsgefäß gemischt. Die Komponenten wurden für 5 min bei 65°C im Biometra T-Gradient zum Auffalten von Sekundärstrukturen der RNA inkubiert. Danach wurden die Proben sofort auf Eis gestellt und jeweils 7 µL des in der Zwischenzeit hergestellten Mastermix (Tab. 8) hinzugefügt. Um das Temperatur-optimum für die Reverse Transkriptase zu erreichen, folgte im Anschluss eine zweite Inkubation bei 42°C für 2 min. Dann erfolgte die Reverse-Transkriptase-Reaktion durch Zugabe von 1 µL (200 U) SuperScript™ II Reverse Transcriptase in den Reaktionsansatz und nachfolgender Inkubation bei 42°C für 50 min. Zum Stoppen der Reaktion wurde abschließend eine Enzym-Denaturierung bei 70°C für 15 min durchgeführt. Durch die Enzym-Denaturierung wird außerdem eine Interaktion der bei der Umschreibung verwendeten Enzyme mit denen der nachfolgenden PCR vermieden. Die so gewonnene einzelsträngige cDNA konnte für 14 Tage im Kühlschrank oder für mehrere Monate bei -20°C aufbewahrt werden.

Tab. 8: Mastermix für die Umschreibung von mRNA in cDNA.

Reagenz	Volumen	Endkonzentration
5 x First-Strand-Buffer (250 mmol/L Tris-HCl, 375 mmol/L KCl, 15 mmol/L MgCl ₂)	4,0 µL	
RNase Inhibitor (RNaseOUT™)	1,0 µL	40 IU
Reduktionsmittel (DTT, Dithiothriol)	2,0 µL	0,1 mol/L

Die Reinheit und Konzentration der gewonnenen cDNA wurde im Eppendorf Biophotometer über die Extinktion bei 260 nm und 280 nm ermittelt. Für diese Messung wurden die Proben 1:50 in TE-Puffer (III.2.9.7) verdünnt und in Ultra-Vetten (8,5 mm) pipettiert. Über den Quotienten der optischen Dichte bei 260 nm und 280 nm wurde die Reinheit der cDNA-Proben beurteilt. Als akzeptabel galten Quotienten von 1,7 bis 2,1. Niedrigere Quotienten wiesen auf eine

Verunreinigung mit Proteinen hin. Die Konzentration (c) in $\mu\text{g/mL}$ wurde anhand der optischen Dichte bei 260 nm (OD_{260}) nach folgender Formel berechnet:

$$c[\mu\text{g / mL}] = \text{OD}_{260} \times 50$$

c: Konzentration der cDNA in $\mu\text{g/mL}$

OD_{260} : optische Dichte bei 260 nm

Nach der Beurteilung der Reinheit und der Bestimmung der cDNA-Konzentration wurden die Proben einheitlich auf 200 ng cDNA pro μL eingestellt. Anschließend wurde die cDNA in der qRT-PCR verwendet oder bei -20°C konserviert.

3.5.3 Quantitative real time PCR (qRT-PCR)

Bei der qRT-PCR findet eine Quantifizierung der PCR-Produkte während der Amplifikationszyklen (in „Echtzeit“) statt. Die qRT-PCR besteht, wie die konventionelle PCR, aus der Wiederholung von drei Reaktionsschritten: Im ersten Schritt wird die doppelsträngige DNA aufgeschmolzen, der zweite Schritt beinhaltet die Anlagerung der Primer und im dritten Schritt erfolgt die Verlängerung des Produkts (KUBISTA et al., 2006). Der Ablauf der drei Reaktionsschritte wird als Zyklus bezeichnet. Eine vollständige PCR umfasst 40 bis 50 Zyklen. Bei der RT-PCR wird ein Farbstoff eingesetzt, der an die Produkte bindet und deren Anwesenheit durch Fluoreszenz anzeigt. Der in den Reaktionsansätzen befindliche Farbstoff SYBR Green fluoresziert nach der Anlagerung an die kleine Windung doppelsträngiger DNA grün. Die Fluoreszenz steht dabei in direktem Verhältnis zur Menge der amplifizierten DNA und wird über die gesamte Laufzeit durch die StepOne™ Software aufgezeichnet. Während der frühen Zyklen der PCR kommt es lediglich zu einem schwachen Fluoreszenzsignal, das sich nicht von den Hintergrundsignalen unterscheiden lässt. In Abhängigkeit von der initialen Menge an DNA im Reaktionsansatz steigt die Fluoreszenz des PCR-Produkts nach einer bestimmten Zyklenzahl exponentiell an. Der Zyklus, in dem die Fluoreszenz aus dem Hintergrundsignal in eine exponentielle Phase übergeht, wird als Cycle threshold (C_t) (Abb. 8 B) bezeichnet. Der C_t -Wert korreliert direkt mit der ursprünglichen Kopienzahl der Proben. Im weiteren Verlauf geht die exponentielle Phase in eine lineare Phase und letztendlich in eine Plateauphase über (Abb. 8 B) (KUBISTA et al., 2006). Da SYBR Green unspezifisch an jede doppelsträngige DNA bindet, muss nach den Amplifikationszyklen eine

Schmelzkurvenanalyse durchgeführt werden (Abb. 8 A). Dabei erfolgt eine schrittweise Denaturierung der Proben. Die doppelsträngige DNA zerfällt in Abhängigkeit von der Größe der Amplifikationsprodukte zu einem bestimmten Zeitpunkt, wodurch ein schlagartiger Abfall der Fluoreszenz stattfindet (KUBISTA et al., 2006). Befinden sich verschiedene Produkte im Reaktionsansatz, wird dies durch eine mehrgipfelige Schmelzkurve sichtbar.

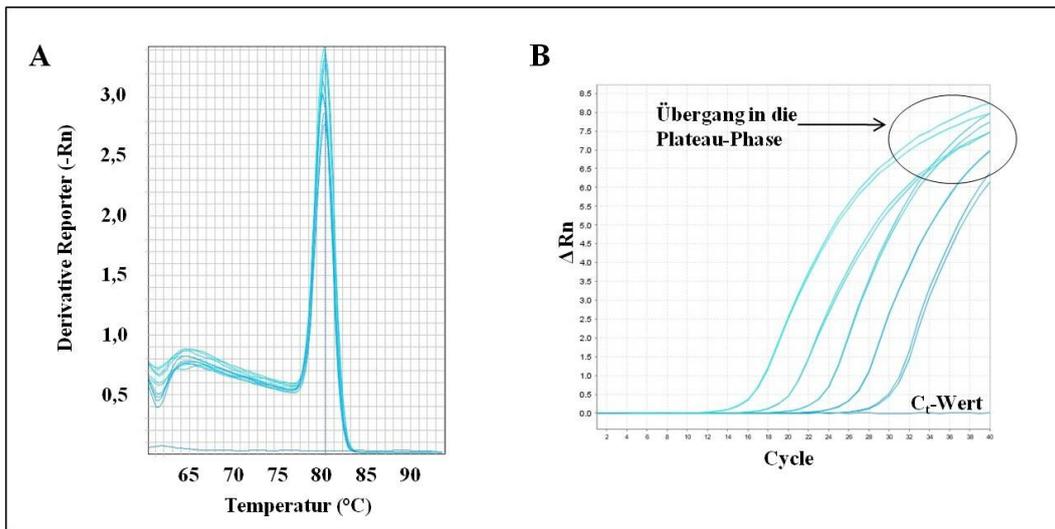


Abb. 8: **Schmelzkurve und Amplifikations-Plot einer qRT-PCR.** Exemplarische Darstellung einer Schmelzkurve von S100A12 in der ersten negativen Ableitung des Reporter-Farbstoffs SYBR Green (Derivative Reporter (-Rn)) aufgetragen gegen die Temperatur mit einem einheitlichen Peak bei 81,01°C (A). Amplifikation (Steigung der SYBR Green-Fluoreszenz (ΔRn)) von Messplasmiden des Proteins S100A12 in den Verdünnungen 1×10^3 Kopien bis 1×10^7 Kopien über 40 Zyklen. Eintritt in die exponentielle Phase am C_t-Wert und Übergang in die Plateau-Phase am Ende der Amplifikation (B).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Genexpression durch eine absolute Quantifizierung der in der qRT-PCR gemessenen Produkte vorgenommen. Die dazu benötigten externen Standards jeder Zielsequenz, die so genannten Messplasmide, waren in der Arbeitsgruppe Immunologie der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover im Vorfeld bereits hergestellt worden und wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Standardreihen der linearisierten Messplasmide wurden parallel zu den Proben in der qRT-PCR gemessen und zur Berechnung der Kopienzahl der jeweiligen Gene herangezogen. Für die Herstellung einer Verdünnungsreihe der Messplasmide musste die Anzahl der Kopien pro μL bestimmt werden. Durch die Messung der optischen Dichte bei 260 nm (OD_{260}) am Eppendorf Biophotometer wurde die Konzentration (C) der doppelsträngigen Plasmid-DNA entsprechend der in Kapitel III.3.5.2 beschriebenen Formel

berechnet. Mittels dieser Information und der bekannten Länge der Zielsequenz konnte die genaue Kopienzahl mit folgender Formel errechnet werden:

$$MW = P \times 660 \text{ g/mol}$$

$$S[\text{Kopien}/\mu\text{L}] = \frac{6 \times 10^{23} [\text{Kopien}/\text{mol}] \times \text{DNA}[\text{g}/\mu\text{L}]}{MW[\text{g}/\text{mol}]}$$

MW:	Molekulargewicht des PCR-Produkts
P:	PCR-Produktlänge in Basenpaaren
S:	Standardkonzentration
DNA:	im Photometer gemessene DNA-Konzentration
660 g/mol:	Durchschnittliches molekulares Gewicht der Basen

Aus der Stocklösung mit der berechneten Anzahl von Kopien pro μL wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt ($100 - 10^9$ Kopien/ μL), die anschließend in der qRT-PCR getestet wurde. Die Standardreihe wurde bei -20°C gelagert. Nach 3-maligem Auftauen wurden die Verdünnungen verworfen und neu angesetzt.

In der qRT-PCR wurde die Genexpression der Chemokine IL-8/CXCL8, MIP-3 α /CCL20 und RANTES/CCL5, der Zytokine TNF- α und IL-1 β sowie der S100-Proteine S100A12, S100A9 und S100A8 im Explantgewebe ohne Stimulation und nach Stimulation mit LPS untersucht. Für die Durchführung wurde der SYBR Green[®] PCR Master Mix verwendet. Die Proben wurden wie in Kapitel III.3.5.1 beschrieben extrahiert, in cDNA umgeschrieben und auf eine cDNA-Konzentration von $200 \text{ ng}/\mu\text{L}$ gebracht. Für jede Messung wurden mindestens fünf Punkte der Standardreihe ($100 - 10^6$ Kopien/ μL) und eine Negativkontrolle (Mastermix + Wasser) eingesetzt. In eine Micro Amp[™] Fast 96-well PCR-Platte wurde pro Vertiefung jeweils $1 \mu\text{L}$ cDNA und $24 \mu\text{L}$ des entsprechenden Mastermix (Tab. 9 und Tab. 10) pipettiert. Alle Ansätze wurden in Duplikaten angelegt. Zur vollständigen Denaturierung der DNA wurden die Proben zu Beginn der PCR einmalig für 10 min auf 95°C erhitzt. Danach erfolgten 40 Zyklen mit je einer Denaturierung der Proben bei 95°C über 15 Sekunden und der Anlagerung der Primer und der Verlängerung des Produkts bei 60°C über 1 min. Nach Ablauf der Amplifikationszyklen wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Dabei wurden die Proben von 60°C in Schritten von $0,3^\circ\text{C}$ unter ständiger Aufzeichnung der Fluoreszenz auf 95°C erhitzt.

Tab. 9: Mastermix für MIP-3 α /CCL20, RANTES/CCL5, IL-1 β , TNF- α und S100-Proteine; Volumen in μ L pro Reaktion.

Reagenz	Volumen (μ L)
SYBR Green [®] PCR Master Mix	12,5
Wasser (RNase-DNase-frei)	8,5
Vorwärts-Primer (5 μ mol/L)	1,5
Rückwärts-Primer (5 μ mol/L)	1,5

Tab. 10: Mastermix für IL-8/CXCL8; Volumen in μ L pro Reaktion.

Reagenz	Volumen (μ L)
SYBR Green [®] PCR Master Mix	12,50
Wasser (RNase-DNase-frei)	9,75
Vorwärts-Primer (5 μ mol/L)	1,50
Rückwärts-Primer (5 μ mol/L)	0,25

Da die optimale Konzentration von Vorwärts- und Rückwärts-Primern je nach Primer und Gerät unterschiedlich ist, müssen vor der Messung von Proben die optimalen Primer-Konzentrationen für die zu untersuchenden Gene ermittelt werden. Die Primer-Optimierung, für die in dieser Arbeit untersuchten Gene, war bereits in der Arbeitsgruppe Immunologie der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover durchgeführt worden und die optimalen Konzentrationen waren somit bekannt.

Die StepOne[™] Software zeichnete die Fluoreszenz von SYBR Green auf und legte für die einzelnen Proben die C_t -Werte fest. Für die eingesetzten Punkte des externen Standards mit bekannter Kopienzahl wurden ebenso die C_t -Werte festgelegt. Durch die logarithmische Darstellung der ermittelten C_t -Werte (C_i) gegen die Kopienzahl der Standardpunkte wurde eine Standardkurve (Regressionsgerade) erstellt. Anhand dieser wurde die in den Proben enthaltene Kopienzahl abgeleitet (Abb. 9). Zur Validierung der PCR wurden die Steigung der Regressionsgeraden, die Effizienz, das Bestimmtheitsmaß (R^2) und die Güte der Schmelzkurve herangezogen. Aus der von der Software berechneten Steigung der Geraden lässt sich die Effizienz der Amplifikation ermitteln.

Bei einer Steigung von $-3,32$ liegt eine 100 %ige Effizienz der Amplifikation vor, das heißt, das Produkt verdoppelt sich in jedem Zyklus. Effizienzen von 90 – 110 % (entspricht einer Steigung von $-3,1$ bis $-3,6$) gelten als auswertbar (Abb. 9). Wenn die Amplifikation nicht ausreichend effizient ist, können die DNA-Ausgangsmengen nicht exakt berechnet werden. Die Software berechnet zusätzlich das Bestimmtheitsmaß (R^2). Mit diesem kann der lineare Zusammenhang zwischen C_t -Werten und eingesetzter Kopienzahl überprüft werden. R^2 sollte dabei Werte $> 0,985$ annehmen. Bei der Analyse der Schmelzkurve durfte lediglich ein einzelner Peak auftreten. So wurde sichergestellt, dass nur ein Produkt amplifiziert wurde (Abb. 8 A). Nur wenn die genannten Parameter den vorgegebenen Kriterien entsprachen, wurden die von der Software nach der Regressionsgerade berechneten Kopienzahlen der Proben für die weitere Auswertung verwendet.

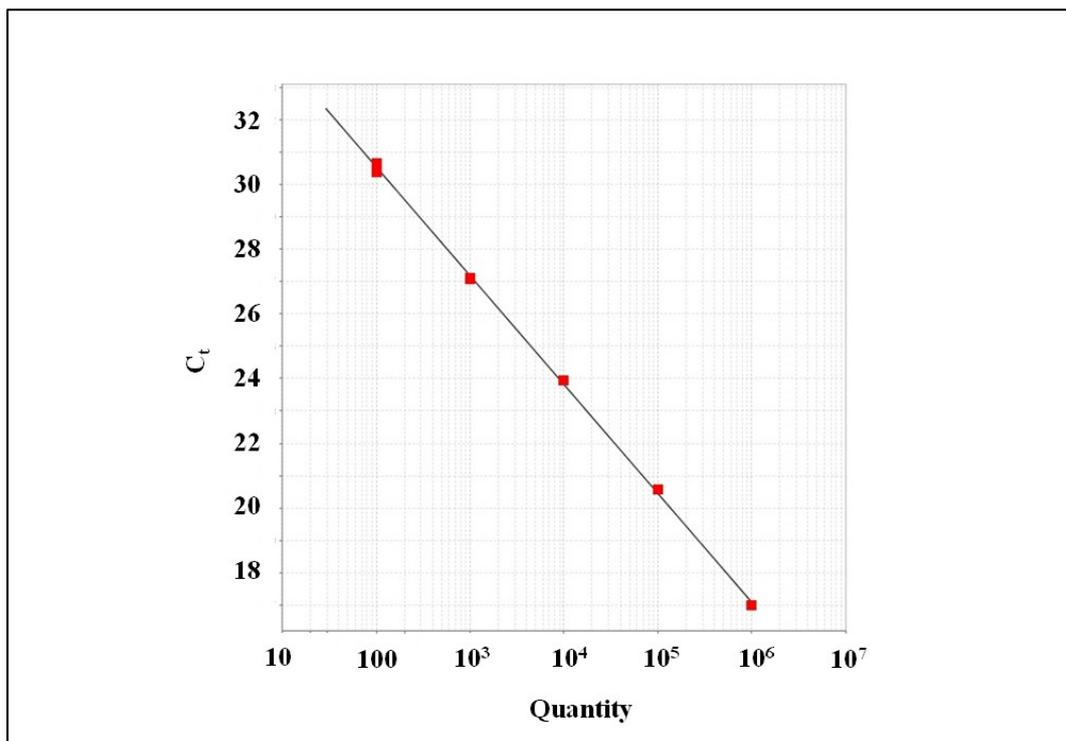


Abb. 9: **Regressionsgerade einer Standardreihe in der qRT-PCR.** Dargestellt sind Messplasmide von S100A12 in den Verdünnungen 1×10^2 Kopien bis 1×10^6 Kopien. Die C_t -Werte (Cycle threshold) sind gegen die Kopienzahlen aufgetragen und ergeben die Regressionsgerade mit der Steigung $s = -3,35$; einer Effizienz von 99,0 % und mit $R^2 = 0,997$.

3.6 Funktionelle Untersuchungen zur Chemotaxis neutrophiler Granulozyten

Um die Bildung chemotaktischer Produkte durch das Gewebe der Explants und somit deren Funktionalität zu überprüfen, wurden die Kulturüberstände der Explants aus der FBR und aus der ZZ von fünf Tieren in einem Chemotaxisassay untersucht. Der Chemotaxisassay ist ein Verfahren zur Analyse des Migrationsverhaltens von PMN. Angelockt durch chemoattraktive Faktoren durchwandern hierbei die PMN aktiv eine 10 µm starke Polycarbonatmembran mit einer Porengröße von 3 µm und sammeln sich in einer „blinden“ Vertiefung (Well) an. Diese Methode bietet die Möglichkeit zur quantitativen Bestimmung der Migrationsleistung einer Zellpopulation und dadurch zum Nachweis chemotaktischer Faktoren (BOYDEN, 1962).

3.6.1 Gewinnung von venösem Blut

Das Blut wurde von klinikeigenen, gesunden Versuchstieren (III.2.8.2) unter sterilen Kautelen aus der *Vena jugularis* entnommen. Dafür wurde die Vene mit einer Staukette nach Witte angestaut, und die Entahme erfolgte mit einer Butterfly-Kanüle und dem Vacutainersystem (III.2.1). Es wurden Natriumheparinat-beschichtete Vacutainerröhrchen verwendet.

3.6.2 Zellisolierung der neutrophilen Granulozyten aus dem Blut

Für die Gewinnung der PMN wurden in einem 50 mL-Röhrchen 15 mL des Vollblutes 1:1 mit 15 mL PBS (III.2.9) verdünnt. Diese Mischung wurde in einem weiteren 50 mL-Röhrchen vorsichtig mit einer Serumpipette und der elektronischen Pipettierhilfe *accu-jet*[®] über 15 mL *Biocoll*[®] geschichtet. Dabei wurde darauf geachtet, dass sich die zwei Phasen nicht mischten. Anschließend erfolgte die Dichtegradientenzentrifugation bei 1.300 x g für 30 min bei 10°C ohne Bremse. Danach wurden das Plasma und die Interphase mit den mononukleären Zellen vorsichtig abgenommen und verworfen. Im Röhrchen verblieb das Erythrozytensediment mit eosinophilen und neutrophilen Granulozyten. Durch zweimalige hypotone Lyse wurden die roten Blutzellen entfernt. Hierfür wurde das Erythrozytensediment mit PBS auf 10 mL aufgefüllt und resuspendiert. Um die Erythrozyten zu lysieren wurde 20 mL *Aqua dest.* hinzugegeben. Der Lyseprozess (20 s unter Schwenken) wurde durch die Zugabe von 20 mL doppelt konzentrierten PBS (2 x PBS; III.2.9.4) gestoppt. Nach Zentrifugation bei 220 x g

für 8 min bei 4°C und dem Abkippen des Überstandes wurde entsprechend eine zweite Lyse durchgeführt, wodurch die noch verbliebenen Erythrozyten entfernt wurden. Um die so gewonnenen Granulozyten zu waschen, wurde das Zellsediment erneut in 20 mL PBS resuspendiert und für 8 min bei 220 x g und 4°C zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Granulozyten gepoolt in 3 mL Zellkulturmedium aufgenommen und nach Auszählung mit dem automatischen Hämatologiegerät Sysmex[®] auf die gewünschte Dichte (5×10^6 PMN/mL) eingestellt.

3.6.3 Chemotaxisassay

Die 10-Well-Transmigrationskammer besteht aus einer Acrylbodenplatte, einer Acryldeckplatte, einer Silikondichtungsmatte und sechs Schraubenmuttern. In die Bodenplatte sind zehn Rundboden-Vertiefungen mit einem Volumen von 400 µL eingelassen („blinde“ Wells). Sie korrespondieren mit den oberen Wells der Deckplatte, die ein Volumen von 285 µL fassen. Beim Zusammenbau werden die Boden- und die Deckplatte durch eine zwischengelegte Polycarbonatmembran getrennt, die somit den Boden für die Vertiefungen der Deckplatte bildet. Die Polycarbonatmembran ist etwa 10 µm dick. Bei einer Porengröße von 3 µm befinden sich 2×10^6 Poren auf einem Quadratcentimeter der Membran. Die Membran weist eine glänzende weniger adhärenente und eine matte stärker adhärenente Seite auf. Die entsprechend den Bohrungen der Acrylplatten mit Löchern ausgestattete Silikonmatte wird über der Polycarbonatmembran zwischen den beiden Platten platziert. Sie dient der Abdichtung. In der Bodenplatte sind sechs Gewindestangen verankert, die beim Zusammenlegen durch entsprechende Einsparungen der Silikonmatte und der Deckplatte führen. Mit Hilfe der Schraubenmuttern werden die beiden Acrylplatten mäßig fest aneinander gepresst.

In die „blinden“ Vertiefungen des unteren Kammerteils wurden in Doppelsätzen jeweils 300 µL Probensuspension oder Kulturmedium als Negativkontrolle und 100 ng/mL IL-8-Gebrauchslösung (III.2.9.5) als Positivkontrolle gegeben. Diese Flüssigkeit wurde mit 125 – 130 µL 100 %igem isotonen Percoll[®] unterschichtet bis ein positiver Flüssigkeitsmeniskus zu erkennen war. Durch das Percoll[®] sollte die Adhärenz der gewanderten Zellen am Boden der Vertiefungen vermindert werden. Die zehn Vertiefungen des unteren Kammerteils wurden nun mit der Polycarbonatmembran bedeckt. Dabei war darauf zu achten, dass sich unter der Membran keine Luftblasen ansammelten. Auf die Membran wurde die

Silikondichtung und darüber der obere Kammerteil platziert und mittels Schraubenmuttern fixiert. In die Vertiefungen des oberen Kammerteils wurden abschließend jeweils 200 μL der Zellsuspension (5×10^6 PMN/mL) gegeben (Abb. 10). Die Inkubation der Transmigrationskammern erfolgte im Brutschrank über einen Zeitraum von 2 h bei 37 °C und 5 % CO_2 .

Nach der Inkubation wurden die Zellsuspensionen der oberen Vertiefungen (entspricht den nicht gewanderten Zellen) sorgfältig abpipettiert und verworfen. Dabei musste auf die Unversehrtheit der Polycarbonatmembran geachtet werden. Nach Entfernung der Schraubenmuttern wurde der obere Teil der Kammer waagrecht abgehoben, wobei sich Silikonmatte und Membran gleichzeitig mit ablösen. Nach guter Durchmischung der Zellsuspension in den „blinden“ Vertiefungen durch mehrmaliges auf- und abpipettieren wurden 375 μL in TruCount[®]-Tubes überführt, in denen je 125 μL Zellkulturmedium vorgelegt war (gesamtes Probenvolumen = 500 μL). Die Proben wurden daraufhin bis zur Messung auf Eis gelagert. Zur Quantifizierung migrierter PMN wurden die Proben durchflusszytometrisch analysiert (III.3.6.4). Nach der Testdurchführung wurden die Kammerteile gründlich mit *Aqua dest.* gespült (30 min, Raumtemperatur) und anschließend über Nacht auf einem Tuch getrocknet. Nach mehrfacher Benutzung wurde zum Reinigen der Acrylplatten der Transmigrationskammer eine 1 molare Natriumhydroxid-Lösung verwendet. Hierfür wurden 22 g Natriumhydroxid-Pellets in 550 mL *Aqua dest.* gelöst. Um einer Schädigung der Silikondichtung vorzubeugen, musste der Kontakt mit Natriumhydroxid-Lösung unbedingt vermieden werden. Danach wurden die Kammeranteile dreimal mit sterilem *Aqua dest.* gespült und dann über Nacht am Arbeitsplatz getrocknet.

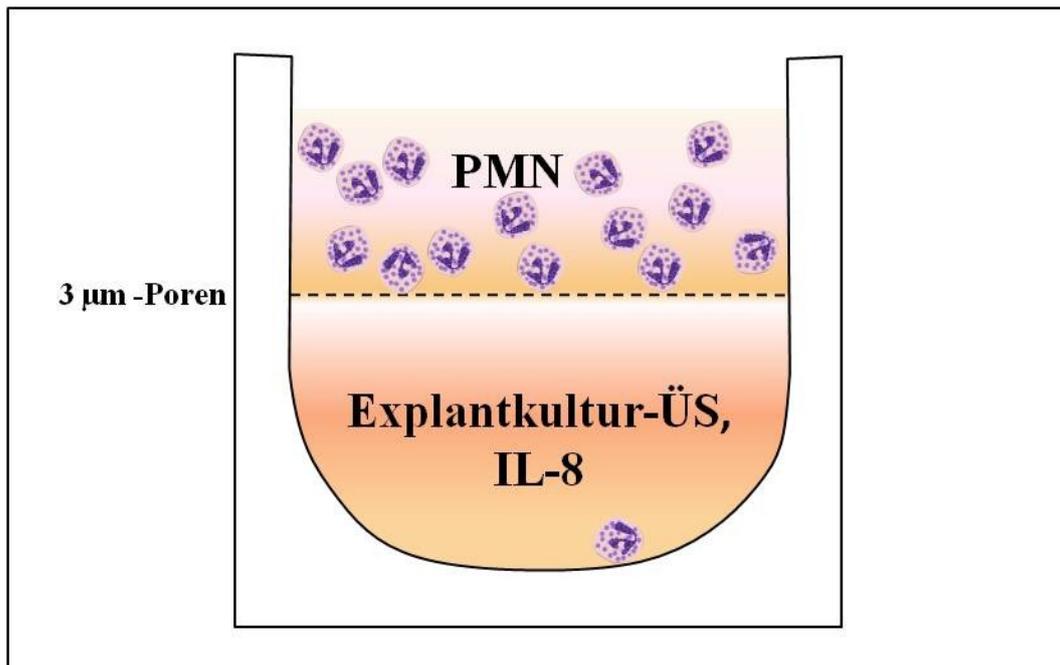


Abb. 10: **Schematische Darstellung der Transmigrationskammer.** Angeregt durch chemoattraktive Faktoren durchwandern die PMN eine 10 µm starke Polycarbonatmembran mit einer Porengröße von 3 µm und sammeln sich in der unteren „blinden“ Vertiefung der Kammer an. ÜS = Überstand, IL-8 = Interleukin 8.

3.6.4 Durchflusszytometrie

Bei dieser Methode werden Einzelzellen in einem Probenleitsystem an einem Laserstrahl vorbei geleitet. Gestreutes Licht einer speziellen Wellenlänge (hier 488 nm) wird in Richtung des Strahls als sogenanntes Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter, FSC) oder im 90° Winkel dazu, als Seitwärtsstreulicht (Side Scatter, SSC), erfasst. Durch die Vorwärtsstreuung werden die Größe des Partikels und dessen Refraktionsindex, durch die Seitwärtsstreuung die Komplexität, das heißt die Oberflächenbeschaffenheit und die Granularität, charakterisiert. Die Signale werden aufgefangen und an den angeschlossenen Computer weitergeleitet. Mit Hilfe der angeschlossenen Computereinheit werden die Geräteeinstellungen kontrolliert, Messereignisse erfasst und gespeichert (RADBRUCH, 2000).

Bei dem für diese Versuche verwendeten Durchflusszytometer handelt es sich um ein FACScan[®] mit einem Argonlaser, der Licht einer Wellenlänge von 488 nm erzeugt. Das Gerät erfasst mit entsprechenden Detektoren Fluoreszenzlicht-Emissionen in drei verschiedenen Wellenlängenbereichen (FL-1 = Grünfluoreszenz: 515 – 545 nm; FL-2 = Orangefluoreszenz: 564 – 606 nm; FL-3 = Rotfluoreszenz:

> 650 nm). Jede Zelle oder jeder Partikel wird folglich durch fünf verschiedene Parameter (FSC, SSC, FL-1, FL-2, FL-3) charakterisiert und als ein Messereignis festgehalten.

Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Software FCS Express[®] V3. Die Ergebnisse wurden mehrparametrisch als Punktediagramme (sogenannte „Dot-plots“) dargestellt. Für die Vergleichbarkeit wurden die Messungen der Proben jeweils bei gleichen Einstellungen („settings“) des Durchflusszytometers durchgeführt. Jede Zählung wurde beim Erreichen des Referenzwerts von 6.000 gezählten TruCount[®]-Beads automatisch beendet.

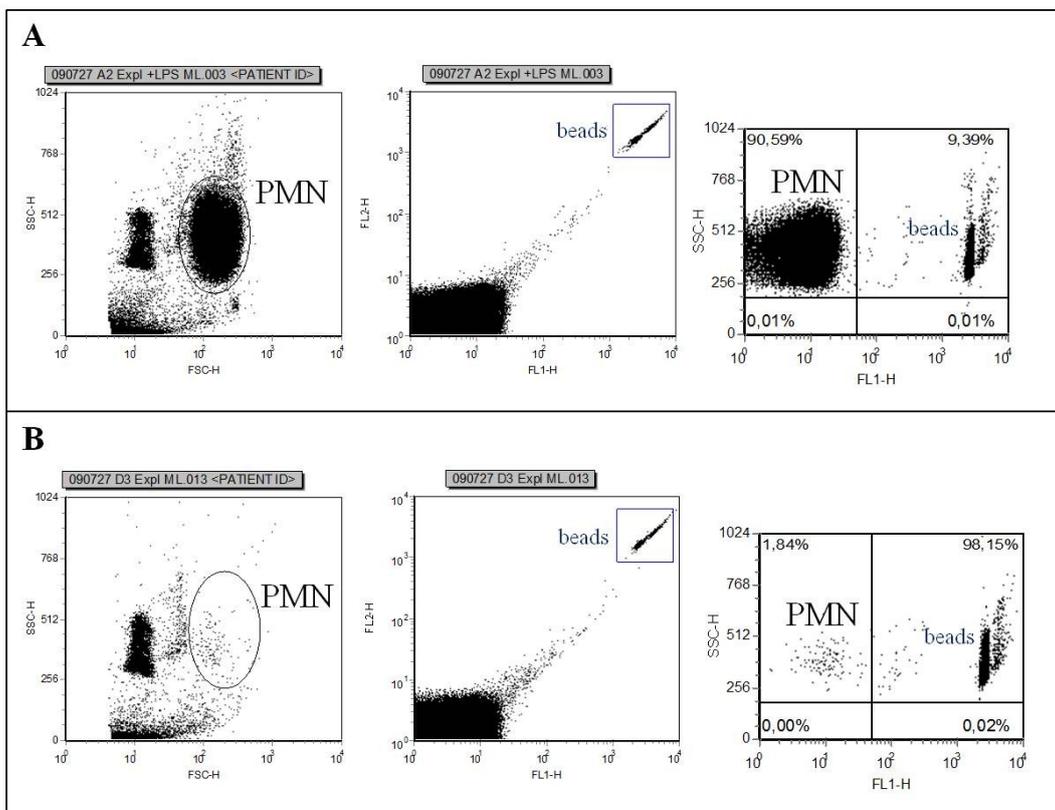


Abb. 11: **Durchflusszytometrische Analyse nach Chemotaxisassay.** Die Dotplots zeigen die messbaren Partikel (PMN und TruCount[®]-Beads) aus den unteren Wells der Transmigrationskammer nach gesteigerter Migration (A) und basale Werte eines entsprechenden Kontrollansatzes (B). Linke Abbildung: Zellmorphologie, migrierte PMN (Vorwärts [FSC]- und Seitwärtsstreulicht [SSC]); Mittlere Abbildung: Fluoreszenz, TruCount[®]-Beads als Referenz (Grünfluoreszenz [FL-1] gegen Orangetfluoreszenz [FL-2]); Rechte Abbildung: Im linken oberen Quadranten sind die PMN dargestellt, im rechten oberen Quadranten erkennt man die TruCount[®]-Beads (FL-1 gegen SSC).

3.6.5 Ermittlung der relativen Transmigrationsrate

Die Transmigrationsrate beschreibt, wieviel Prozent der in das obere Well der Transmigrationskammer eingesetzten 1 Millionen PMN (5 Millionen/mL) aktiv durch die Porenmembran in das untere „blinde“ Well migriert sind.

Zur Ermittlung dieser Rate in Prozent wurde zunächst die Anzahl der bei 6.000 TruCount[®]-Beads migrierten PMN auf die Gesamtprobe (50.441 bead counts) hochgerechnet. Anschließend wurde die Anzahl der migrierten PMN durch die in das obere Well eingesetzten 1 Millionen (5 Millionen/mL entspricht 1 Millionen/200 μ L) geteilt und mit 100 multipliziert.

Die Migrationsrate von PMN auf 100 ng/mL rhIL-8 (Positivkontrollen) (III.2.9.5) wurde wie folgt bestimmt: Der Mittelwert (MW) \pm SD der Transmigrationsrate aller Positivkontrollen betrug 74 % \pm 11 % (CV = 14 %). Um tagesabhängige oder PMN-Spendertier-abhängige Schwankungen zu relativieren, wurden die Transmigrationsraten auf die Kulturüberstände mit den Migrationsraten auf die jeweiligen Positivkontrollen ins Verhältnis gesetzt. Dafür wurde die Migrationsrate der PMN auf 100 ng/mL rhIL-8 mit 100 % gleichgesetzt und die Migrationsraten auf die Explantkulturüberstände jeweils darauf bezogen.

$$\text{PMN\%} = \frac{\text{PMN} \times 100}{\text{PMN(Positivkontrolle)}}$$

Ausgewertet wurden somit Migrationsraten gewanderter PMN auf Explantkulturüberständen im Verhältnis zur IL-8-Kontrolle (= relative Transmigrationsrate).

3.7 IL-8-Bestimmung mittels ELISA

Zur quantitativen Bestimmung der IL-8-Konzentration in den Überständen der Explantkultur wurde das Quantikine[®] Human CXCL8/IL-8-Kit für humanes IL-8/CXCL8 verwendet. Dieser Test wurde schon mehrfach zum Nachweis von bovinem IL-8/CXCL8 eingesetzt (SHUSTER et al., 1997; BOUDJELLAB et al., 2000). Es handelt sich um einen quantitativen Sandwich-ELISA mit einer Intra-assayvarianz 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 zunächst mit Überständen von Explantkulturen der Vorversuche (Stimulation mit 20 μ g/mL LPS von *E. coli* O111:B4 über 18 h) nach Anleitung des Herstellers

durchgeführt. Wegen mangelnder Sensitivität wurde in einem weiteren Versuchsansatz das eingesetzte Probenvolumen auf 100 μL verdoppelt und die Inkubation des primären Antikörpers über 16 h bei 4°C durchgeführt. Eingesetzt wurden wieder Überstände von mit 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ stimulierten Explants der Vorversuche. Im Anschluss wurde der modifizierte Versuchsansatz (100 μL Probenvolumen, Inkubation 16 h bei 4°C) mit Explantkulturüberständen der finalen Versuche durchgeführt (Stimulation mit 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS von *E. coli* 1303 über 18 h).

3.8 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mithilfe der Programme Microsoft Excel™ (Microsoft Inc., USA) und SAS (Version 9.2; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) durchgeführt.

Die Ermittlung von Mittelwerten (MW), Standardabweichungen (SD), Minimal- und Maximalwerten sowie der Variationskoeffizienten (CV) erfolgte in Excel. Ob sich die in quantitativ stereologischen Untersuchungen ermittelten Volumenanteile der untersuchten Gewebe- und Zelltypen in Explants der FBR und in Explants der ZZ unterscheiden (FBR vs. ZZ), wurde mithilfe eines gemischten Modells untersucht. Die in den Expressionsstudien ermittelten Transkriptabundanzen wurden ebenfalls in einem gemischten Modell auf Unterschiede in Explants mit und ohne LPS-Stimulation (Kontrolle vs. LPS) und auf Unterschiede zwischen den verschiedenen Lokalisationen (FBR vs. ZZ) untersucht. Auch die Untersuchung der Migrationsraten von PMN im Chemotaxisassay auf Unterschiede zwischen Stimuli (Kontrolle vs. LPS) und Lokalisationen (FBR vs. ZZ) erfolgte mittels eines gemischten Modells. Bei dieser Art von Auswertung wird für wiederholte Messungen innerhalb eines Tieres korrigiert. Nachdem von jedem Tier 32 Messungen (16 Explants/FBR und 16 Explants/ZZ) zu verschiedenen Zeitpunkten vorlagen, konnten die üblichen parametrischen Tests wie ANOVA nicht eingesetzt werden, da die Daten innerhalb eines Tieres korreliert sind. Gemischte Modelle betrachten dabei feste Effekte (z. B. unterschiedliche Lokalisationen), auf die untersucht wird, und zufällige Effekte, wie in diesem Fall der Effekt des Tieres, für die korrigiert wird (FAHRMEIR et al., 2009). Bei paarweisen Vergleichen (Vorversuch qRT-PCR) wurde zusätzlich eine Bonferroni-Korrektur angewandt. Dadurch wurde bei diesen Vergleichen die Signifikanzgrenze auf $p \leq 0,017$ herabgesetzt. Die Auswertung erfolgte mittels ProcMIXED in SAS (Version 9.2).

Werte mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit (p) von $\leq 0,001$ wurden als höchst signifikant, jene mit $p \leq 0,01$ als hoch signifikant und p -Werte $\leq 0,05$ als signifikant bezeichnet. Werte mit $p > 0,05$ galten als nicht signifikant.

In der deskriptiven Statistik wurden die Daten durch Minimal- und Maximalwerte, das obere und untere Quartil sowie den Median charakterisiert und in Boxplots dargestellt (Abb. 12). Die „Box“ umfasst 50 % der Werte. Sie beginnt beim 1. Quartil und endet beim 3. Quartil, kennzeichnet also den Interquartilsabstand. Der Median wird innerhalb der „Box“ in Form einer horizontalen Linie dargestellt. Die angrenzenden T-Balken („Whiskers“) stellen Extremwerte dar. Sie vermitteln somit einen Eindruck, wie weit die restlichen 50 % der Werte streuen (HARMS, 1998; KUCKARTZ, 2010).

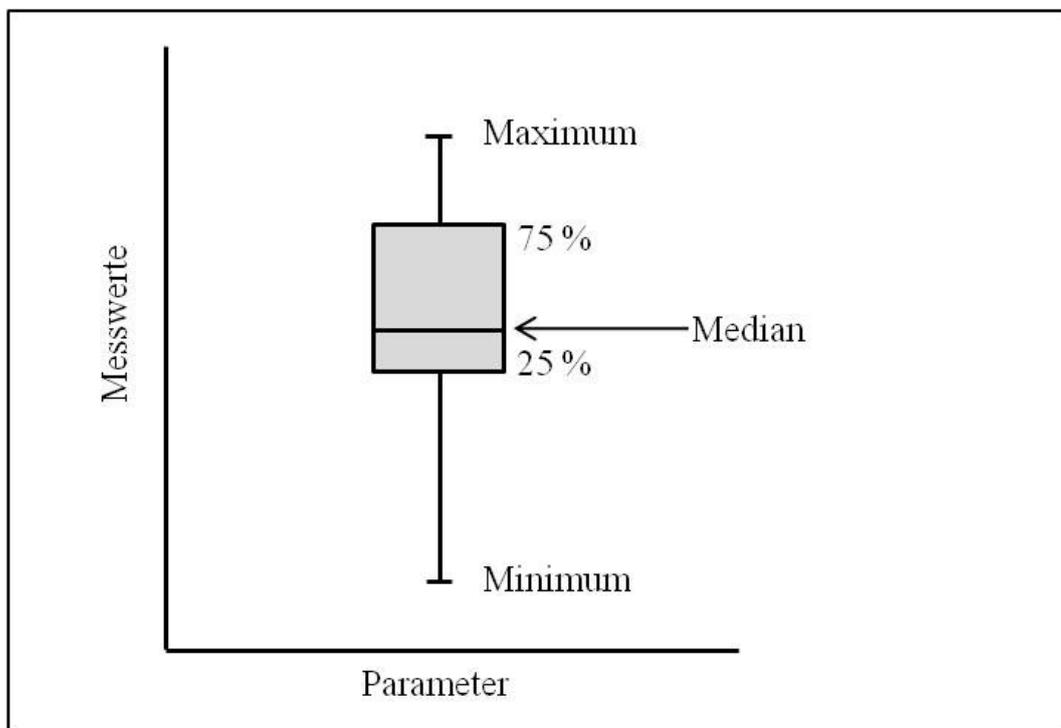


Abb. 12: **Exemplarische Darstellung von Messwerten in einem Boxplot.** Die zentralen 50 % der Daten befinden sich in der Box, in der der Median durch eine horizontale Linie gekennzeichnet ist.

IV. ERGEBNISSE

1 Histopathologische und quantitativ stereologische Untersuchungen

Die zelluläre Zusammensetzung des untersuchten Probenmaterials beeinflusst grundsätzlich die Ergebnisse qRT-PCR basierter Genexpressionsstudien, da einzelne Gene in unterschiedlichen Zelltypen und Geweben variable Expressionsmuster und Transkriptabundanzen aufweisen können. Daher ist die Kenntnis der zellulären Zusammensetzung des in Genexpressionsstudien zu untersuchenden Probenmaterials eine wesentliche Voraussetzung für eine sinnvolle Interpretation der in den entsprechenden Proben vorhandenen Transkriptabundanzen (SHENORR et al., 2010). Auch für zellfunktionelle Analysen ist die Kenntnis der Gewebezusammensetzung von Bedeutung. Deshalb wurden zur Abschätzung der Variabilität der Gewebezusammensetzung einzelner Explants der bovinen Zitze in quantitativ stereologischen Untersuchungen die Volumenanteile unterschiedlicher Gewebe- und Zelltypen in Explants der FBR und der ZZ bestimmt.

1.1 Histopathologische Befunde

Die im Rahmen der quantitativ stereologischen Untersuchungen analysierten Explantgewebeproben wurden zunächst einer histopathologischen Untersuchung unterzogen. Diese ergab keine Hinweise auf organpathologische Alterationen, insbesondere nicht im Hinblick auf das Bestehen entzündlicher Veränderungen der Zitze (Befund vom Institut für Tierpathologie, Ludwig-Maximilians-Universität München). Die Anschnitte der Explants aus dem Bereich der FBR und der ZZ zeigten eine unauffällige Histomorphologie mit intaktem, z. T. gefältelem Oberflächenepithel, einem schmalen, gut vaskularisierten lockeren Saum subepithelialen Gewebes und dem darunter liegenden Binde- und Muskelgewebe der Zitzenwand (Abb. 13). Der überwiegende Anteil des in den Explants der Zitze enthaltenen Gewebes bestand aus Bindegewebe und glatter Muskulatur. Die Explants waren von einem zweischichtigen iso- bis hochprismatischen Schleimhautepithel bedeckt. Vor allem Explants aus dem Bereich der FBR wiesen z. T. mehrschichtiges Epithel auf (Abb. 13 B). Lichtmikroskopisch ließen sich in den Explants nur vereinzelte Anschnitte leukozytärer Zellen in bevorzugt subepithelialer Lokalisation nachweisen.

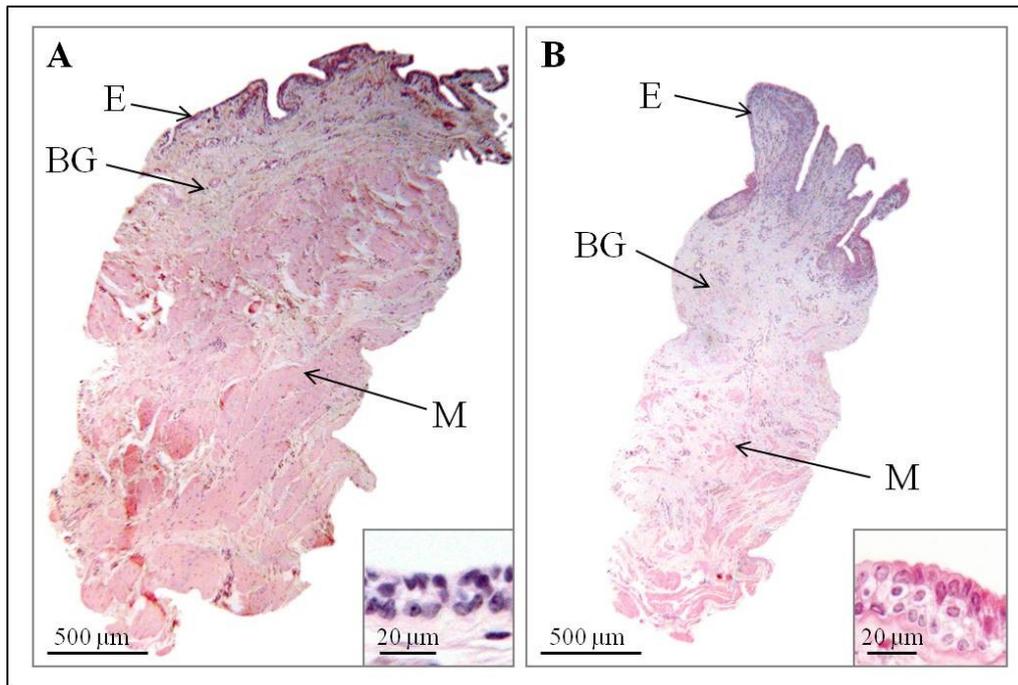


Abb. 13: **Histomorphologie von Explants der Zitze.** Die Explants der Zitze enthielten überwiegend Muskulatur (M) und Bindegewebe (BG) und waren von z. T. gefältelem Oberflächenepithel (E) bedeckt. Während das Epithel in Explants der ZZ zweischichtig iso- bis hochprismatischen war (A), wiesen Explants der FBR, neben dem meist zweischichtigen Epithel, z. T. mehrschichtiges Epithel auf (B). Paraffinschnitt, HE.

1.2 Immunhistochemische Untersuchungen

Die in Abschnitt III.3.4.3 beschriebene immunhistochemische Darstellung von Zytokeratin gestattete die zuverlässige Markierung epithelialer Zellen bei äußerst geringer unspezifischer Hintergrundfärbung (Abb. 14 A.1-3). Dies galt für die Schnittpräparate von in Paraffin eingebetteten Explants der Zitze und dem Positivkontrollgewebe (bovines Lebergewebe). Die immunhistochemische Darstellung von CD11a/18 in Schnittpräparaten von in Paraffin eingebettetem bovinem Lymphknotengewebe (Positivkontrollgewebe) führte bei geringer unspezifischer Hintergrundfärbung zu einer deutlichen Markierung von, vor allem in der Follikelperipherie gelegenen, Leukozyten (Abb. 14 B2). Die Anzahl der Anschnittprofile von Zellen mit positiver CD11a/18 Immunreaktivität in den immunhistochemischen Schnittpräparaten der Explants war äußerst gering. Die innerhalb der Explantschnitte befindlichen CD11a/18-positiv markierten Zellen fanden sich meist einzeln oder in kleinen Gruppen von bis zu 10 Zellanschnittprofilen angeordnet. Dabei lagen sie nahezu ausschließlich unmittelbar subepithelial. In sämtlichen Negativkontrollen war keine immunhistochemische Reaktivität feststellbar (Abb. 14 A.3, B.3).

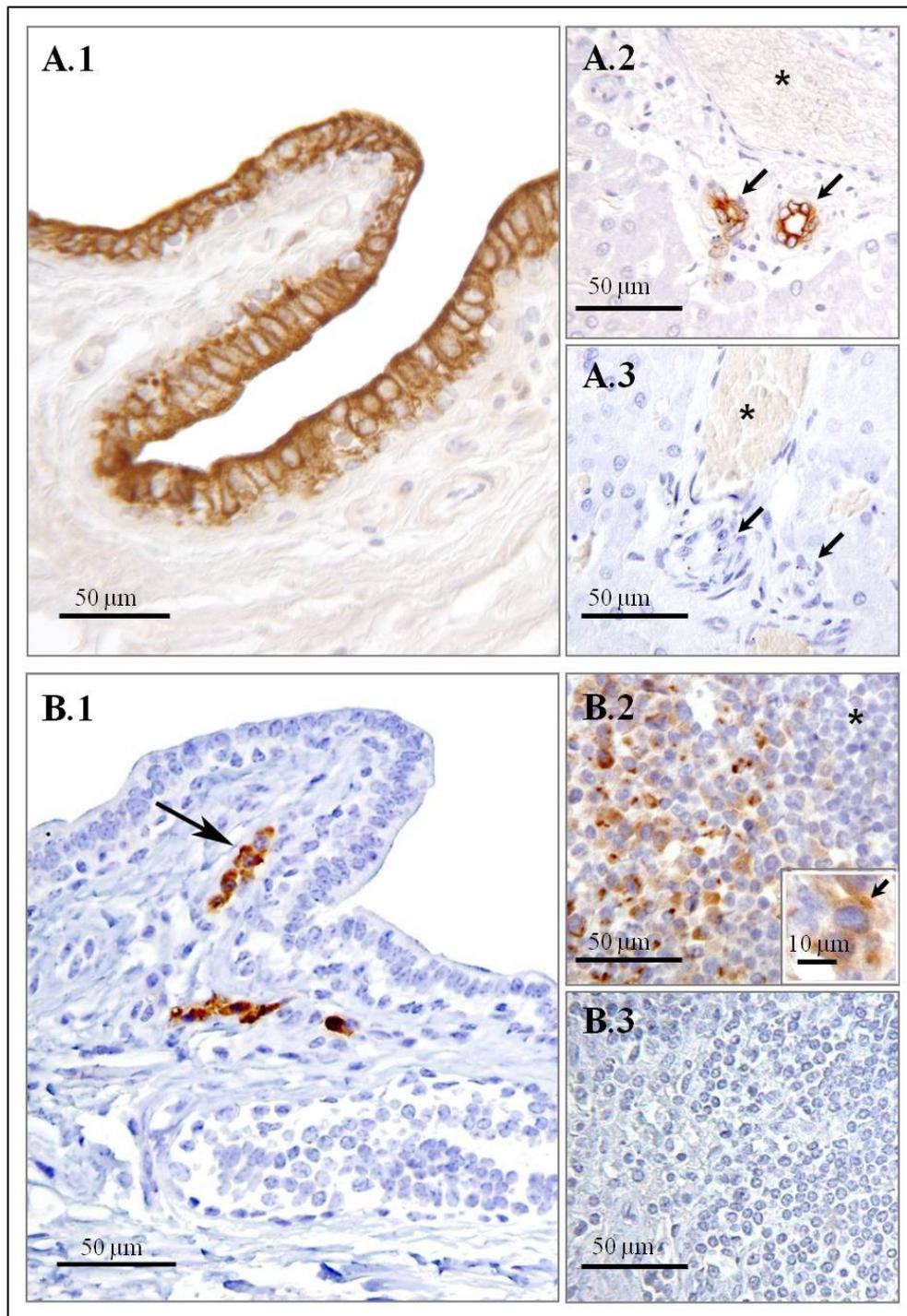


Abb. 14: **Immunhistochemischer Nachweis von Zytokeratin (A) und CD11a/18 (B).**
A.1: Explant der Zitzenzisterne; das Zytokeratin-positive Epithel stellt sich braun dar.
A.2: Positivkontrolle zu A.1 (Leber; die Pfeile weisen auf zytokeratin-positives Gallengangsepithel, Stern: Erythrozyten ohne Immunoreaktivität in einem venösen Lebergefäß).
A.3: Negativkontrolle (Leber) zu A.1 und A.2 (Verwendung eines irrelevanten Erstantikörpers).
B.1: Explant der Zitzenzisterne; die Anschnittprofile der CD11a/18-positiven Zellen stellen sich braun dar (Pfeil). Auf die subepitheliale Lokalisation der CD11a/18-positiven Zellanschnittprofile im Zitzenexplant sei hingewiesen
B.2: Positivkontrolle zu B.1 (Mediastinallymphknoten; der Pfeil im kleinen Bild weist auf einen CD11a/18-positiven Leukozyten, Stern: Lymphfollikel).
B.3: Negativkontrolle (Mediastinallymphknoten) zu B.1 und B.2 (Verwendung eines irrelevanten Erstantikörpers). Paraffinschnitte, Chromogen: DAB, Gegenfärbung: Hämalaun.

1.3 Quantitativ stereologische Untersuchungen

1.3.1 Volumenanteile des Bindegewebes und der Muskulatur in Explants der Fürstenberg'schen Rosette und der Zitenzisterne

In Explants der FBR betrug der MW \pm SD des Volumenanteils des Bindegewebes ($V_{V(BG/Exp)}$) 56 % \pm 5 % (CV = 9 %) und in Explants der ZZ 42 % \pm 7 % (CV = 17 %). Der Volumenanteil des Muskelgewebes ($V_{V(M/Exp)}$) in Explants der FBR betrug MW \pm SD: 25 % \pm 6 % (CV = 24 %). In Explants der ZZ lag der Volumenanteil des Muskelgewebes ($V_{V(M/Exp)}$) bei MW \pm SD: 40 % \pm 9 % (CV = 23 %). Die Volumenanteile von Bindegewebe ($V_{V(BG/Exp)}$) und Muskulatur ($V_{V(M/Exp)}$) wiesen zwischen den Explants der FBR und den Explants der ZZ einen signifikanten Unterschied auf ($p < 0,001$) (Abb. 15).

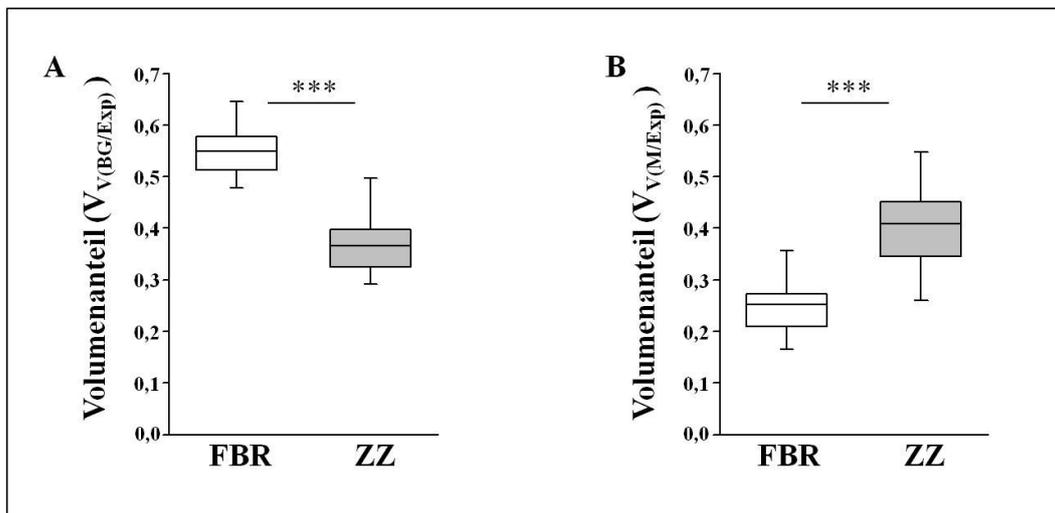


Abb. 15: **Volumenanteile der Gewebekompartimente Bindegewebe und Muskulatur in Explants aus Fürstenberg'scher Rosette (FBR) und Zitenzisterne (ZZ).** Dargestellt ist der Volumenanteil des Bindegewebes ($V_{V(BG/Exp)}$) (A) und der Volumenanteil der Muskulatur ($V_{V(M/Exp)}$) (B) in Explants der FBR und der ZZ. $n = 32$ Explants/FBR von 2 Tieren, $n = 32$ Explants/ZZ von 2 Tieren, *** = $p < 0,001$.

1.3.2 Volumenanteile des Epithels und der CD11a/18-positiven Zellen in Explants der Fürstenberg'schen Rosette und der Zitenzisterne

Der Volumenanteil des Epithels ($V_{V(E/Exp)}$) war in Explants ($n = 16$ pro Tier; 2 Tiere) der FBR mit MW \pm SD: 7 % \pm 4 % signifikant höher als in Explants der ZZ mit MW \pm SD: 4 % \pm 3 % ($p < 0,001$) (Abb. 16).

Die immunhistochemisch CD11a/18-positiven Zellen wiesen in den untersuchten Explants Volumendichten von wenigen Promille auf: So betrug in den Explants

der FBR die Volumendichte der immunhistochemisch CD11a/18-positiven Zellen ($V_{V(\text{CD11a/18 pos Z/Exp})}$) $\text{MW} \pm \text{SD}$: $0,03 \% \pm 0,02 \%$ und in den Explants der ZZ $\text{MW} \pm \text{SD}$: $0,007 \% \pm 0,006 \%$. Der Unterschied der Volumendichte der immunhistochemisch CD11a/18-positiven Zellen in den Explants der FBR und der ZZ war statistisch signifikant ($p < 0,01$) (Abb. 16).

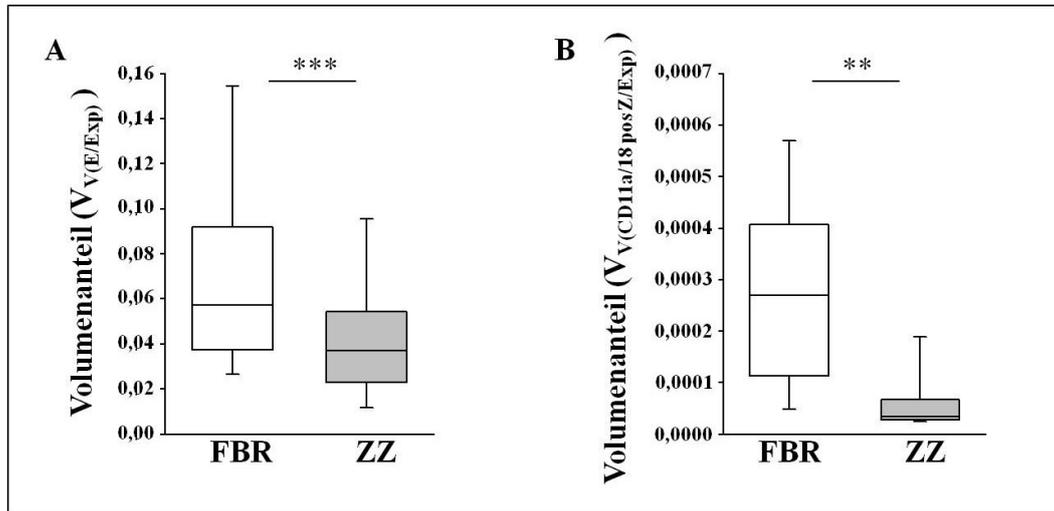


Abb. 16: **Volumenanteile von Epithel und CD11a/18-positiven Zellen in Explants der Fürstenberg'schen Rosette und der Zitenzisterne.** Dargestellt ist der Volumenanteil von Epithel ($V_{V(E/Exp)}$) in Explants der FBR und der ZZ (A) und der Volumenanteil von CD11a/18-positiven Zellen ($V_{V(\text{CD11a/18 pos Z/Exp})}$) in Explants der FBR und der ZZ (B). $n = 32$ Explants/FBR von 2 Tieren, $n = 32$ Explants/ZZ von 2 Tieren, *** = $p < 0,001$, ** = $p < 0,01$.

Die Volumendichte des Epithels ($V_{V(E/Exp)}$) und der CD11a/18-positiven Zellen ($V_{V(\text{CD11a/18 pos Z/Exp})}$) in einzelnen Explants der Zitze zeigten eine hohe relative Variabilität innerhalb eines und zwischen den vier Eutervierteln eines Tieres (Abb. 17). Der Variationskoeffizient (CV) der Volumendichte des Epithels in Explants der FBR betrug 57 %, in Explants der ZZ 75 %. Die Volumendichte der CD11a/18-positiven Zellen in Explants der FBR wies einen CV von 67 % und in Explants der ZZ einen CV von 86 % auf.

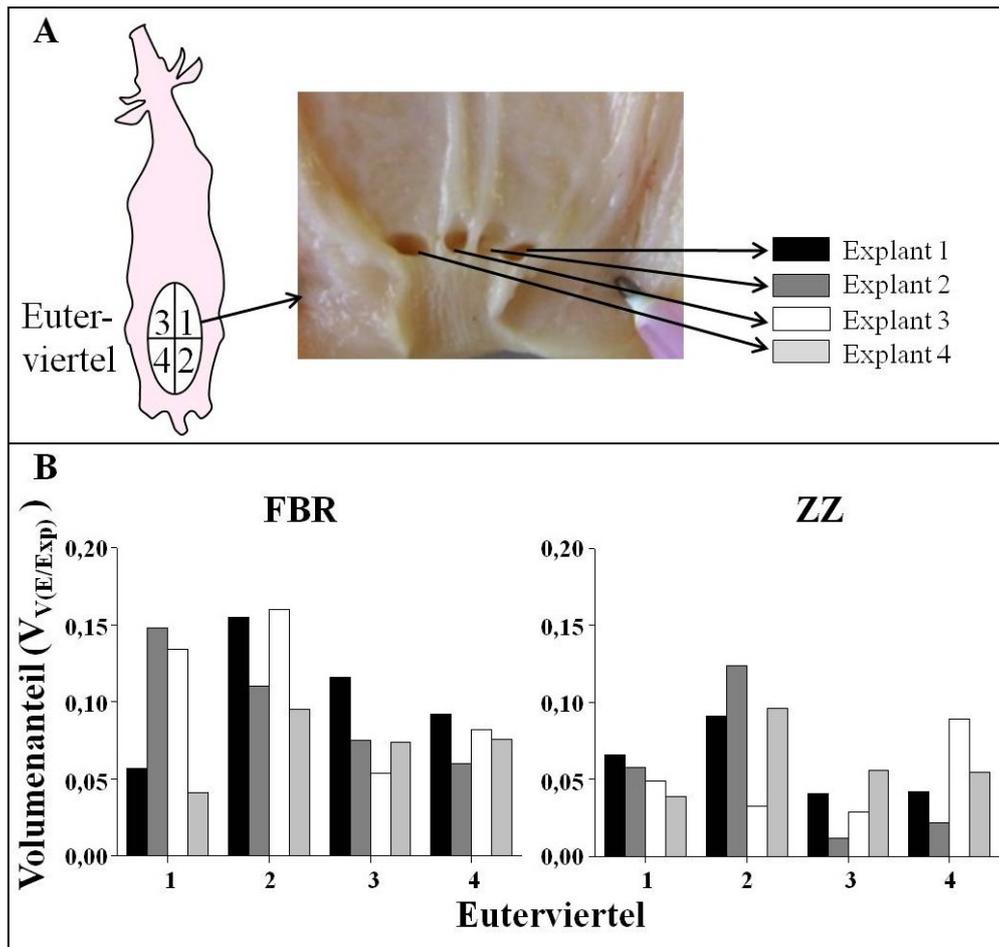


Abb. 17: **Exemplarische Darstellung der Volumendichten des Epithels in Explants der Zitze.** Dargestellt sind die Volumenanteile des Epithels ($V_{V(E/Exp)}$) in den einzelnen Explants der vier Euterviertel eines Tieres (A). Die Volumendichten ($V_{V(E/Exp)}$) zeigten eine hohe relative Streuung (CV in Explants der FBR = 57 %, CV in Explants der ZZ = 75 %) (B).

2 Molekularbiologische Untersuchungen

Erreger dringen über den Strichkanal in die Milchdrüse ein. Haben sie diese Barriere überwunden, treten sie als erstes mit dem Gewebe der FBR und der ZZ in Kontakt. Der Zitze kommt daher eine wichtige Bedeutung bei der ersten Erregerabwehr zu. Vor allem die FBR scheint an der Induktion früher immunologischer Reaktionen beteiligt zu sein. In Explants der FBR und der ZZ sollte daher die Expression proinflammatorischer Mediatoren nach LPS-Kontakt untersucht und zwischen den beiden Lokalisationen verglichen werden.

2.1 Methodische Vorarbeiten

Ein Ziel der methodischen Vorarbeiten war die Ermittlung der Vergleichbarkeit der Expression immunrelevanter Gene in nichtstimulierten Explants (Basisexpressionen) innerhalb eines Tieres nach 3-stündiger Inkubation bei 37°C und 5 % CO₂. Betrachtet wurden die Werte der einzelnen Explants einer Zitze und die Unterschiede zwischen den Werten der verschiedenen Lokalisationen FBR, ZZ und Parenchym.

2.1.1 Chemokine und Zytokine

Trotz Gleichbehandlung aller Explants zeigte sich insgesamt eine hohe Heterogenität in der mRNA-Basisexpression der Chemokine und Zytokine in einzelnen Explants (Tab. 11, CV und Abb. 18).

Tab. 11: Basisexpression immunrelevanter Gene (Anzahl mRNA-Kopien bei 200 ng cDNA) in Explants der Zitze eines Tieres (n = 16 Explants/Lokalisation).

Gen	Lokalisation	MW	SD	Signifikanz	CV
IL-8/CXCL8	FBR	623	307	a	49 %
	ZZ	388	351	ab	90 %
	Parenchym	211	246	b	117 %
RANTES/CCL5	FBR	265	185	a	70 %
	ZZ	503	454	a	90 %
	Parenchym	699	699	a	100 %
MIP-3 α /CCL20	FBR	340.619	1.263.611	a	371 %
	ZZ	7.377	8.791	b	119 %
	Parenchym	145	166	b	114 %
TNF- α	FBR	7.232	3.873	a	54 %
	ZZ	6.094	8.663	a	142 %
	Parenchym	2.345	3.131	a	134 %
IL-1 β	FBR	542	584	a	108 %
	ZZ	46	83	b	181 %
	Parenchym	176	259	b	147 %

FBR = Fürstenberg'sche Rosette, ZZ = Zitzenzisterne, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, CV = Variationskoeffizient, IL-8/CXCL8 = Interleukin 8/CXC-Chemokin 8, RANTES/CCL5 = regulated on activation normal T cell expressed and secreted/CC-Chemokin 5, MIP-3 α /CCL20 = Macrophage inflammatory protein-3 α /CC-Chemokin 20, TNF- α = Tumor-Nekrose-Faktor- α , IL-1 β = Interleukin 1 β ; unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede (p < 0,05).

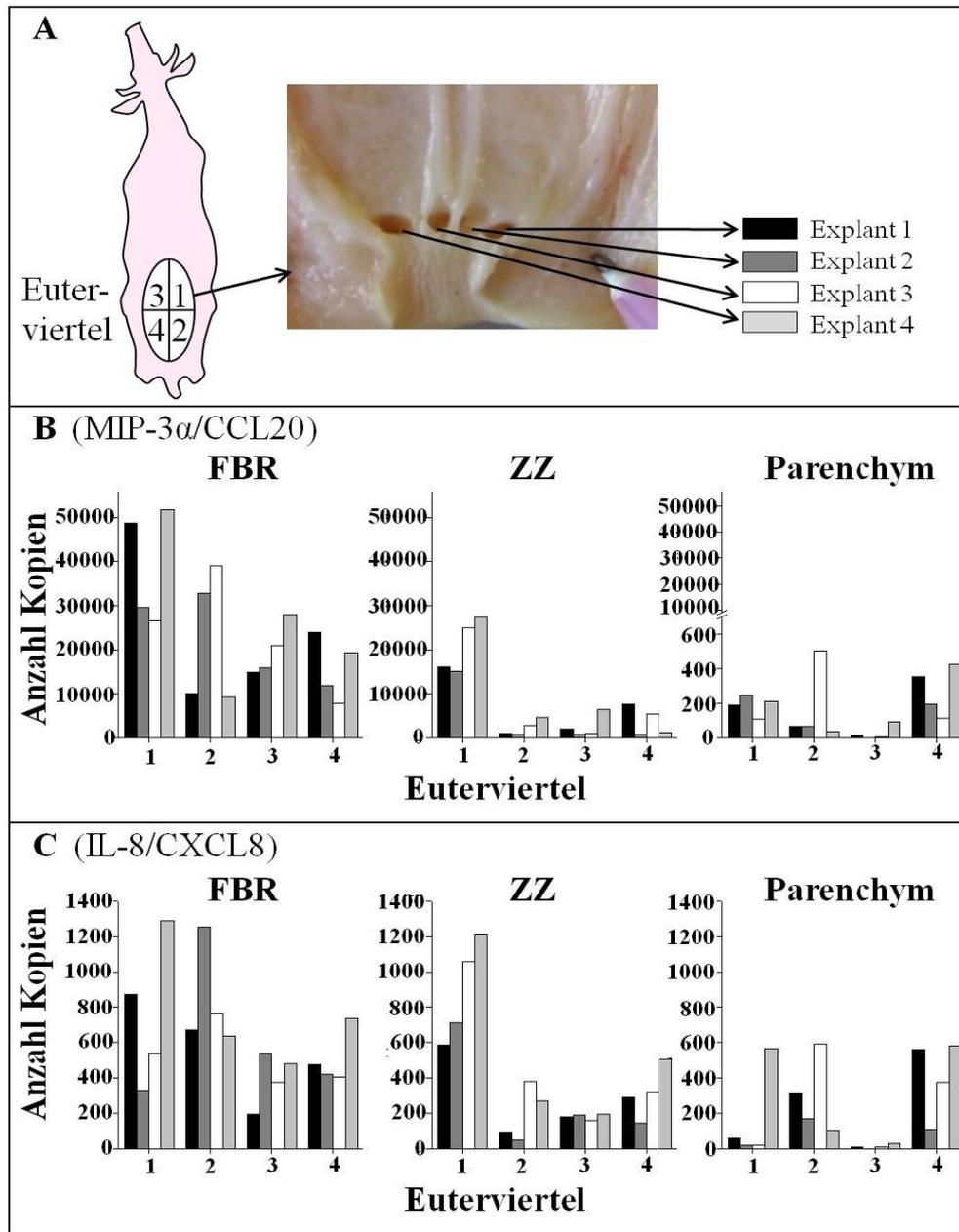


Abb. 18: **Vergleich der Basisexpression ausgewählter Chemokine in Explants der Zitze und des Parenchyms.** In einem Vorversuch wurde die mRNA-Expression in Explants nach 3 h Inkubation in Kulturmedium, ohne Zugabe von LPS, untersucht. Das Probenmaterial stammte aus einem Tier (A). Verglichen wurde die Anzahl an mRNA-Kopien in den einzelnen Explants der FBR, der ZZ und des Parenchyms der vier Viertel. Dargestellt ist die mRNA-Expression der Chemokine MIP-3 α /CCL20 (B) und IL-8/CXCL8 (C) in der Anzahl der Kopien bei 200 ng cDNA. n = 16 Explants/FBR, n = 16 Explants/ZZ, n = 16 Explants/Parenchym.

Mit Ausnahme des Chemokins MIP-3 α /CCL20 war die Heterogenität in Explants der FBR weniger stark ausgeprägt als in Explants der ZZ und des Parenchyms. Die Transkriptabundanz des Chemokins RANTES/CCL5 und des Zytokins TNF- α zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Explants der verschiedenen Lokalisationen. Die mRNA-Basisexpression von MIP-3 α /CCL20

und IL-1 β war in Explants der FBR signifikant höher als in Explants der ZZ und des Parenchyms. Bei dem Chemokin IL-8/CXCL8 bestand lediglich ein signifikanter Unterschied zwischen den Transkriptabundanz in Explants der FBR und des Parenchyms ($p < 0,05$) (Tab. 11).

Ein weiteres Ziel der methodischen Vorarbeiten war die Ermittlung der Vergleichbarkeit der Expression von immunrelevanten Genen in den Explants eines weiteren Tieres nach Inkubation mit 20 $\mu\text{g/mL}$ LPS von *E. coli* O111:B4 (Sigma) (III.2.9.3) für 3 h (37°C, 5 % CO₂). Verglichen wurden wiederum die Werte der einzelnen Explants eines Euterviertels untereinander und die Unterschiede zwischen den Werten verschiedener Lokalisationen.

Tab. 12: Expression immunrelevanter Gene (Anzahl mRNA-Kopien bei 200 ng cDNA) in Explants der Zitze eines Tieres nach Stimulation (3 h, 37°C, 5 % CO₂) mit 20 $\mu\text{g/mL}$ LPS von *E. coli* ($n = 16$ Explants/Lokalisation).

Gen	Lokalisation	MW	SD	Signifikanz	CV
IL-8/CXCL8	FBR	106.767	71.103	a	67 %
	ZZ	101.032	127.547	a	126 %
	Parenchym	114.709	113.890	a	99 %
RANTES/CCL5	FBR	18.184	21.369	a	118 %
	ZZ	4.497	7.634	a	170 %
	Parenchym	15.921	23.717	a	149 %
MIP-3 α /CCL20	FBR	5.207.847	4.158.802	a	80 %
	ZZ	277.803	494.996	b	178 %
	Parenchym	36.301	33.694	b	93 %
TNF- α	FBR	22.604	31.657	a	140 %
	ZZ	1.553	1.543	b	99 %
	Parenchym	5.263	5.126	b	97 %
IL-1 β	FBR	5.358	4.708	a	88 %
	ZZ	424	657	b	155 %
	Parenchym	3.799	3.572	a	94 %

FBR = Fürstenberg'sche Rosette, ZZ = Zitzenzisterne, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, CV = Variationskoeffizient, IL-8/CXCL8 = Interleukin 8/CXC-Chemokin 8, RANTES/CCL5 = regulated on activation normal T cell expressed and secreted/CC-Chemokin 5, MIP-3 α /CCL20 = Macrophage inflammatory protein-3 α /CC-Chemokin 20, TNF- α = Tumor-Nekrose-Faktor- α , IL-1 β = Interleukin 1 β ; unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$).

Auch nach Stimulation mit 20 µg/mL LPS von *E. coli* zeigten die einzelnen Explants eine starke Heterogenität (Tab. 12, CV). Die Transkriptabundanz der Chemokine IL-8/CXCL8 und RANTES/CCL5 zeigten nach LPS-Stimulation keinen signifikanten Unterschied zwischen den Explants der unterschiedlichen Lokalisationen. Das Chemokin CCL20/MIP-3α und das Zytokin TNF-α wurden in Explants der FBR signifikant höher exprimiert als in Explants der ZZ und des Parenchyms. Das Zytokin IL-1β wurde in Explants der ZZ signifikant niedriger exprimiert als in Explants der FBR und des Parenchyms ($p < 0,05$) (Tab. 12).

2.1.2 S100-Proteine

Die Genexpressionen der S100-Proteine in Explants der Zitze wurden unter den gleichen Aspekten betrachtet wie im vorhergehenden Kapitel die proinflammatorischen Zytokine und Chemokine. Die Basisexpression der S100-Proteine war ebenfalls heterogen (Tab. 13, CV). Alle untersuchten S100-Proteine zeigten eine signifikant höhere Basisexpression in Explants der FBR im Vergleich zu Explants der ZZ und des Parenchyms ($p < 0,05$) (Tab. 13 und Abb. 19).

Tab. 13: Basisexpression von S100-Proteinen (Anzahl mRNA-Kopien bei 200 ng cDNA) in Explants der Zitze eines Tieres ($n = 16$ Explants/Lokalisation).

Gen	Lokalisation	MW	SD	Signifikanz	CV
S100A8	FBR	189.838	252.959	a	133 %
	ZZ	558	682	b	122 %
	Parenchym	2.453	3.693	b	151 %
S100A9	FBR	844.191	997.608	a	118 %
	ZZ	9.754	8.114	b	83 %
	Parenchym	2.528	3.069	b	121 %
S100A12	FBR	664.772	477.616	a	72 %
	ZZ	2.536	3.009	b	119 %
	Parenchym	564	699	b	124 %

FBR = Fürstenberg'sche Rosette, ZZ = Zitenzisterne, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, CV = Variationskoeffizient; unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$).

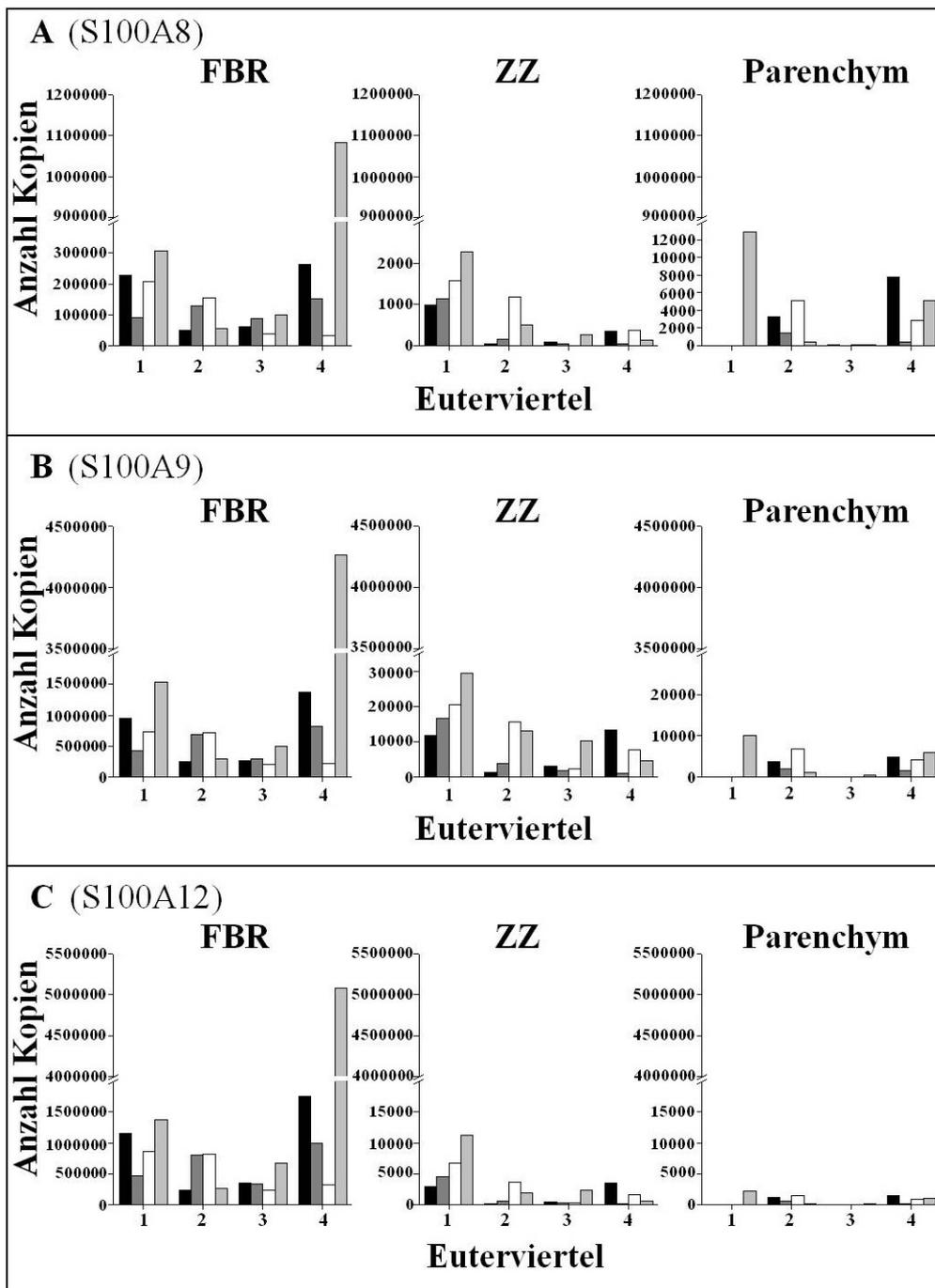


Abb. 19: Vergleich der Basisexpression von S100-Proteinen in Explants der Zitze und des Parenchyms. Verglichen wurde die Anzahl an mRNA-Kopien in den einzelnen Explants der vier Euterviertel in der FBR, der ZZ und dem Parenchym. Dargestellt ist die mRNA-Expression von S100A8 (A), S100A9 (B) und S100A12 (C) in der Anzahl der Kopien bei 200 ng cDNA. n = 16 Explants/FBR, n = 16 Explants/ZZ, n = 16 Explants/Parenchym eines Tieres.

Die Expression der S100-Proteine im Gewebe der Explants zeigte ebenfalls auch nach Stimulation mit 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS eine hohe Heterogenität (Tab. 14, CV). In den Explants der FBR wurden die höchsten Transkriptabundanz der S100-Proteine gemessen. So wurden die Calgranuline S100A8 und S100A9 in Explants

der FBR signifikant höher exprimiert als in Explants der ZZ und des Parenchyms ($p < 0,05$). Die Unterschiede der Transkriptabundanzen von S100A12 in Explants der verschiedenen Lokalisationen waren nicht statistisch signifikant (Tab. 14).

Tab. 14: Expression von S100-Proteinen (Anzahl mRNA-Kopien bei 200 ng cDNA) in Explants der Zitze eines Tieres nach Stimulation (3 h, 37°C, 5 % CO₂) mit 20 µL/mL LPS von *E. coli* (n = 16 Explants/Lokalisation).

Gen	Lokalisation	MW	SD	Signifikanz	CV
S100A8	FBR	176.845	205.102	a	116 %
	ZZ	26.174	53.713	b	205 %
	Parenchym	9.328	17.289	b	185 %
S100A9	FBR	356.538	279.023	a	78 %
	ZZ	69.734	113.269	b	162 %
	Parenchym	49.610	85.792	b	173 %
S100A12	FBR	93.615	101.759	a	109 %
	ZZ	13.250	22.085	a	167 %
	Parenchym	4.425	6.960	a	157 %

FBR = Fürstenberg'sche Rosette, ZZ = Zitzenzisterne, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, CV = Variationskoeffizient; unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$).

Die quantitativ stereologischen Untersuchungen der Volumendichten verschiedener Gewebe- und Zellkompartimente in Explants der Zitze haben gezeigt, dass die Volumendichten von Epithel und CD11a/18-positiven Zellen in Explants der Zitze eine hohe relative Streuung aufweisen (IV.1.3.2). Der daraufhin durchgeführte Vergleich der Expression von immunrelevanten Genen in einzelnen Explants der Zitze und des Parenchyms ergab eine hohe Heterogenität der Transkriptabundanzen der untersuchten Gene in den einzelnen Explants (IV.2.1). Daraus folgend wurden in den Expressionsstudien des Hauptversuchs keine Einzelbestimmungen durchgeführt, sondern „gepoolte“ Proben (je 2 Explants/Lokalisation/Kontrolle sowie je 2 Explants/Lokalisation/LPS-Stimulation) ausgewertet (Abb. 7).

2.2 Expressionsstudien - Hauptversuch

Die mRNA-Expressionsstudien wurden an Explants von 22 Vierteln von sechs Tieren nach der in Kapitel III.3.5 beschriebenen Methode durchgeführt. Zwei Viertel wurden von der molekularbiologischen Untersuchung ausgeschlossen, da die Milchproben der entsprechenden Viertel bei der bakteriologischen Untersuchung Keimwachstum aufwiesen (Tab. 4).

Verglichen wurden die Expressionen ausgewählter Gene in Explants nach 3-stündiger Inkubation ohne LPS (Kontrolle) und in Explants nach 3-stündiger Inkubation (37°C, 5 % CO₂) mit 1 µg/mL LPS von *E. coli* 1303 (III.2.9.3). Dabei wurden die Genexpressionen in Explants der FBR und in Explants der ZZ getrennt betrachtet. Des Weiteren wurde die Anzahl der Transkripte in Explants der FBR und die Anzahl der Transkripte in Explants der ZZ gegenübergestellt. Dieser Vergleich wurde sowohl für die Werte der Explants nach Inkubation ohne LPS als auch für die Werte der Explants nach Stimulation mit LPS von *E. coli* 1303 durchgeführt. Messenger-RNA-Kopienzahlen, die unterhalb von 110 lagen, wurden mit 0 gleichgesetzt, da Werte in diesem Bereich nicht mit Sicherheit auf tatsächlich vorhandene Genexpression zurückgeführt werden können.

2.2.1 Chemokine und Zytokine

Die Berechnung eines gemischten Tests (ProcMIXED), bei dem auf wiederholte Messungen innerhalb eines Tieres korrigiert wird, mit dem Statistikprogramm SAS, Version 9.2 ergab für alle Chemokine und das Zytokin TNF- α einen signifikanten Unterschied ($p < 0,001$) zwischen der Genexpression in Explants der Zitze ohne Stimulation und nach Stimulation mit LPS von *E. coli* 1303. (Abb. 20). So zeigte das Chemokin RANTES/CCL5 sowohl in Explants der FBR als auch in Explants der ZZ nach Stimulation mit 1 µg/mL LPS von *E. coli* 1303 eine signifikant höhere Genexpression als in Explants, die nicht mit LPS inkubiert wurden. Zwischen der Genexpression in Explants der FBR und der ZZ lag kein signifikanter Unterschied vor (Abb. 20 A). Das Chemokin MIP-3 α /CCL20 zeigte ebenfalls sowohl in Explants der FBR als auch in Explants der ZZ nach der LPS-Stimulation eine signifikant höhere Genexpression als in Explants, die nicht mit LPS inkubiert wurden. Dabei wies es sowohl ohne als auch mit LPS-Stimulation in Explants der FBR signifikant höhere Transkriptabundanzen auf als in Explants der ZZ ($p < 0,001$) (Abb. 20 B). Die Genexpression des Chemokins IL-8/CXCL8 war sowohl in Explants der FBR als auch in Explants der ZZ nach Stimulation

mit 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS von *E. coli* 1303 signifikant höher als in Explants, die nicht mit LPS inkubiert wurden. Es lag kein signifikanter Unterschied der Transkript-abundanzen in Explants der FBR und der ZZ vor (Abb. 20 C). Auch das Zytokin TNF- α zeigte in Explants der FBR und in Explants der ZZ nach Stimulation mit 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS von *E. coli* 1303 eine signifikant höhere Expression als in Explants, die nicht mit LPS inkubiert wurden. In den unstimulierten Explants der FBR wurde TNF- α signifikant stärker exprimiert als in den unstimulierten Explants der ZZ ($p < 0,05$). Bei den stimulierten Explants lag kein signifikanter Unterschied zwischen den Lokalisationen vor. (Abb. 20 D).

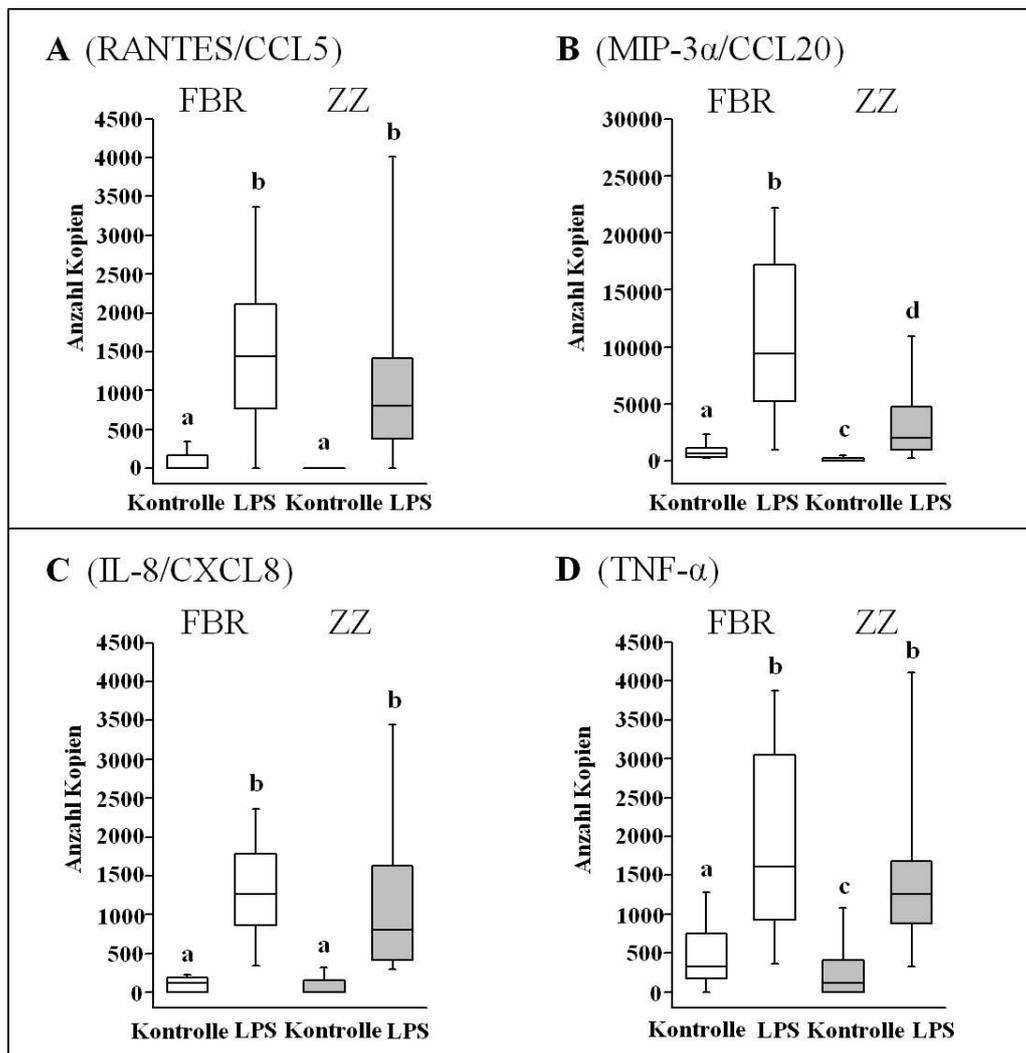


Abb. 20: **Genexpression ausgewählter Chemokine und Zytokine in Explants der Fürstenberg'schen Rosette und der Zitzenzisterne.** Dargestellt ist die mRNA-Expression in der Anzahl der Kopien bei 200 ng cDNA für die Chemokine RANTES/CCL5 (A), MIP-3 α /CCL20 (B) und IL-8/CXCL8 (C), sowie für das Zytokin TNF- α (D) in Explants der FBR (weiß) und in Explants der ZZ (grau) nach Stimulation mit 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS von *E. coli* 1303 (LPS) und in Explants, die ohne LPS inkubiert wurden (Kontrolle). $n = 22$ Viertel von 6 Tieren, unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ($p < 0,001$).

Die mRNA des Zytokins IL-1 β wurde in Explants der Zitze praktisch nicht nachgewiesen und das Ergebnis deshalb nicht graphisch dargestellt. In unstimulierten Explants betrug der Mittelwert \pm SD sowohl in Explants der FBR als auch der ZZ $0,0 \pm 0,0$ mRNA-Kopien. Nach LPS-Stimulation erfolgte ein leichter Expressionsanstieg (MW \pm SD in Explants der FBR: $195,7 \pm 180,8$ mRNA-Kopien und in Explants der ZZ: $106,3 \pm 106,2$ mRNA-Kopien).

2.2.2 S100-Proteine

Für die S100-Proteine zeigte sich, dass im Bereich der FBR kein signifikanter Unterschied in der Höhe der Genexpression in Explants ohne LPS- und in Explants nach LPS-Stimulation vorlag (Abb. 21). Im Gewebe der ZZ hingegen stellte sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Genexpression von S100A8, S100A9 und S100A12 in Explants ohne LPS-Stimulation und Explants, die mit LPS inkubiert wurden, dar. Alle drei S100-Proteine wurden in dieser Lokalisation nach LPS-Stimulation signifikant stärker exprimiert ($p \leq 0,001$) (Abb. 21). Bei allen drei S100-Proteinen war zudem ein signifikanter Expressionsunterschied zwischen Explants der FBR und Explants der ZZ zu beobachten. In der FBR wurden die S100-Proteine signifikant stärker exprimiert als in der ZZ ($p < 0,001$). Dies zeigte sich sowohl in Explants, die nicht mit LPS stimuliert wurden, als auch in Explants nach LPS-Stimulation (Abb. 21).

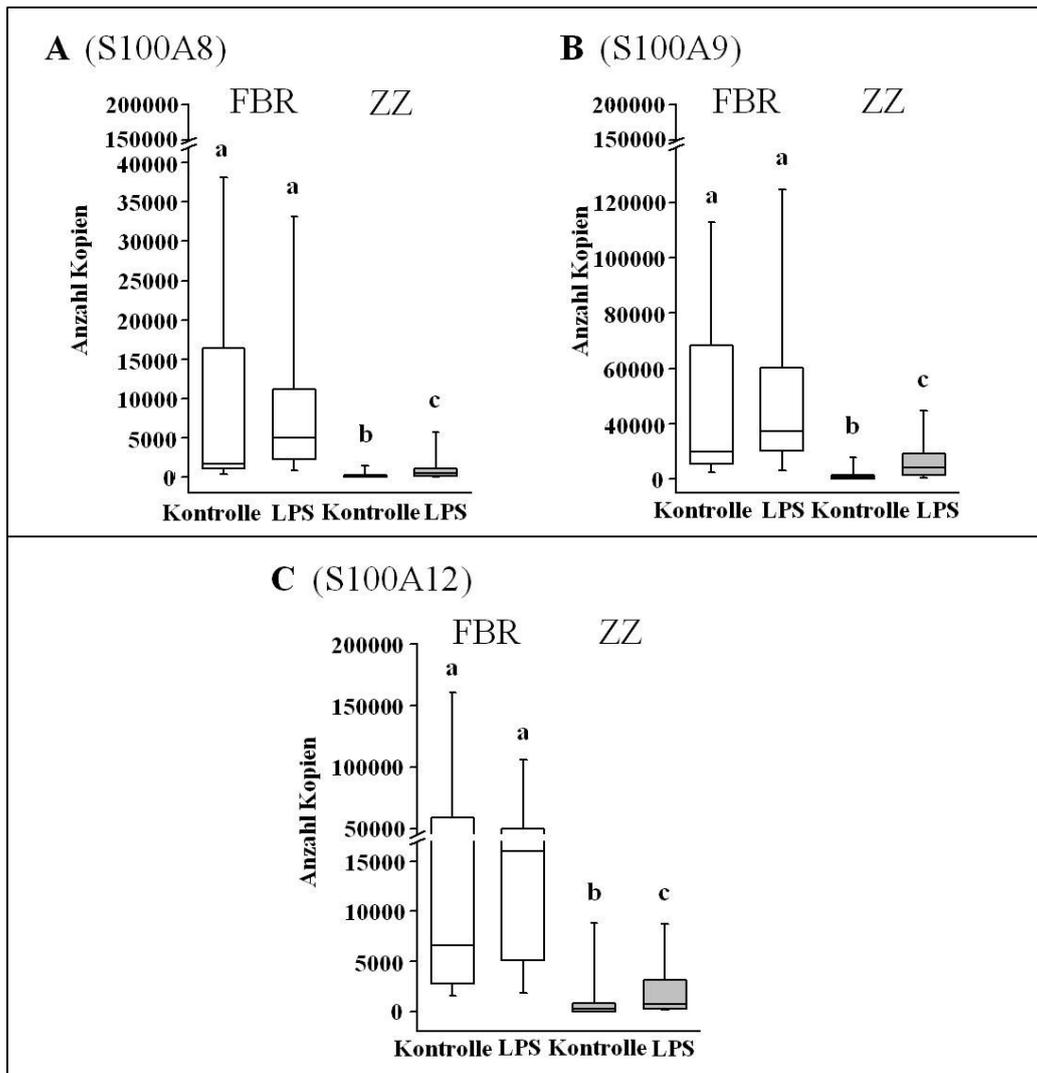


Abb. 21: **Genexpression von S100-Proteinen in Explants der Fürstenberg'schen Rosette und der Zitenzisterne.** Dargestellt ist die mRNA-Expression in der Anzahl der Kopien bei 200 ng cDNA für S100A8 (A), S100A9 (B) und S100A12 (C) in Explants der FBR (weiß) und in Explants der ZZ (grau) nach Stimulation mit 1 µg/mL LPS von *E. coli* 1303 (LPS) und in Explants, die ohne LPS inkubiert wurden (Kontrolle). n = 22 Viertel von 6 Tieren, unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ($p < 0,001$).

3 Funktionelle Untersuchungen

In funktionellen Tests an Explants sollte in der Transmigrationskammer überprüft werden, ob Zitzengewebe nach LPS-Stimulation chemotaktische Faktoren bildet und in das Kulturmedium sezerniert, welche dann PMN zur aktiven Durchwanderung einer Porenmembran anregen. Die Erfassung der Anzahl der in Chemotaxis gebrachten PMN erfolgte durchflusszytometrisch und mit Hilfe der Software FCS Express V3. Anschließend wurde der Anteil der gewanderten Zellen mit einem computergestützten Tabellenkalkulationsprogramm (Microsoft ExcelTM) ermittelt. Der Mittelwert (MW) \pm SD der PMN-Migrationsrate aller Positivkontrollen betrug 74 % \pm 11 % (CV = 14 %). Diese Migrationsrate der PMN, die bei einer IL-8-Konzentration von 100 ng/mL (Positivkontrolle) auftrat, wurde mit 100 % gleichgesetzt (III.3.6.5). Die Werte der Transmigrationsrate auf Explantkulturüberstände stehen also in Relation zur jeweiligen Positivkontrolle jeder Transmigrationskammer.

3.1 Chemotaxis neutrophiler Granulozyten

Die Untersuchungen zur PMN-Chemotaxis (III.3.6.3) wurden mit Explants aus 20 Eutervierteln von 5 Kühen (Tab. 5) durchgeführt. Es zeigte sich, dass Überstände von Explants, die nicht mit LPS stimuliert wurden, gar nicht oder kaum PMN lockten, während die Überstände der mit 1 μ g/mL LPS von *E. coli* 1303 stimulierten Explants die PMN stark zur Wanderung anregten (Abb. 22).

So unterschieden sich die relativen Migrationsraten von PMN bei Einsetzen von Überständen unstimulierter Explants aus FBR und ZZ und bei Einsetzen von Überständen nach LPS-Stimulation signifikant ($p < 0,001$). Zwischen den relativen Migrationsraten induziert durch Kulturüberstände von Explants der FBR und von Explants der ZZ bestand kein signifikanter Unterschied (Abb. 22).

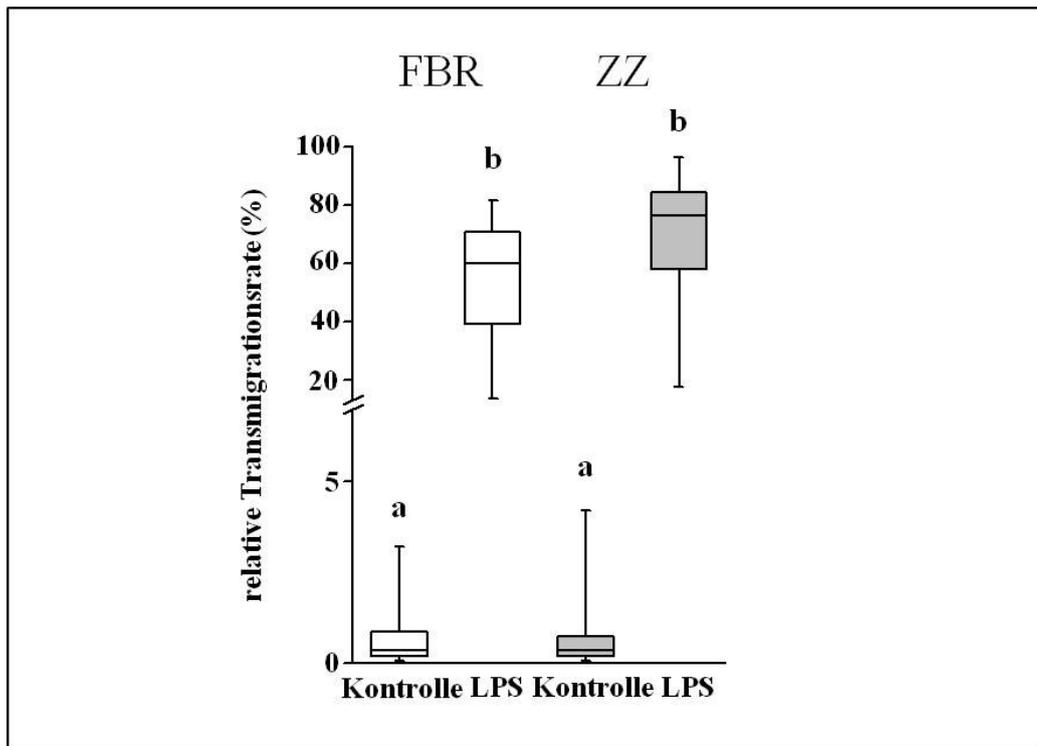


Abb. 22: **In-vitro-Migration neutrophiler Granulozyten induziert durch Kulturüberstände unstimulierter (Kontrolle) und LPS-stimulierter Explants (LPS).** Explants der FBR (weiß) und der ZZ (grau) wurden für 18 h mit 1 µg/mL LPS von *E. coli* 1303 stimuliert. Die Migrationsraten auf 100 ng/mL IL-8 wurden gleich 100 % gesetzt und die Migrationsraten auf die Kulturüberstände darauf bezogen (relative Transmigrationsraten in %). n=20 Viertel von 5 Tieren, unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ($p < 0,001$).

Die chemotaktische Potenz der verschiedenen Explants unterschied sich sehr stark. Relativ zur Positivkontrolle (100 ng/mL IL-8; 100 %) schwankten die Migrationsraten bei Einsatz der Kulturüberstände von unstimulierten Explants der FBR zwischen 0,04 und 10,63 % (CV: 147 %), bei Einsatz der Überstände von unstimulierten Explants der ZZ zwischen 0,02 und 28,03 % (CV: 293 %). Bei Einsatz der Kulturüberstände LPS-stimulierter Explants der FBR lagen die Migrationsraten zwischen 7,49 % und 85,19 % (CV: 38 %) und bei Überständen von LPS-stimulierten Explants der ZZ zwischen 13,79 % und 105,34 % (CV: 35 %). Die Werte zeigten vor allem innerhalb der einzelnen Tiere hohe Schwankungen.

3.2 IL-8-Konzentration in Überständen von Explantkulturen

Um zu überprüfen, ob Explants das Chemokin IL-8/CXCL8 bilden wurden Überstände aus der Explantkultur, wie in Kapitel III.3.7 beschrieben, mittels ELISA auf dessen Gehalt untersucht.

Der IL-8-ELISA wurde in verschiedenen Ansätzen durchgeführt (III.3.7). Die nachgewiesenen IL-8-Konzentrationen waren sehr gering und lagen zum Teil unter der vom Hersteller angegebenen mittleren Nachweisgrenze von 3,5 pg/mL (0-Standard + 2 SD). In allen Versuchsansätzen waren die mittleren Konzentrationen in Überständen stimulierter Explants höher als in Überständen unstimulierter Explants. Bei einer Stimulation der Explants mit 20 µg/mL LPS von *E. coli* O111:B4 über 3 h und einer Inkubationszeit des Primärantikörpers über 16 h bei 4°C konnte dieser Effekt statistisch gesichert werden ($p < 0,05$). Die Messungen wurden in Duplikaten pro Ansatz durchgeführt. Dabei war eine relativ starke Variabilität der Messwerte zu beobachten (Tab. 15).

Tab. 15: IL-8-Konzentration in Überständen von Explants der FBR und der ZZ.

Stimulation der Explants mit 20 µg/mL LPS von <i>E. coli</i> O111:B4; Probe: 50 µL Überstand; Inkubationszeit Primärantikörper: 2 h, RT; Werte aus Einzelansätzen				
Lokalisation	Stimulation	IL-8 (pg/mL) Mittelwert ± Standardabweichung	n	Signifikanz
FBR	Kontrolle	6,4 ± 3,9	8	n.s.
	20 µg/mL LPS	9,6 ± 4,7	8	
ZZ	Kontrolle	7,8 ± 6,5	8	n.s.
	20 µg/mL LPS	9,4 ± 6,2	8	
Stimulation der Explants mit 20 µg/mL LPS von <i>E. coli</i> O111:B4; Probe: 100 µL Überstand; Inkubationszeit Primärantikörper: 16 h, 4°C; Mittelwerte aus Doppelansätzen				
FBR	Kontrolle	0,8 ± 0,6	4	$p < 0,05$
	20 µg/mL LPS	7,2 ± 2,5	4	
Stimulation der Explants mit 1 µg/mL LPS von <i>E. coli</i> 1303; Probe: 100 µL Überstand; Inkubationszeit Primärantikörper: 16 h, 4°C; Mittelwerte aus Doppelansätzen				
FBR	Kontrolle	2,2 ± 1,0	8	n.s.
	1 µg/mL LPS	4,5 ± 3,2	8	
ZZ	Kontrolle	1,5 ± 1,9	6	n.s.
	1 µg/mL LPS	2,0 ± 1,1	6	

FBR = Fürstenberg'sche Rosette, ZZ = Zitenzisterne, RT = Raumtemperatur, LPS von *E. coli* O111:B4 = Lipopolysaccharid von *Escherichia coli* (Sigma Aldrich), LPS von *E. coli* 1303 = hochaufgereinigtes Lipopolysaccharid eines *Escherichia coli*-Versuchstamms (AG Holst, Borstel), n.s. = nicht signifikant.

V. DISKUSSION

Mit seiner äußeren Öffnung stellt der Strichkanal der Zitze die Verbindung zur Außenwelt dar. Die Zitze bildet somit als distales anatomisches Kompartiment des Euters eine wichtige Barriere gegen eindringende Erreger. Dem Gewebe des Strichkanals, der FBR und der ZZ kommt dabei eine besondere Bedeutung zu, da hier bei einer Infektion der erste direkte Kontakt des ascendierenden Pathogens mit dem Wirtsgewebe stattfindet. Im Folgenden werden die Etablierung eines Explantkultur-Modells der bovinen Zitze und dessen Eignung zur Untersuchung immunologischer Fragestellungen bei der frühen Erreger-Wirt-Interaktion im distalen Milchdrüsenkompartiment diskutiert.

1 Volumenanteile verschiedener Gewebe- und Zelltypen in Explants der bovinen Zitze

Die Ergebnisse qRT-PCR-basierter Genexpressionsstudien an biologischen Proben sind grundsätzlich von der zellulären Zusammensetzung des untersuchten Probenmaterials abhängig, da einzelne Gene in unterschiedlichen Zelltypen und Geweben variable Expressionsmuster bzw. Transkriptabundanzen aufweisen können. Die Kenntnis der zellulären Zusammensetzung des im Rahmen von Genexpressionsstudien zu untersuchenden Probenmaterials ist daher eine wesentliche Voraussetzung für eine sinnvolle Interpretation der in den entsprechenden Proben vorhandenen Transkriptabundanzen (SHEN-ORR et al., 2010). Zur Abschätzung der Variabilität der morphologischen Gewebezusammensetzung wurden in der vorliegenden Arbeit die Volumenanteile unterschiedlicher Gewebe- und Zelltypen in Explants der Zitze durch quantitativ stereologische Untersuchungen ermittelt. Diese Analysen wurden an einer für das Gesamtkollektiv der in den qRT-PCR-Analysen untersuchten Proben repräsentativen Anzahl von Explants ($n = 64$) aus dem Bereich der ZZ und der FBR von zwei klinisch eutergesunden Kühen durchgeführt. Die histopathologische Untersuchung der entsprechenden Explants (IV.1.1) ergab dabei keine Hinweise auf organpathologische Alterationen, insbesondere nicht im Hinblick auf das Bestehen entzündlicher Veränderungen der Zitze.

Zur Bestimmung der Volumenanteile unterschiedlicher Gewebe- und Zelltypen in Zitzenexplants wurden Serienschritte mit äquidistanten Abständen angefertigt (III.3.4.4). Diese Serienschritte wurden über die gesamte Höhe jedes einzelnen Explants ausgeführt. Die Flächenanteile der untersuchten Gewebe- und Zellkompartimente an der Gesamtfläche des Explants wurden in jedem 31. Serienschritt ($V_{V(BG/Exp)}$ und $V_{V(M/Exp)}$), 62. Serienschritt ($V_{V(E/Exp)}$) und 63. Serienschritt ($V_{V(CD11a/18\ pos\ Z/Exp)}$) über die gesamte Höhe des Explants ermittelt. Damit wird dem Umstand einer möglicherweise ungleichen Flächendichte der zu untersuchenden Kompartimente in verschiedenen Schnittebenen des Explants Rechnung getragen. Durch das beschriebene Vorgehen wird aufgrund der hohen Anzahl an ausgewerteten Anschnitten sowie des eng gewählten Rasters die Situation im Explant repräsentativ erfasst. Dies wäre durch einen einzigen zufällig oder willkürlich durch das Explant gelegten Schnitt nicht möglich (ROYET, 1991).

In den quantitativ stereologischen Untersuchungen wurden die Volumenanteile von Bindegewebe, Muskulatur, Epithel und CD11a/18-positiven Zellen bestimmt (III.3.4.4). Die Volumenanteile der Gewebekompartimente von Bindegewebe und Muskulatur wurden ermittelt, da sie die Hauptbestandteile der Zitzenwand bilden (LIEBICH, 1999). Der Volumenanteil des Epithels wurde bestimmt, da die in den Expressionsstudien untersuchten Zytokine und Chemokine unter anderem in Epithelzellen exprimiert werden (HOMEY et al., 2000; GOUWY et al., 2005; BANNERMAN, 2009). In dieser Arbeit sollten durch die Stimulation mit LPS von *E. coli* Entzündungsprozesse in der Zitze simuliert und analysiert werden. Im Zitzengewebe ansässige Leukozyten können durch die Synthese proinflammatorischer Mediatoren an der Entstehung eines solchen Entzündungsprozesses beteiligt sein. Sie exprimieren z. B. die in der qRT-PCR untersuchten proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-1 β sowie das Chemokin IL-8/CXCL8 (BANNERMAN, 2009). Deshalb wurde der Volumenanteil an Leukozyten in den Explants der Zitze eruiert. Die gewählten Färbungen und immunhistochemischen Nachweise zur Darstellung der entsprechenden Kompartimente (III.3.4.3) eigneten sich zur eindeutigen Identifizierung und Differenzierung der zu quantifizierenden Gewebe- und Zelltypen. Die Trichrom-Masson-Färbung ermöglichte durch die unterschiedliche Anfärbung von Bindegewebe und Muskulatur die Differenzierung dieser beiden Gewebekompartimente (Abb. 4).

Die immunhistochemische Darstellung von Zytokeratin eignete sich gut zur zuverlässigen Markierung und Bestimmung des Volumenanteils des Epithels in den Explants (Abb. 14). Die spezifische Bindung des CD11a/18-Antikörpers gestattete den immunhistochemischen Nachweis von Leukozyten (Abb. 14).

1.1 Volumenanteile von Bindegewebe und Muskulatur in Explants der Zitze

Der Volumenanteil von Bindegewebe in Explants der FBR lag signifikant höher als der Volumenanteil in Explants der ZZ. Die Volumenanteile der Muskulatur waren dagegen in Explants der ZZ höher als in Explants der FBR (IV.1.3.1). Die Werte wiesen eine geringe Streuung auf (Mittelwert \pm SD: $V_{V(BG/Exp)}$: 56 % \pm 5 % in FBR und 42 % \pm 7 % in ZZ; $V_{V(M/Exp)}$: 25 % \pm 6 % in FBR und 40 % \pm 9 % in ZZ). Eine Erklärung für die unterschiedlichen Volumenanteile von Muskulatur und Bindegewebe in den beiden Lokalisationen könnte sein, dass die Zitzenwand in ihrer innersten, dem Lumen der ZZ zugewandten Wandschicht viele glatte, zirkulär angeordnete Muskelzellen enthält. Diese können somit in den Explants der ZZ, die nur Gewebe enthalten, das im Bereich von etwa 2 mm unter dem Epithel liegt, angetroffen werden. Die radiär angeordneten Muskelzellen der mittleren Wandschicht ziehen in den Bereich der FBR und bilden dort die 5 – 8-faltige Rosette, die sich ins Lumen einstülpt (LIEBICH, 1999). Dort liegt die Muskulatur also in tieferen Schichten und wird seltener in den 2 mm langen Explants angetroffen.

1.2 Volumenanteil von Epithel in Explants der Zitze

Die quantitativ stereologischen Untersuchungen ergaben in Explants der FBR gegenüber Explants der ZZ einen signifikant höheren Volumenanteil des Epithels (IV.1.3.2). Die unterschiedlichen Volumenanteile des Epithels in den beiden Lokalisationen könnten durch die z. T. unterschiedliche Epithelisierung des Zitzenepithels bedingt sein: Die FBR (und entsprechend die Entnahmelokalisation der Explants der FBR) befindet sich direkt am Übergang des mehrschichtig verhornten Plattenepithels des Strichkanals zum zweischichtigen Schleimhautepithel der ZZ (ADAMS et al., 1961). Der höhere Volumenanteil des Epithels in Explants der FBR könnte somit durch eine Mehrschichtigkeit des Epithels in den Explants aus diesem Bereich bedingt sein.

Die Volumenanteile des Epithels in Explants der Zitze zeigten eine große relative Streuung (Mittelwert \pm SD: $V_{V(E/Exp)}$: 7 % \pm 4 % [CV = 57 %] in FBR und 4 % \pm 3 % [CV = 75 %] in ZZ). Dies könnte sich zum einen durch die insgesamt niedrigen Volumenanteile des Epithels in den Explants erklären lassen, wodurch sich kleine Unterschiede stärker auf die Standardabweichung auswirken. Zum anderen scheint in Explants der FBR die Streuung der Volumenanteile des Epithels durch die anatomischen Gegebenheiten bedingt zu sein. In diesem Bereich enthielten die Explants z. T. mehrschichtiges und z. T. zweischichtiges Epithel. Auch könnte sowohl in Explants der FBR als auch in denen der ZZ die Schleimhautfältelung zu unterschiedlichen Volumenanteilen des Epithels in verschiedenen Explants führen. Weiterhin spielen vermutlich tierindividuelle Unterschiede in der Epithelisierung eine Rolle. So zeigen ältere Kühe vor allem in den Einbuchtungen der Schleimhautfalten oft einen Wechsel des Zisternenepithels vom zweischichtigen zum mehrschichtigen Typ (ADAMS et al., 1961).

1.3 Volumentanteil von CD11a/18-positiven Zellen in Explants der Zitze

Für die immunhistochemische Darstellung von residenten Leukozyten in Explants der Zitze wurde ein anti-CD11a/18-Antikörper verwendet. CD18 bildet die β -Untereinheit der heterodimeren β -2-Leukozyten-Integrine CD11/CD18. Diese Integrine sind Transmembran-Rezeptoren, die nur von Leukozyten exprimiert werden (FLAHERTY et al., 1997) und wichtige Funktionen beispielsweise im Rahmen von Zelladhäsionsprozessen besitzen. Wie von NIKU et al. (2006) beschrieben, gestattete der Antikörper BAT75A die spezifische Detektion von CD11a/18-positiven Leukozyten in Explants und in der mitgeführten Positivkontrolle (Gewebe von bovinem Lymphknoten, Abb. 14.). Da Makrophagen den vorherrschenden leukozytären Zelltyp im Zitzengewebe darstellen (DÜVEL, 2010) und maßgeblich an Erregererkennung und Induktion einer Immunantwort beteiligt sind, sind diese Zellen im Hinblick auf die durchgeführten qRT-PCR-Expressionsstudien von besonderem Interesse. Es sei jedoch darauf hingewiesen, dass neben Makrophagen auch andere Leukozyten im Zitzengewebe eutergesunder Tiere vorkommen (NICKERSON & PANKEY, 1983; DÜVEL, 2010) und eine Rolle bei der Bildung proinflammatorischer Mediatoren spielen können. Als alternative Möglichkeit zur immunhistochemischen Darstellung von Makrophagen wäre ein anti-MAC387-Antikörper in Betracht gekommen.

Dieser Antikörper bindet an ein Epitop des S100A9 (MRP-14) (GOEBELER et al., 1994), welches im Zytoplasma von mononukleären Zellen, Granulozyten und Epithelzellen exprimiert wird. Lediglich eine Subpopulation von Makrophagen zeigt jedoch eine positive MAC387-Immunoreaktivität. Wahrscheinlich handelt es sich dabei um früh differenzierte Makrophagen und Monozyten (DÜVEL, 2010). Deshalb wurde im Rahmen der quantitativ stereologischen Untersuchungen der vorliegenden Arbeit ein anti-CD11a/18-Antikörper zur immunhistochemischen Darstellung von Leukozyten in Explants der bovinen Zitze verwendet.

In den Explants zeigten nur wenige, direkt subepithelial gelegene Zellen eine positive immunhistochemische Reaktivität mit dem anti-CD11a/18-Antikörper (Abb. 14). Die hier beobachtete subepitheliale Lokalisation von Leukozyten in der Zitze wurde bereits in anderen Arbeiten beschrieben (NICKERSON & PANKEY, 1983). Die Volumenanteile CD11a/18-positiver Zellen in Explants der FBR und der ZZ betragen nur wenige Promille (Mittelwert \pm SD: $V_{V(\text{CD11a/18 pos Z/Exp})}$: 0,3 ‰ \pm 0,2 ‰ in FBR und 0,07 ‰ \pm 0,06 ‰ in ZZ). Dies könnte dadurch bedingt sein, dass für die Untersuchung eutergesunde Tiere ausgewählt wurden. Die geringe Anzahl von Immunzellen im Gewebe von FBR und ZZ von Tieren ohne die Vorgeschichte einer Euterentzündung und eutergesunden adulten Rindern wurde bereits beschrieben (NICKERSON & PANKEY, 1983; DÜVEL, 2010). Der Volumenanteil CD11a/18-positiver Zellen in Explants der FBR lag dabei aber signifikant höher als deren Anteil in Explants der ZZ (IV.1.3.2). Dieser Unterschied zwischen den Lokalisationen unterstützt die Theorie, dass der FBR bei Pathogenerkennung und Zellrekrutierung eine wichtige immunologische Rolle in der Erregerabwehr der Milchdrüse zukommen könnte (NICKERSON & PANKEY, 1983). Die Volumenanteile der CD11a/18-positiven Zellen in verschiedenen Explants der Zitze zeigten eine hohe Variabilität (CV = 67 % in FBR und CV = 86 % in ZZ). Die relativ hohen Standardabweichungen könnten vor allem durch den insgesamt sehr geringen Volumenanteil dieser Zellen bedingt sein. Diese Variabilität des Volumenanteils CD11a/18-positiver Zellen könnte der Grund für die beobachtete Heterogenität der mRNA-Expression einzelner Explants (IV.2.1) sein.

Fazit: Die quantitativ stereologischen Untersuchungen erlauben einen Rückschluss auf die Vergleichbarkeit der Gewebe- und Zelltypzusammensetzung der Zitzenexplants. Trotz der zum Teil hohen relativen Streuung (CV von $V_{V(E/Exp)}$ in FBR: 57 %, in ZZ: 75 %; CV von $V_{V(CD11a/18\ pos\ Z/Exp)}$: 67 % in FBR und 86 % in ZZ), ergab sich für die Volumenanteile aller untersuchten Kompartimente ein signifikanter Unterschied zwischen den Explants der FBR und den Explants der ZZ. Daher sollten die FBR und die ZZ im Hinblick auf ihre Verwendung als Proben im Rahmen von Genexpressionsstudien als getrennte Lokalisationen betrachtet und untersucht werden. Die Streuung der Volumenanteile von Epithel und CD11a/18-positiven Zellen einzelner Explants könnte neben einer natürlichen biologischen Diversität auch durch tierindividuelle Unterschiede (Alter, Reproduktionszyklus und Mastitisvorgeschichte) bedingt sein. Zukünftige Studien mit Explants der bovinen Zitze sollten daher immer unter genauer Beachtung von Alter, Vorgeschichte und aktuellem Zyklusstand oder Trächtigkeitsstatus erfolgen. Die Werte der Volumenanteile von Epithel und CD11a/18-positiven Zellen in einzelnen Explants der Zitze zeigten zwar eine hohe relative Streuung, bewegten sich aber jeweils in der gleichen Größenordnung ($V_{V(E/Exp)}$: wenige Prozente, $V_{V(CD11a/18\ pos\ Z/Exp)}$: wenige Promille). Des Weiteren war die Standardabweichung der Werte der ermittelten Volumenanteile des Epithels und der CD11a/18-positiven Zellen in den Zitzenexplants durch deren geringen Anteil am gesamten Explant rechnerisch relativ hoch; die absolute Standardabweichung war jedoch gering. Die Untersuchungen zeigen, dass die Explantkultur ein valides Modell für die Untersuchung von Vorgängen an der Zitze darstellt, wenn bei molekularbiologischen Untersuchungen die Lokalisationen FBR und ZZ als getrennte Lokalisationen betrachtet und die Einzelproben gegebenenfalls gepoolt analysiert werden.

2 Expression immunrelevanter Gene in Explants der Zitze

Im Rahmen molekularbiologischer Untersuchungen von Explants der bovinen Zitze wurden zunächst methodische Vorarbeiten durchgeführt. Diese Vorarbeiten dienten dem Vergleich der Genexpression in Explants der Zitze, die alle für 3 h entweder mit oder ohne LPS inkubiert wurden (III.3.3.2). Sowohl in den unstimulierten als auch in den LPS-stimulierten Explants konnten mittels qRT-PCR Transkripte der Faktoren TNF- α , RANTES/CCL5 (im Folgenden als CCL5 bezeichnet), MIP-3 α /CCL20 (im Folgenden als CCL20 bezeichnet), IL-8/CXCL8

(im Folgenden als IL-8 bezeichnet), S100A8, S100A9 und S100A12 nachgewiesen werden. Die errechneten Variationskoeffizienten lagen zwischen 49 % und 371 % und belegen, dass die einzelnen Explants sowohl mit als auch ohne LPS-Stimulation eine hohe Heterogenität der Transkriptabundanzen der untersuchten Gene aufwiesen (IV.2.1). Dieser Heterogenität könnten verschiedene Ursachen zu Grunde liegen. Sie könnte auf biologischer Diversität und tierindividuellen Unterschieden beruhen oder durch Unterschiede in der Gewebezusammensetzung der Explants bedingt sein. In den quantitativ stereologischen Untersuchungen war gezeigt worden, dass die Volumenanteile von Epithel und CD11a/18-positiven Zellen in verschiedenen Explants eine hohe relative Streuung aufwiesen (IV.1.3). Epithelzellen und Leukozyten exprimieren die mittels qRT-PCR untersuchten Chemokine, Zytokine und S100-Proteine (BANNERMAN, 2009). Da die Methode der qRT-PCR sehr sensitiv ist, scheinen sich schon geringe absolute Unterschiede der Volumenanteile in einzelnen Explants in den Ergebnissen der qRT-PCR widerzuspiegeln (IV.2.1). Die Variationskoeffizienten waren, außer bei dem Chemokin CCL20, in den Explants der FBR geringer als in Explants der ZZ und des Parenchyms. Das könnte damit zusammenhängen, dass dort die Entnahmestellen der Explants dichter beieinander lagen und diese sich daher in ihrem Aufbau eher glichen. Dies zeigt sich auch in den niedrigeren CV der Volumenanteile in Explants der FBR gegenüber Explants der ZZ (IV.1.3.2). Die vorliegenden Resultate liefern Hinweise, dass die FBR eine herausragende Rolle bei der Erregererkennung und -abwehr spielt: So sind die Chemokine IL-8 und CCL20 und das Zytokin IL-1 β sowie alle drei untersuchten S100-Proteine in unstimulierten Explants der FBR signifikant höher exprimiert als in unstimulierten Explants der ZZ und des Parenchyms (Tab. 11 und Tab. 13). Außerdem wurden fünf der acht untersuchten Gene auch nach LPS-Stimulation in Explants der FBR signifikant stärker exprimiert als in Explants der ZZ (Tab. 12 und Tab. 14).

Aufgrund der Ergebnisse aus den methodischen Vorarbeiten wurden in weiterführenden Untersuchungen je zwei Explants aus einer Zitzenlokalisierung bei der RNA-Extraktion gepoolt. Dies sollte die vergleichsweise hohe Heterogenität reduzieren. Aus dem gleichen Grund wurde die Anzahl untersuchter Tiere und Explants erhöht. Die Explants der Kontrolle und die Explants, die einer LPS-Stimulation unterzogen wurden, stammten dabei aus dem gleichen Tier (III.3.3.2).

In den Vorversuchen waren die Transkriptabundanz der meisten untersuchten Gene in Explants des Parenchyms sehr niedrig. Dies weist darauf hin, dass diesem Gewebe eine dem Zitzengewebe zeitlich nachgeschaltete Bedeutung bei der Erregerabwehr zukommt. RINALDI et al. (2010) beschrieben ebenfalls, dass im Gegensatz zu Gewebe von Zitzenzisterne und Drüsenzisterne, das bereits früher reagierte, ein signifikanter Anstieg immunrelevanter Gene im Gewebe des Drüsenparenchyms erst 24 h nach einer experimentellen *E. coli*-Infektion auftrat. Da der Fokus der vorliegenden Arbeit aber auf frühe Erreger-Wirt-Interaktionen des distalen Milchdrüsenkompartiments gerichtet war, wurde im Weiteren auf die Untersuchung von Parenchymgewebe verzichtet.

Ein Ausschlusskriterium für den Einsatz von Gewebe im Explantmodell war eine bakterielle Kontamination. Deshalb wurde sowohl die Milch als auch die Schleimhautoberfläche der Zitzen bakteriologisch untersucht. Im Rahmen der Expressionsstudien wurden die Euterviertel, die Wachstum von Koagulase negativen Staphylokokken (KNS) oder *Streptococcus ssp.* in Milch oder in Schleimhautupferproben aufwiesen, von weiteren Untersuchungen ausgeschlossen (III.2.8.1). Die Anwesenheit dieser Keime in der Milchdrüse kann die Genexpression immunrelevanter Gene modulieren (BANNERMAN, 2009). Die Expression der hier untersuchten Gene im Gewebe der Zitze hätte dadurch beeinflusst und möglicherweise zu verfälschten Ergebnissen bezüglich der untersuchten Fragestellung führen können. Viertel mit nachgewiesenem Wachstum coryneformer Bakterien wurden nicht von der Untersuchung und Auswertung ausgeschlossen. *Corynebacterium ssp.* werden häufig aus Milchproben isoliert und besiedeln den Strichkanal, ohne eine intramammäre Infektion hervorzurufen (BEXIGA et al., 2011). So konnte in Milchproben, die mittels Standardtechnik gewonnen wurden, signifikant häufiger *Corynebacterium ssp.* nachgewiesen werden als in solchen, die mit Hilfe eines Zitzenkatheters entnommen wurden. Das lässt darauf schließen, dass der Keim lediglich im Strichkanal und nicht in der Zitzenzisterne lokalisiert ist (BEXIGA et al., 2011). Aufgrund der Nachweis-häufigkeit dieses Keimes wäre es nicht möglich gewesen, jedes betroffene Viertel von der Untersuchung auszuschließen. Bei den Ergebnissen der qRT-PCR waren keine systematischen Unterschiede zwischen den Expressionsmustern von Explants aus bakteriologisch negativ beprobten Vierteln und solchen mit Wachstum coryneformer Keime zu beobachten (Daten nicht gezeigt).

Die Inkubation für die Expressionsstudien wurde mit einer auf 1 µg/mL LPS eingestellten Stimulationsdosis durchgeführt. Die LPS-Dosis wurde dabei im Vergleich zu den methodischen Vorarbeiten (20 µg/mL) reduziert, weil von kommerziell erhältlichem LPS (Sigma) auf hochaufgereinigtes LPS von *E. coli* 1303 (AG Holst, Borstel) gewechselt wurde (III.2.9.3). Prinzipiell kann die Toxizität zwischen LPS-Typen und -Präparationen variieren (CAROFF & KARIBIAN, 2003). In unabhängigen Vorversuchen hatte sich innerhalb unseres Forschungsverbundes gezeigt, dass die LPS-Präparation von *E. coli* 1303 potenter immunstimulierend wirkt als das kommerziell erhältliche LPS: Die Dosis von 1 µg/mL des hochaufgereinigten LPS war ausreichend, um eine deutliche immunologische Reaktion hervorzurufen. Diese Präparation war bereits erfolgreich bei der Stimulation primärer Milchdrüsenepithelzellen und im Tiermodell eingesetzt worden (mündliche Mitteilung H.-M. Seyfert, Dummerstorf bzw. R. Bruckmeier, Bern). Der Bakterienstamm *E. coli* 1303 war darüberhinaus bereits mehrfach in bovinen Mastitis-Infektionsmodellen verwendet worden (PETZL et al., 2008; MITTERHUEMER et al., 2010).

2.1 LPS induziert die Expression proinflammatorischer Zytokine und Chemokine in Explants der Zitze

Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Expressionsstudien konnte weder in den unstimulierten noch in den mit 1 µg/mL LPS von *E. coli* 1303 stimulierten Explants der Zitze eine deutliche mRNA-Expression des proinflammatorischen Zytokins IL-1β nachgewiesen werden (IV.2.2). Als Antwort auf eingedrungene Erreger oder Erregerkomponenten fördert IL-1β durch Endothelaktivierung die Migration von PMN zum Infektionsort und vermittelt die Akute-Phase-Reaktion (SORDILLO & STREICHER, 2002). In der Literatur wird ein Anstieg der Expression von IL-1β nach Stimulation mit LPS oder *E. coli* in Kulturen boviner Milchdrüsenepithelzellen beschrieben. STRANDBERG et al. (2005) beobachteten einen starken Anstieg der IL-1β-Expression in pbMEC innerhalb der ersten 2 h nach Stimulation mit 50 µg/mL LPS. Sie berichten jedoch auch von einer sehr niedrigen Expression des Zytokins in unstimulierten Zellen. In MAC-T-Zellkulturen konnte ein nur geringerer Anstieg der IL-1β-Konzentration beobachtet werden. LAHOUSSA et al. (2007) beschrieben ebenfalls einen Anstieg der IL-1β-Expression in pbMEC, jedoch nach Inkubation mit *E. coli* (8×10^6 CFU). Der Anstieg war bereits nach 3 h vorhanden und war nach

10 und 24 h noch stärker ausgeprägt. Eine Basisexpression des Zytokins konnte nicht nachgewiesen werden. Die fehlende Basisexpression von IL-1 β in Explants der Zitze stimmt demnach mit Beobachtungen aus Milchdrüsenepithelzellen überein. Der Untersuchungszeitraum der oben genannten Studien entspricht in etwa der in dieser Arbeit für die Expressionsstudien gewählten Inkubationszeit von 3 h. Es könnte sein, dass die Stimulationsdosis von 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS zu gering war, um zu diesem frühen Zeitpunkt eine adäquate IL-1 β -Expression hervorzurufen. In den zuvor genannten Studien wurde nämlich eine deutlich höhere Stimulationsdosis von 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS oder *E. coli*-Bakterien als Stimuli verwendet. MC CLENAHAN et al. (2005) beobachteten in ihrer Studie an MAC-T-Zellen einen Anstieg der IL-1 β -Expression nach Stimulation mit LPS, mit *E. coli*-Kultur-Überständen oder *E. coli*-Bakterien. Die Expressionssteigerungen waren jedoch sehr gering und konnten durch die Zugabe des LPS-Neutralisators Polymyxin B nicht beeinflusst werden. Die Autoren schlossen daraus, dass andere *E. coli*-Faktoren als LPS an einer IL-1 β -Stimulation beteiligt sein müssen. RABOT et al. (2007) konnten in Explants aus dem Milchdrüsenparenchym nach Stimulation mit 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS erst nach 6 h einen signifikanten Unterschied in der mRNA-Expression von IL-1 β in unstimulierten zu stimulierten Explants beobachten. Nach 3 h Inkubation war kein signifikanter Unterschied vorhanden. Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete fehlende IL-1 β -Expression scheint also auf die vergleichsweise kurze Stimulationsdauer der Explants mit einer geringen LPS-Konzentration zurückführbar zu sein. Um diese Frage aufzuklären, sollten Zeitverlaufsstudien und Versuche mit Einsatz unterschiedlicher Stimulationsdosen durchgeführt werden.

Explants der Zitze zeigten nach Stimulation mit 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS von *E. coli* 1303 eine signifikant stärkere mRNA-Expression des proinflammatorischen Zytokins TNF- α als unstimulierte Explants der Zitze (IV.2.2). Sowohl Explants der FBR als auch der ZZ reagierten somit auf LPS-Stimulation mit einer Induktion von TNF- α . Dieses Zytokin fördert ebenfalls die Rekrutierung von Leukozyten, steigert die Phagozytose und bakterizide Wirkung der PMN, verstärkt die Akute-Phase-Antwort und induziert Fieber (BANNERMAN, 2009). In Zellkultur-Modellen konnte bereits eine erhöhte mRNA-Expression von TNF- α und die Synthese dieses Zytokins durch MAC-T-Zellen nach LPS-Stimulation auf Produktebene nachgewiesen werden (MC CLENAHAN et al., 2005).

Auch pbMEC reagierten auf LPS-Stimulation mit einer raschen Induktion der Genexpression für TNF- α (WELLNITZ & KERR, 2004; STRANDBERG et al., 2005). RABOT et al. (2007) konnten in Explants von bovinem Milchdrüsenparenchym weder nach 3 h noch nach 6 h einen signifikanten Anstieg der TNF- α -Expression nach Stimulation mit 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS nachweisen, was sie auf die sehr hohe Heterogenität der Expression zurückführten. Im Gegensatz dazu konnte in der vorliegenden Arbeit belegt werden, dass TNF- α in Explants der FBR und der ZZ eine Basisexpression aufweist und durch LPS induzierbar ist (IV.2.2.1). Demnach könnte nach Eindringen eines Erregers bereits bei dessen Kontakt mit dem Epithel der FBR und der ZZ eine Immunantwort in Gang gesetzt werden. Es ist davon auszugehen, dass diese dem Parenchym vorgeschaltet ist und zur Rekrutierung von Immunzellen in das milchleitende System des Euters und damit einer schnellen Erregereliminierung dient. TNF- α zeigte sowohl in Explants der FBR als auch der ZZ eine gewisse Basisexpression. Diese Basisexpression war in Explants der FBR signifikant höher als in Explants der ZZ (Abb. 20). Die Ursache dafür könnte sein, dass TNF- α vor allem von Makrophagen und Epithelzellen gebildet wird und diese Zellen in Explants der FBR einen höheren Volumenanteil einnehmen als in Explants der ZZ (IV.1.3.2).

Chemokine sind Peptid-Zytokine, die an der Rekrutierung von Entzündungszellen in das Gewebe beteiligt sind. Sie werden durch proinflammatorische Zytokine (IL-1 β , TNF- α) und durch mikrobielle Produkte induziert. Die durch zwei aufeinanderfolgende Cysteinreste am Aminoende des Peptids gekennzeichneten CC-Chemokine CCL5 und CCL20 zeigten in Explants nach Stimulation mit 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS von *E. coli* 1303 eine signifikant höhere Expression als in unstimulierten Explants (IV.2.2). CCL5 wird von aktivierten T-Zellen, Endothelzellen, Epithelzellen und Fibroblasten gebildet (GOUWY et al., 2005). Über spezifische Rezeptoren (CCR1, 3, 5) aktiviert es T-Zellen, führt zur Degranulation basophiler Granulozyten und wirkt chemotaktisch auf Blut-Monozyten, Makrophagen und T-Gedächtniszellen (PAREEK et al., 2005). Verschiedene Arbeitsgruppen zeigten in der Zellkultur, dass MEC nach Stimulation mit *E. coli* oder LPS das Chemokin CCL5 exprimierten (PAREEK et al., 2005; GRIESBECK-ZILCH et al., 2008; GUNTHER et al., 2009). Das Chemokin CCL5 wurde in dieser Studie in Explantgewebe der Zitze durch LPS-Stimulation induziert. Dies weist darauf hin, dass im Falle einer Infektion neben

milchbildendem Parenchym auch das Gewebe der Zitze eine Rolle bei der Rekrutierung von Leukozyten spielt. Lokalisationsspezifische Unterschiede für die FBR und ZZ konnten jedoch nicht aufgezeigt werden (Abb. 20).

Das zweite untersuchte CC-Chemokin CCL20 wird von Fibroblasten, Epithelzellen sowie Keratinozyten gebildet und wirkt chemotaktisch auf T-Gedächtniszellen und dendritische Zellen (HOMEY et al., 2000). Eine verstärkte Expression dieses Chemokins wurde bereits in mit LPS stimulierten pbMEC und im Eutergewebe von experimentell mit *E. coli* infizierten Kühen nachgewiesen (GUNTHER et al., 2009). RINALDI et al. (2010) zeigten, dass sowohl in Gewebe der FBR als auch der ZZ und der Drüsenzisterne nach experimenteller Infektion mit *E. coli* die Expression von CCL20 signifikant hochreguliert wird. In der aktuellen Arbeit wurde in Explants der Zitze die mRNA-Expression von CCL20 durch LPS ebenfalls induziert. Die signifikant höhere Expression in Explants der FBR gegenüber Explants der ZZ (Abb. 20) könnte durch den höheren Anteil an Epithelzellen in diesem Bereich bedingt sein. Bereits HOMEY et al. (2000) äußerten die Vermutung, dass CCL20 vor allem eine wichtige Rolle an Kontaktflächen zwischen Organismus und Umwelt zuteil wird, da es in Keratinozyten der Haut und in Darmepithelzellen exprimiert wird (CHARBONNIER et al., 1999; TANAKA et al., 1999). Somit könnte CCL20 die Wächter- und Abwehrfunktion der FBR stärken, indem es sich nach erstem Erregerkontakt an der Rekrutierung von Abwehrzellen beteiligt.

Aus der Gruppe der CXC-Chemokine wurde die mRNA-Expression von IL-8 untersucht. Die CXC-Chemokine sind dadurch gekennzeichnet, dass sie zwischen den beiden Cysteinresten des Aminoendes noch eine weitere Aminosäure enthalten. Ist den beiden ersten Cysteinresten des Peptids das ELR-Tripeptidstrukturmotiv Glutamat-Leucin-Arginin vorangestellt, spricht man von ELR⁺-Chemokinen, welche chemotaktisch auf PMN wirken (GOUWY et al., 2005). In Explants der FBR und der ZZ wurde das ELR⁺-Chemokin IL-8 nach Stimulation mit LPS von *E. coli* 1303 signifikant stärker exprimiert als in unstimulierten Explants (IV.2.2). Es bestand kein signifikanter Unterschied in der Höhe der mRNA-Expression dieses Chemokins zwischen Explants der FBR und der ZZ (Abb. 20). WELLNITZ & KERR (2004) zeigten, dass pbMEC ebenfalls nach Stimulation mit LPS vermehrt IL-8 exprimieren. Auch MC CLENAHAN et al. (2005) beobachteten in MAC-T-Zellen nach LPS-Stimulation oder Koinkubation

mit *E. coli* einen Anstieg der IL-8-Expression. In Explants aus Milchdrüsenparenchym wurde ein Anstieg der mRNA-Expression von IL-8 nach 6 h Inkubation mit LPS verzeichnet (RABOT et al., 2007). Über spezifische auf PMN exprimierte Rezeptoren stimuliert IL-8 neben der Migration ins Gewebe auch die antibakterielle Aktivität von PMN (BANNERMAN, 2009). Die Ergebnisse von RINALDI et al. (2010) zeigen, dass nicht nur Milchdrüsenepithelzellen immunologisch reaktiv sind, sondern bereits das Gewebe der Zitze auf eingedrungene Erreger mit der Bildung des chemoattraktiven IL-8 reagieren kann. In ihrer Studie war die IL-8-Expression im Gewebe der ZZ und der Drüsenzisterne 12 h nach einer experimentellen *E. coli*-Infektion hoch reguliert. Nach 24 h war in diesen Bereichen die IL-8-Expression wieder gesunken, während sie nun im Gewebe des Drüsenparenchyms induziert war. Die Induktion dieses Chemokins folgt demnach bei einer Infektion einer zeitlichen und räumlichen Ausbreitung. Dabei reagiert das Gewebe der Zitze rasch und stark und kann vermutlich somit eine schnelle Immunantwort auf eindringende Erreger in Gang setzen (RINALDI et al., 2010). Die Ergebnisse der hier durchgeführten Expressionsstudie unterstützen diese Aussage.

2.2 Explants der Zitze exprimieren S100-Proteine

S100-Proteine sind kleine saure Proteine mit kalziumbindender Fähigkeit, die den DAMPs (Damage-associated molecular patterns) zugeordnet werden. Sie liegen im Zytoplasma verschiedener Zellen vor und sind an der Zellhomöostase beteiligt. Bei zellulärem Stress, Infektionen oder Entzündungen werden die S100-Proteine durch geschädigte oder zerstörte Zellen als „Alarmine“ freigesetzt (FOELL et al., 2007). Bei den durchgeführten Expressionsstudien wiesen die mRNA-Kopien der verschiedenen S100-Proteine in Explants der Zitze ein vergleichbares Expressionsmuster auf. S100A12 (EN-RAGE, Calgranulin C) und S100A9 (MRP14, Calgranulin B) zeigten eine ähnlich hohe Anzahl an mRNA-Kopien, während S100A8 (MRP8, Calgranulin A) etwas weniger stark exprimiert wurde. Auffallend war, dass S100A8, S100A9 und S100A12 in Explants der FBR signifikant stärker exprimiert wurden als in Explants der ZZ (IV.2.2). Allerdings zeigte sich in der mRNA-Expression aller drei untersuchten Calgranuline kein signifikanter Unterschied zwischen unstimulierten und stimulierten Explants der FBR. Dies lässt darauf schließen, dass sich die ohnehin schon hohe Basisexpression der untersuchten Calgranuline im Gewebe der FBR durch LPS nicht

weiter induzieren lässt. Die in der ZZ vorliegende geringere Expression aller drei S100-Proteine ließ sich hingegen durch LPS signifikant erhöhen (IV.2.2.2).

Die Ergebnisse legen nahe, dass Calgranuline im Bereich der FBR eine besondere Rolle spielen. S100A8 und S100A9 liegen im Zytoplasma von Granulozyten, Monozyten und Frühstadien von Makrophagen entweder als Homodimer, meist jedoch als Heterodimer (Calprotectin) vor. Bei entzündlichen Vorgängen kann die Expression dieser Proteine in Keratinozyten und Epithelzellen induziert werden (FOELL et al., 2007). Intrazellulär ist Calprotectin an Zellzyklus, Zelldifferenzierung und Zytoskelett-Membran-Interaktionen beteiligt. Wird es von aktivierten Zellen freigesetzt, zeigt es antimikrobielle Aktivitäten (CHAMPAIBOON et al., 2009) und induziert durch spezifische Bindung an Endothelzellen eine prothrombotische und proinflammatorische Reaktion (FOELL et al., 2007). CHAMPAIBOON et al. (2009) stellten für den Menschen die Hypothese auf, dass Calprotectin-exprimierende orale Keratinozyten, durch deren Förderung der Resistenz gegenüber bakterieller Besiedelung, eine wichtige Rolle bei Abwehrfunktionen von Schleimhäuten spielen. Es könnte sein, dass auch beim Rind in der Schleimhaut der FBR und der ZZ Calprotectin-exprimierende Zellen Schutz vor bakterieller Besiedelung bieten. DÜVEL (2010) beobachtete in ihrer Arbeit, dass der Calprotectin bindende Antikörper MAC-387 neben Makrophagen auch Epithelzellen der FBR markierte. In diesem Bereich der Zitze könnte die im Vergleich zur ZZ höhere Volumendichte an myeloischen Zellen und an Calprotectin-exprimierenden Epithelzellen eine vermehrte Expression von S100A8 und S100A9 und damit dessen höheres intrazelluläres Vorkommen bedingen. Bei Eindringen von Erregern könnte an der ersten Kontaktstelle mit der Schleimhaut des Wirtes dieses vorhandene Calprotectin durch aktivierte Zellen freigesetzt werden. Eine rasche extrazelluläre proinflammatorische und antibakterielle Wirkung wäre die Folge. Die Freisetzung von S100A8 und S100A9 ist unabhängig von De-novo-Synthese und eher mit einer Herabregulation der mRNA-Expression beider Gene assoziiert (FROSCH et al., 2000). Dies könnte die Beobachtung erklären, dass in Explants der FBR keine Induktion der Genexpression von S100A8 und S100A9 nach LPS-Stimulation auftrat.

Das ebenfalls in Explants der FBR stark exprimierte Calgranulin C (S100A12) zeigt keine Interaktion mit S100A8 oder S100A9. Es liegt als Homodimer im Zytosol von Granulozyten vor (VOGL et al., 1999). Über den spezifischen

Rezeptor RAGE induziert S100A12 in Makrophagen, Lymphozyten und Endothelzellen die NF- κ B-Kaskade und die Expression von Adhäsionsmolekülen (FOELL et al., 2007). Extrazellulär hat S100A12 eine antimikrobielle Wirkung auf Gram-negative Bakterien (GLASER et al., 2005). GOTTSCH et al. (1999) zeigten, dass sich die Expression von S100A12 in Zellkulturen primärer boviner Keratinozyten induzieren lässt. Zellkulturen von pbMEC exprimieren ebenfalls dieses Calgranulin. Die Expression in den pbMEC stieg nach Stimulation mit 50 μ g/mL LPS oder 20 μ g/mL LTA signifikant an (LUTZOW et al., 2008). Die Ergebnisse der in dieser Arbeit durchgeführten Expressionsstudie weisen darauf hin, dass S100A12 auch in Epithelzellen der FBR exprimiert wird. Auch wenn S100A12 unabhängig von S100A8 und S100A9 wirkt und keine Interaktion mit diesem aufweist, so werden die drei Calgranuline doch kombiniert exprimiert und gemeinsam kalziumabhängig vom Zytosol zu Zytoskelett und Membranstrukturen transportiert (FOELL et al., 2007). S100A12 könnte ähnlich wie Calprotectin besonders in Zellen im Bereich der FBR exprimiert und bei einer Infektion freigesetzt werden. RINALDI et al. (2010) wiesen im Eutergewebe von mit *E. coli* infizierten Vierteln eine starke Induktion der S100A12-mRNA-Expression im Gewebe der ZZ nach 12 h und im Gewebe des Drüsenparenchyms nach 24 h nach. Diese Ergebnisse lassen eine zeitabhängige Induktion dieses Gens in verschiedenen Regionen des Euters als Antwort auf eine bakterielle Infektion vermuten. Die hier untersuchten S100-Proteine scheinen somit in der FBR als „Barriere“ gegen eindringende Keime zu dienen, während sie im Bereich der ZZ und des Parenchyms erst bei „Gefahr“ induziert werden.

Ein weiteres Protein der S100-Familie, das S100A7 (Psoriasin), spielt offenbar ebenfalls eine wichtige Rolle in der Immunabwehr des Euters. So konnten REGENHARD et al. (2010) eine Expression dieses antibakteriell aktiven Proteins in der Haut des Euters von Kühen und in der ZZ von mit *E. coli*-infizierten Kühen nachweisen. TETENS et al. (2010) wiesen eine hohe Expression dieses Gens im Strichkanal gesunder Kühe nach. Diese Beobachtungen unterstreichen die Bedeutung von S100-Proteinen beim Schutz vor bakteriellen Infektionen an Kontaktflächen des Körpers zur Außenwelt.

Da die untersuchten Gene zur Gruppe der DAMPs gehören, die bei Zellschädigung freigesetzt werden, könnte die hohe Expression in Explants der Zitze auch mit der Gewebeentnahme zusammenhängen, da durch den Einsatz der

Biopsienadel in jedem Falle am Rande der Explants eine Gewebeschädigung auftritt. Dieser Vermutung widerspricht aber die Tatsache, dass in den Explants der ZZ die Expression der S100-Proteine nicht *per se* sehr hoch war, sondern eine geringere Basisexpression vorlag, die erst nach LPS-Stimulation anstieg. Wäre die hohe mRNA-Expression der Calgranuline in Explants der FBR nur durch entnahmebedingte Zellschädigung oder durch Stress in der Kultur bedingt, wäre eine ähnliche Reaktion auch in Explants der ZZ zu erwarten gewesen.

Fazit: Die Ergebnisse zeigen somit, dass S100-Proteine im Bereich der FBR bereits eine hohe Basisexpression haben, die durch LPS-Exposition nicht weiter gesteigert werden kann, während in Explants der ZZ die Expression nach LPS-Stimulation ansteigt. Weiterhin reagiert Explantgewebe der Zitze auf den Stimulus LPS mit der raschen Induktion der untersuchten immunrelevanten Gene. Zu erwähnen ist jedoch, dass im Gegensatz zu den Bedingungen *in vivo* und bei der Zellkultur in der Explantkultur auch tiefer liegende Strukturen exponiert sind. So liegen bei der Explantkultur auch Bindegewebe, Muskulatur und Gefäßstrukturen frei und kommen mit dem Medium und dem Stimulus LPS in Kontakt. Da Chemokine auch in Endothelzellen und Fibroblasten gebildet werden, könnte dieser Kontakt zu einer verstärkten und schnelleren mRNA-Expression der Chemokine führen als *in vivo*, da im Tier in der Regel nur der Kontakt zu Epithelzellen der Zitze gegeben ist.

3 Bildung chemotaktischer Produkte in Explants der Zitze

In funktionellen Untersuchungen wurde überprüft, ob die in den molekularbiologischen Studien beobachtete Expression entzündungsrelevanter Kandidatengene in Explants der Zitze auch mit der Bildung und Sekretion chemotaktischer Produkte einhergeht.

3.1 Stimulierte Zitzenexplants produzieren chemotaktische Produkte

Durch die molekularbiologischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die mRNA-Expression immunrelevanter Gene in Explants der Zitze durch LPS induziert wird (IV.2.2). Im Chemotaxisassay wurde daraufhin geprüft, ob der beobachtete Anstieg der Expression dieser proinflammatorischen Zytokine und Chemokine auch mit der Bildung und Sekretion von chemotaktischen Produkten einhergeht. Das Abgeben von chemoattraktiven Produkten in das Kulturmedium durch Explantgewebe der Zitze war des Weiteren als ein Hinweis auf die Vitalität

und Funktionalität der Zellen des Gewebeverbandes zu werten. Die Synthese von Proteinen kann nach BACH et al. (1996) als Test für die Lebensfähigkeit von Gewebe in Kultur herangezogen werden. Die vorliegenden funktionellen Tests zeigten, dass Kulturmediumüberstände von Explants der Zitze nach 18 h Stimulation mit 1 µg/mL LPS von *E. coli* 1303 PMN zur aktiven Durchwanderung der Porenmembran in der Transmigrationskammer anregten. Demgegenüber lockten Überstände von Explantkulturen unstimulierter Explants die PMN nicht oder allenfalls sehr gering (IV.3.1). Folglich synthetisieren Explants der Zitze nach Stimulation mit 1 µg/mL LPS chemoattraktive Produkte und sezernieren sie in das Kulturmedium. Die Migrationsrate der PMN bei Überständen unstimulierter und stimulierter Explants unterschied sich signifikant. Dies gibt einen weiteren Hinweis darauf, dass die Bildung chemotaktischer Produkte weder durch die Gewebeentnahme mittels Biopsienadel noch durch die speziellen Umstände der Explantkultur hervorgerufen wurde. Wäre dies der Fall gewesen, hätten auch die Überstände unstimulierter Explants eine höhere chemoattraktive Kapazität aufgewiesen. Es kann davon ausgegangen werden, dass die Explants zum Zeitpunkt der Stimulation lebensfähig waren, da sie chemotaktische Faktoren erst nach Stimulation gebildet haben.

Die Migrationsraten von PMN bei unterschiedlichen Explantüberständen zeigten eine relativ hohe Streuung (IV.3.1). Dabei ist der hohe Variationskoeffizient der Migrationsraten mit Überständen unstimulierter Explants jedoch durch „Ausreißer“ und nicht durch eine generell hohe Variation der Werte bedingt. Die Migrationsraten bei Überständen stimulierter Explants weisen demgegenüber tatsächlich eine relativ hohe Streuung auf. Die Beobachtung entspricht den Ergebnissen aus qRT-PCR und Stereologie. Die unterschiedliche chemotaktische Kapazität einzelner Explants könnte durch Unterschiede in der Gewebezusammensetzung und dadurch bedingte Unterschiede in der mRNA-Expression verursacht werden.

Es ist bekannt, dass an der Rekrutierung von PMN in die Milchdrüse verschiedene Zelltypen beteiligt sind. So konnte im Rahmen eines Zellkultur-Modells im Chemotaxisassay bewiesen werden, dass pbMEC chemotaktische Produkte synthetisieren. Es wurde in Dosis-Wirkungs-Versuchen gezeigt, dass bereits ab einer LPS-Stimulationsdosis von 50 ng/mL Medium eine relativ konstante Migrationsrate von PMN erreicht wird (KALIVODA, 2010). Welche Zellen des

Gewebeverbandes von Explants der Zitze die chemoattraktiven Faktoren bilden, kann im Explantmodell nicht genau nachvollzogen werden. Für die Synthese von IL-8 beispielsweise könnten neben den Epithelzellen sowohl im Zitzengewebe ansässige Makrophagen, Monozyten oder Lymphozyten als auch Fibroblasten des Bindegewebes oder Endothelzellen mitverantwortlich sein. Aufschluss darüber könnten beispielsweise immunhistologische Verfahren im Tier- sowie Explantkulturmodell oder in der Zellkultur erbringen.

Fazit: Im Explantkulturmodell kann in Verbindung mit dem Chemotaxisassay die Bildung funktionell aktiver Produkte durch Zitzengewebe aufgezeigt werden. Von Nachteil ist dabei, dass nicht nachvollziehbar ist, welche Zellen im Einzelnen an der Synthese der chemoattraktiven Faktoren beteiligt sind. Von Bedeutung ist, dass in der Migrationskammer sowohl die Vitalität als auch die Immunkompetenz des untersuchten Gewebes überprüft werden kann.

3.2 IL-8 in Überständen von Explantkulturen

IL-8 gilt mit als das bedeutendste Chemokin zur Anlockung von PMN (GOUWY et al., 2005). Die Expressionsstudien in dieser (Abb. 20) und anderen Arbeiten deuten auf eine wichtige Rolle dieses Mechanismus für die Keimabwehr im Euter, speziell auch in der Zitze hin. Im Chemotaxisassay wurde gezeigt, dass Kulturüberstände von stimulierten Explants chemoattraktiv auf PMN wirken (IV.3.1). Aufgrund der mangelnden Verfügbarkeit adäquater Antikörper gegen den größten Teil boviner Chemokine sollte exemplarisch anhand von IL-8 geprüft werden, ob es von den Explants in den Kulturüberstand sezerniert wird (III.3.7).

Zunächst wurde der Quantikine[®] Human IL-8/CXCL8-ELISA-Kit nach Herstellerangaben mit Überständen von mit 20 µg/mL LPS (*E. coli* O111:B4, Sigma) stimulierten Explants und unstimulierten Explants durchgeführt. In den Proben waren IL-8-Konzentrationen im Bereich von unter 10 pg/mL messbar. Es bestand die Tendenz, dass Überstände von mit LPS stimulierten Explants mehr IL-8 enthielten, jedoch ohne einen signifikanten Unterschied. Die Konzentrationen zeigten eine sehr hohe Streuung (IV.3.2).

Daher wurde im folgenden Versuchsansatz die Methode modifiziert, indem das Probenvolumen auf 100 µL erhöht und die Inkubation des Primärantikörpers bei 4°C über 16 h erfolgte. Eingesetzt wurden ebenfalls Überstände von Explantkulturen aus den Vorversuchen, bei welchen die Stimulationsdosis

20 µg/mL LPS betrug. In den Überständen zeigten sich immer noch vergleichsweise niedrige Werte für IL-8 im Bereich von 4,2 pg/mL bis 10,4 pg/mL. Jedoch lagen die Werte stimulierter Explants signifikant höher als jene Werte von unstimulierten Explants (Tab. 15).

Daraufhin wurde ein weiterer Versuch mit Überständen von mit 1 µg/mL LPS (*E. coli* 1303) stimulierten Explants durchgeführt. Die ermittelten IL-8-Konzentrationen waren sehr gering und lagen zum Teil unter der vom Hersteller angegebenen mittleren Nachweisgrenze. Sie zeigten eine hohe Standardabweichung und es konnte kein signifikanter Unterschied in der IL-8-Konzentration in Überständen unstimulierter und mit LPS stimulierter Explants beobachtet werden. Daher wurden keine weiteren Kulturüberstände im IL-8-ELISA untersucht.

Möglicherweise lag der geringe Nachweis nicht alleine an einem ungeeigneten Testkit, sondern auch an einer eher niedrigen Dosierung des eingesetzten LPS. So konnten STRANDBERG et al. (2005) zeigen, dass die durch ELISA nachweisbare IL-8-Konzentration in Zellkulturüberständen von pbMEC von der eingesetzten LPS-Stimulationsdosis abhängig ist. WELLNITZ & KERR (2004), die auch das in dieser Arbeit eingesetzte ELISA-System verwendeten, beobachteten in den Zellkulturüberständen von pbMEC ebenfalls eine Konzentrationsabhängigkeit des IL-8 von der Stimulationsdosis. Es ist darüberhinaus sehr wahrscheinlich, dass die Explants sowohl nach Stimulation mit 20 µg/mL LPS (Sigma) als auch nach Stimulation mit 1 µg/mL LPS (*E. coli* 1303) das Chemokin IL-8 in das Medium sezerniert haben, aber nur die Stimulationsdosis von 20 µg/mL (Sigma) zu einer für die Detektion im ELISA ausreichenden IL-8-Konzentration geführt hat. Es könnte auch sein, dass der gewählte humane IL-8-ELISA für die Detektion sehr niedriger Konzentrationen von bovinem IL-8 nicht geeignet ist. So stellten LAHOUSSA et al. (2007) fest, dass die mit dem in dieser Arbeit verwendeten humanen ELISA-Kit ermittelten Werte, im Vergleich zu ihrem eigens für bovines IL-8 entwickelten ELISA, um das 300- bis 800-fache niedriger waren. Da IL-8 jedoch zumindest in Überständen von mit 20 µg/mL LPS stimulierten Explantkulturen der Zitze nachgewiesen werden konnte, kann davon ausgegangen werden, dass es als ein Faktor an der Chemotaxis der PMN im Zitzengewebe, aber auch in der Transmigrationskammer beteiligt ist.

Sehr wahrscheinlich sind auch andere chemotaktisch wirkende Faktoren, wie TNF- α , dessen Expression durch LPS-Stimulation in den Explants induziert wurde, oder andere in dieser Arbeit nicht untersuchte Faktoren, wie CXCL5 oder C5a, als Auslöser der PMN-Migration *in vitro* durch die Porenmembran beteiligt. CXCL5 ist, wie auch IL-8, ein Chemokin der CXC-Familie. Es wirkt chemotaktisch auf PMN und wird ebenfalls nach LPS-Stimulation in pbMEC induziert (PAREEK et al., 2005). Auch der Komplementfaktor C5a wirkt chemotaktisch auf PMN und induziert *in vitro* und *in vivo* die Migration von PMN durch das Milchdrüsenepithel (RAINARD & RIOLLET, 2006). LPS selbst wirkt ebenfalls potentiell chemoattraktiv (PAAPE et al., 2003). In eigenen Vorversuchen konnten jedoch keine Effekte von LPS auf das Migrationsverhalten von PMN in der Transmigrationskammer verzeichnet werden (Daten nicht gezeigt). Da sich die Darstellung der IL-8-Konzentrationen in Überständen von Zitzenexplantkulturen als schwierig erwies, könnte in weiterführenden Studien der Nachweis von durch Explants gebildeten Faktoren indirekt durch den Einsatz selektiver Chemokin-inhibitoren (z.B. anti-CXCR8-Antikörper) versucht werden.

4 Schlussbetrachtung und Ausblick

Die Explants der Zitze zeigten zwar in allen Parametern eine relativ hohe Heterogenität; insgesamt betrachtet war ihre Reaktion auf die LPS-Stimulation jedoch einheitlich. Die funktionelle Kompetenz des Zitzengewebes wird durch die Induktion immunrelevanter Gene als Reaktion auf einen bakteriellen Stimulus und die Synthese chemotaktisch aktiver Produkte bewiesen. Es kann daraus gefolgert werden, dass sich die Methode der Explantkultur für die Untersuchung früher immunologischer Vorgänge im Bereich der Zitze eignet.

Die vorliegende Arbeit ist als Baustein eines Gesamtkonzepts zur Mastitisforschung in der Arbeitsgruppe und in assoziierten Forschungsteams zu sehen. Das Explantkultursystem dient bereits jetzt als Instrument für Vortests zu Tierversuchen. Damit können diese besser vorbereitet und gezielter geplant werden. Damit wird dem Tierschutz Rechnung getragen. Außerdem ist die Kostenreduktion für entsprechende Forschungsvorhaben nicht zu unterschätzen.

Das Modellsystem der Explantkultur kann damit direkt und indirekt zum besseren Verständnis von frühen Erreger-Wirt-Interaktionen beitragen und somit Grundlagenwissen für neue Ansätze in der Mastitisbekämpfung liefern. So könnte das

Modell über die Identifizierung von Resistenzgenen bei der Zucht auf Widerstandsfähigkeit des Euters gegenüber Mastitiserregern nützlich sein. Auch könnte es nutzbare Hinweise für lokale Medikationen geben, z. B. den Einsatz von Immunmodulatoren in Phasen erhöhter Mastitisgefahr während des Trockenstellens und im Zeitraum kurz nach dem Abkalben.

Ein Schutz der Kuh vor den Folgen einer Mastitisinfektion wäre ein erheblicher Fortschritt für den Tierschutz, da somit Schmerzen und Leiden verhindert oder reduziert werden könnten. Des Weiteren könnten die ökonomischen Verluste in der Milchwirtschaft, die durch diese schwerwiegende Erkrankung entstehen, verringert werden.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Die Mastitis des Rindes ist eine der häufigsten und bedeutendsten Erkrankungen in der Milchproduktion. Sie wird überwiegend durch intramammäre Infektionen mit Bakterien hervorgerufen. Hierbei zeichnet sich vor allem *Escherichia coli* als Verursacher schwerwiegender Mastitiden aus. *E. coli* dringt über den Strichkanal in die Zitze ein. In der Milchdrüse angelangt, vermehrt sich der Erreger rasch und setzt dabei Lipopolysaccharid (LPS) frei, das als hauptverantwortlich für die Pathogenese der *E. coli*-Mastitis gilt. Über Bindung an Pathogen-Erkennungsrezeptoren induziert LPS vor allem Faktoren des angeborenen Immunsystems, dabei generieren neben residenten Immunzellen (z. B. Makrophagen) auch Milchdrüsenepithelzellen Zytokine, Chemokine und antimikrobielle Peptide. Nach Passage des Strichkanals interagieren Pathogene zuerst mit Zellen der Zitzen-schleimhaut der Fürstenberg'schen Rosette (FBR) am Übergang vom Strichkanal in die Zitzenzisterne (ZZ). Die rasche Induktion einer Immunreaktion und schnelle Elimination des eingedrungenen Pathogens scheint für die erfolgreiche Abwehr intramammärer Infektionen von entscheidender Bedeutung zu sein. Detaillierte Kenntnisse zu immunologischen Vorgängen im distalen Milchdrüsenkompartiment bei der frühen Erreger-Wirt-Interaktion werden dringend benötigt, um neue Prophylaxe- und Therapieansätze für die bovine Mastitis entwickeln zu können.

In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb ein Explantkultursystem für bovines Zitengewebe etabliert, um frühe Immunreaktionen zusammenhängender Gewebeverbände von FBR und ZZ auf einen bakteriellen Stimulus analysieren zu können. Mittels quantitativ stereologischer Untersuchungen zur Gewebezusammensetzung wurde das System auf Vergleichbarkeit der Explants geprüft. In mRNA-Expressionsstudien und im Rahmen funktioneller Versuche wurde das in-vitro-System zur Untersuchung initialer inflammatorischer Wirtsreaktionen eingesetzt. Zunächst wurden in quantitativ stereologischen Untersuchungen die Volumenanteile von Bindegewebe, Muskulatur, Epithel und Leukozyten in Explants der FBR und ZZ ermittelt. Es bestand ein signifikanter Unterschied zwischen den Lokalisationen FBR und ZZ in den Volumenanteilen von Muskelgewebe ($40\% \pm 9\%$ in ZZ $> 25\% \pm 6\%$ in FBR; $p < 0,001$) und Bindegewebe ($56\% \pm 5\%$ in FBR $> 42\% \pm 7\%$ in ZZ; $p < 0,001$). Auch die Volumenanteile von Epithel ($7\% \pm 4\%$ in FBR $> 4\% \pm 3\%$ in ZZ; $p < 0,001$) und CD11a/18-positiven Zellen ($0,03\% \pm 0,02\%$ in FBR $> 0,007\% \pm 0,006\%$ in ZZ; $p < 0,01$)

der beiden Lokalisationen unterschieden sich trotz einer hohen relativen Streuung der Anteile in einzelnen Explants signifikant. In Expressionsstudien wurden die Zitzenlokalisationen hinsichtlich ihrer mRNA-Expression proinflammatorischer Zytokine und S100-Proteine untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass LPS die Expression immunrelevanter Gene in Explants der Zitze induziert. Trotz einer relativ hohen Heterogenität der mRNA-Expression in einzelnen Explants zeigte sich für IL-8/CXCL8, RANTES/CCL5, MIP-3 α /CCL20 und TNF- α sowohl in Explants der FBR als auch der ZZ nach LPS-Stimulation ein signifikanter Anstieg der Transkriptabundanz ($p < 0,001$). Eine Steigerung der Expression der S100-Proteine S100A8, S100A9 und S100A12 war lediglich in der ZZ durch LPS induzierbar. In Explants der FBR wiesen die S100-Proteine jedoch sowohl ohne als auch mit LPS-Stimulation signifikant höhere Transkriptabundanz auf als in Explants der ZZ ($p < 0,001$). Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Lokalisationen FBR und ZZ bezüglich ihrer funktionellen Bedeutung differenziert zu betrachten sind. Sie unterstreichen die wichtige Rolle der FBR bei der frühen Erregerabwehr im Euter.

Der Nachweis chemotaktischer Produkte in Kulturüberständen von Explants der FBR und ZZ erfolgte mittels ELISA und im in-vitro-Chemotaxisassay. Mittels ELISA konnte das Chemokin IL-8/CXL8 in Überständen von Explantkulturen nach LPS-Stimulation nachgewiesen werden. Anhand der Untersuchungen zur Chemotaxis in der Transmigrationskammer konnte gezeigt werden, dass Explants der Zitze nach LPS-Stimulation chemoattraktive Produkte synthetisieren und in das Medium sezernieren. Die Kulturüberstände LPS-stimulierter Explants zeigten eine 70-fache (FBR) und 212-fache (ZZ) Steigerung ihrer chemotaktischen Kapazität gegenüber bovinen PMN ($p < 0,001$).

Erstmals konnte im Explantkultursystem somit gezeigt werden, dass FBR und ZZ Syntheseorte früher immunrelevanter Faktoren sind. Es findet bereits dort eine Induktion proinflammatorischer und chemotaktischer Mediatoren statt. Das Explantkultursystem aus Geweben der bovinen Zitze eignet sich hierbei sehr gut als ein Modell zur Analyse früher Erreger-Wirt-Interaktionen bei der Mastitis. Es bietet dabei definierte in-vitro-Bedingungen, entspricht aber besser den morphologischen und funktionellen Gegebenheiten des Zellverbands *in vivo* als die Zellkultur. Als ergänzendes Instrument dient es auch zur Reduktion der weiterhin notwendigen Mastitismodell-Experimente am Tier. Explantexperimente können zukünftig zur Aufklärung initialer Vorgänge bei der Mastitis und damit zur Entwicklung neuer immunmodulatorischer Therapie- und Prophylaxemaßnahmen bei dieser verlustreichen Erkrankung beitragen.

VII. SUMMARY

Monique Lind (2011): **Development and application of a teat explant culture model for analyzing initial events during bovine mastitis**

Mastitis is one of the most common diseases in dairy cattle, which has major financial effects on dairy production. Intramammary bacterial infection is a primary cause of acute mastitis and the main bacteria involved are *Escherichia coli*. Once entered the mammary gland through the teat canal, the pathogen multiplies quickly and produces the endotoxine LPS, generally considered to be responsible for the pathogenesis of *E. coli* mastitis. After binding to pathogen receptors, LPS primarily induces innate immune responses and, in consequence, resident immune cells (such as macrophages) and mammary epithelial cells start to produce cytokines, chemokines and antimicrobial peptides. Having entered the mammary gland through the teat canal, pathogens first interact with teat mucosa in the Furstenberg's Rosette (FR), where the teat canal ends and the teat cistern (TC) starts. The rapid induction of an immune response and the subsequent elimination of invading pathogens seem to have a crucial role in effectively fighting intramammary infections. Detailed knowledge regarding immunological processes in the distal compartment of the mammary gland in the early phase of pathogen-host interaction is extremely important for the development of new successful strategies in mastitis prophylaxis and therapy.

The aim of study was to establish an explant-culture system for bovine teat tissue, in order to analyze early immune responses of FR and TC tissue on bacterial stimulus. With the help of a quantitative stereological analysis of the tissue constitution, the system was examined with respect to the question, whether the explants are comparable. In the course of mRNA expression analysis and functional experiments, the *in vitro* system was chosen, in order to examine the initial host immuno-inflammatory response. First of all, quantitative stereological analysis was used to determine the volume densities of connective tissue, musculature, epithelium and leukocytes in the explants of the FR and the TC. The explants of the FR and the TC significantly differed with respect to the volume densities of muscular tissue ($40\% \pm 9\%$ in TC $> 25\% \pm 6\%$ in FR; $p < 0.001$) and connective tissue ($56\% \pm 5\%$ in FR $> 42\% \pm 7\%$ in TC; $p < 0.001$). Furthermore, despite a high relative dispersion of the volume densities in different explants, there was a significant difference between the volume densities of epithelium ($7\% \pm 4\%$ in FR $> 4\% \pm 3\%$ in TC; $p < 0.001$) and

CD11a/18-positive cells ($0.03 \% \pm 0.02 \%$ in FR $> 0.007 \% \pm 0.006 \%$ in TC; $p < 0.01$). Expression analyses served to examine the teat localizations with respect to their mRNA expression of proinflammatory cytokines and S100-proteins. It turned out, that LPS induces the expression of immune-relevant genes in explants of the teat. Despite a high heterogeneity of mRNA expression in various explants, after LPS stimulation, there was a significant rise in transcript abundances of IL-8/CXCL8, RANTES/CCL5, MIP-3 α /CCL20 and TNF- α in the explants of the FR and the TC ($p < 0.001$). A higher expression of the S100-proteins S100A8, S100A9 and S100A12 was only inducible by LPS in explants of the TC. However, there was a significantly higher abundance of mRNA transcripts in explants of the FR than in explants of the TC, both with and without LPS stimulation ($p < 0.001$). These results suggest that the explants of the FR and the TC have to be examined separately with respect to their function. They underline the FC's importance for the host defence of the udder against infectious mastitis. An IL-8-ELISA and a Chemotaxis assay served as evidence for chemoattractant factors in supernatants of the explant cultures of the FR and the TC. After LPS stimulation culture supernatants contained the chemokine IL-8/CXCL8. The results of the chemotaxis assay show that LPS stimulation makes the explants of the teat synthesize and secrete chemoattractant products. Culture supernatants of LPS stimulated explants expose a 70 times (FR) and 212 times (TC) higher chemotactic capacity as opposed to bovine PMN ($p < 0.001$).

For the first time, it was proven with the help of an explant culture system, that the synthesis of important early immune-relevant factors takes place within the FR and the TC. Proinflammatory and chemoattractive mediators are already induced there. The bovine teat tissue explant culture system is a useful model for the analysis of early mastitis pathogen-host interactions. It offers defined *in vitro* conditions, but at the same time, it better corresponds to the morphological and functional characteristics of the *in vivo* situation, than the cell culture does. Furthermore, it is a supplementary instrument, which helps to reduce the number of mastitis model experiments performed on animals, which is, however, still necessary. In the future, explant experiments can help to improve the understanding of initial mechanisms of mastitis, and can therefore facilitate the development of new immunomodulatory strategies in prophylaxis and therapy of mastitis.

(Supported by DFG FOR 585)

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

Adams EW, Rickard CG, Murphy JM. Some histological and histochemical observations on bovine teat epithelium. *Cornell Vet* 1961; 51: 124-54.

Bach PH, Vickers AEM, Fisher R, Baumann A, Brittebo E, Carlile DJ, Koster HJ, Lake BG, Salmon F, Sawyer TW, Skibinski G. The Use of Tissue Slices for Pharmacotoxicological Studies - The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 20. *ATLA* 1996; 24: 893-923.

Bannerman DD, Paape MJ, Goff JP, Kimura K, Lippolis JD, Hope JC. Innate immune response to intramammary infection with *Serratia marcescens* and *Streptococcus uberis*. *Vet Res* 2004a; 35: 681-700.

Bannerman DD, Paape MJ, Lee JW, Zhao X, Hope JC, Rainard P. *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* elicit differential innate immune responses following intramammary infection. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004b; 11: 463-72.

Bannerman DD. Pathogen-dependent induction of cytokines and other soluble inflammatory mediators during intramammary infection of dairy cows. *J Anim Sci* 2009; 87: 10-25.

Barash I, Faerman A, Richenstein M, Kari R, Damary GM, Shani M, Bissell MJ. In vivo and in vitro expression of human serum albumin genomic sequences in mammary epithelial cells with beta-lactoglobulin and whey acidic protein promoters. *Mol Reprod Dev* 1999; 52: 241-52.

Baumgard LH, Matitashvili E, Corl BA, Dwyer DA, Bauman DE. trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid decreases lipogenic rates and expression of genes involved in milk lipid synthesis in dairy cows. *J Dairy Sci* 2002; 85: 2155-63.

Bexiga R, Pereira H, Pereira O, Leitao A, Carneiro C, Ellis KA, Vilela CL. Observed reduction in recovery of *Corynebacterium* spp. from bovine milk samples by use of a teat cannula. *J Dairy Res* 2011; 78: 9-14.

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: 191-9.

Boyden S. The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *J Exp Med* 1962; 115: 453-66.

Bradley A. Bovine mastitis: an evolving disease. *Vet J* 2002; 164: 116-28.

Bradley AJ, Green MJ. Adaptation of *Escherichia coli* to the bovine mammary gland. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 1845-9.

Brennan AJ, Sharp JA, Lefevre CM, Nicholas KR. Uncoupling the mechanisms that facilitate cell survival in hormone-deprived bovine mammary explants. *J Mol Endocrinol* 2008; 41: 103-16.

Burnett R, Guichard Y, Barale E. Immunohistochemistry for light microscopy in safety evaluation of therapeutic agents: an overview. *Toxicology* 1997; 119: 83-93.

Burvenich C, Van Merris V, Mehrzad J, Diez-Fraile A, Duchateau L. Severity of *E. coli* mastitis is mainly determined by cow factors. *Vet Res* 2003; 34: 521-64.

Caroff M, Karibian D. Structure of bacterial lipopolysaccharides. *Carbohydr Res* 2003; 338: 2431-47.

Champaiboon C, Sappington KJ, Guenther BD, Ross KF, Herzberg MC. Calprotectin S100A9 calcium-binding loops I and II are essential for keratinocyte resistance to bacterial invasion. *J Biol Chem* 2009; 284: 7078-90.

Charbonnier AS, Kohrgruber N, Kriehuber E, Stingl G, Rot A, Maurer D. Macrophage inflammatory protein 3alpha is involved in the constitutive trafficking of epidermal langerhans cells. *J Exp Med* 1999; 190: 1755-68.

Cifrian E, Guidry AJ, O'Brien CN, Keys JE, Jr., Marquardt WW. Bovine mammary teat and ductal epithelial cell cultures. *Am J Vet Res* 1994; 55: 239-46.

Concha C. Cell types and their immunological functions in bovine mammary tissues and secretions--a review of the literature. *Nord Vet Med* 1986; 38: 257-72.

Dahme E, Weiss E (2007) *Grundriss der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere* 6., völlig neu bearb. Aufl. edn. Enke-Verlag, Stuttgart. XV, 436 S. Ill.

Darcy KM, Zangani D, Shea-Eaton W, Shoemaker SF, Lee PP, Mead LH, Mudipalli A, Megan R, Ip MM. Mammary fibroblasts stimulate growth, alveolar morphogenesis, and functional differentiation of normal rat mammary epithelial cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2000; 36: 578-92.

Dosogne H, Vangroenweghe F, Mehrzad J, Massart-Leen AM, Burvenich C. Differential leukocyte count method for bovine low somatic cell count milk. *J Dairy Sci* 2003; 86: 828-34.

Düvel A. Untersuchungen zur Prostaglandin E₂- beeinflussten Differenzierung boviner Monozyten in Makrophagen. Inaugural Dissertation, Hannover, 2010

Fahrmeir L, Kneib T, Lang S (2009) *Regression: Modelle, Methoden und Anwendungen*, 2. Auflage edn. Springer Verlag, Berlin

Fehlings P. Kranke Euter kosten Geld. *Bayerisches Landwirtschaftliches Wochenblatt* 2008; 198: 22-4.

Fekry AE, Keys JE, Capuco AV, Bitman J, Wood DL, Miller RH. Effect of bovine growth hormone on incorporation of [14C]acetate into lipids by co-cultures of bovine mammary, liver, and adipose tissue explants. *Domest Anim Endocrinol* 1989; 6: 87-94.

Filipp D, Alizadeh-Khiavi K, Richardson C, Palma A, Paredes N, Takeuchi O, Akira S, Julius M. Soluble CD14 enriched in colostrum and milk induces B cell growth and differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 603-8.

Flaherty SF, Golenbock DT, Milham FH, Ingalls RR. CD11/CD18 leukocyte integrins: new signaling receptors for bacterial endotoxin. *J Surg Res* 1997; 73: 85-9.

Foell D, Wittkowski H, Vogl T, Roth J. S100 proteins expressed in phagocytes: a novel group of damage-associated molecular pattern molecules. *J Leukoc Biol* 2007; 81: 28-37.

Frosch M, Strey A, Vogl T, Wulffraat NM, Kuis W, Sunderkotter C, Harms E, Sorg C, Roth J. Myeloid-related proteins 8 and 14 are specifically secreted during interaction of phagocytes and activated endothelium and are useful markers for monitoring disease activity in pauciarticular-onset juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 628-37.

Frosch M, Metze D, Foell D, Vogl T, Sorg C, Sunderkotter C, Roth J. Early activation of cutaneous vessels and epithelial cells is characteristic of acute systemic onset juvenile idiopathic arthritis. *Exp Dermatol* 2005; 14: 259-65.

Glaser R, Harder J, Lange H, Bartels J, Christophers E, Schroder JM. Antimicrobial psoriasin (S100A7) protects human skin from *Escherichia coli* infection. *Nat Immunol* 2005; 6: 57-64.

Goebeler M, Roth J, Teigelkamp S, Sorg C. The monoclonal antibody MAC387 detects an epitope on the calcium-binding protein MRP14. *J Leukoc Biol* 1994; 55: 259-61.

Goldammer T, Zerbe H, Molenaar A, Schuberth HJ, Brunner RM, Kata SR, Seyfert HM. 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: 174-85.

Gottsch JD, Li Q, Ashraf F, O'Brien TP, Stark WJ, Liu SH. Cytokine-induced calgranulin C expression in keratocytes. *Clin Immunol* 1999; 91: 34-40.

Gouwy M, Struyf S, Proost P, Van Damme J. Synergy in cytokine and chemokine networks amplifies the inflammatory response. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005; 16: 561-80.

Goyette J, Geczy CL. Inflammation-associated S100 proteins: new mechanisms that regulate function. *Amino Acids* 2010.

Griesbeck-Zilch B, Meyer HH, Kuhn CH, Schwerin M, Wellnitz O. *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* cause deviating expression profiles of cytokines and lactoferrin messenger ribonucleic acid in mammary epithelial cells. *J Dairy Sci* 2008; 91: 2215-24.

Gunther J, Koczan D, Yang W, Nurnberg G, Repsilber D, Schuberth HJ, Park Z, Maqbool N, Molenaar A, Seyfert HM. Assessment of the immune capacity of mammary epithelial cells: comparison with mammary tissue after challenge with *Escherichia coli*. *Vet Res* 2009; 40: 31.

Harms V (1998) *Biomathematik, Statistik und Dokumentation: eine leichtverständliche Einführung*. Harms Verlag, Kiel-Mönkeberg

Hebert CA, Baker JB. Interleukin-8: a review. *Cancer Invest* 1993; 11: 743-50.

Heizmann CW, Fritz G, Schafer BW. S100 proteins: structure, functions and pathology. *Front Biosci* 2002; 7: d1356-68.

Hibbitt KG, Cole CB, Reiter B. Antimicrobial proteins isolated from the teat canal of the cow. *J Gen Microbiol* 1969; 56: 365-71.

Hofmann MA, Drury S, Hudson BI, Gleason MR, Qu W, Lu Y, Lalla E, Chitnis S, Monteiro J, Stickland MH, Bucciarelli LG, Moser B, Moxley G, Itescu S, Grant PJ, Gregersen PK, Stern DM, Schmidt AM. RAGE and arthritis: the G82S polymorphism amplifies the inflammatory response. *Genes Immun* 2002; 3: 123-35.

Hogan J, Larry Smith K. Coliform mastitis. *Vet Res* 2003; 34: 507-19.

Hogeveen H, Huijps K, Lam TJ. Economic aspects of mastitis: New developments. *N Z Vet J* 2011; 59: 16-23.

Hom YK, Bandyopadhyay GK, Levay-Young BK, Nandi S. Adenosine-mediated inhibition of casein production by mouse mammary glands in culture. *J Cell Physiol* 1996; 168: 314-21.

Homey B, Dieu-Nosjean MC, Wiesenborn A, Massacrier C, Pin JJ, Oldham E, Catron D, Buchanan ME, Muller A, deWaal Malefyt R, Deng G, Orozco R, Ruzicka T, Lehmann P, Lebecque S, Caux C, Zlotnik A. Up-regulation of macrophage inflammatory protein-3 alpha/CCL20 and CC chemokine receptor 6 in psoriasis. *J Immunol* 2000; 164: 6621-32.

Hurley WL, Rejman JJ. Bovine lactoferrin in involuting mammary tissue. *Cell Biol Int* 1993; 17: 283-9.

Huynh H, Pollak M. HH2A, an immortalized bovine mammary epithelial cell line, expresses the gene encoding mammary derived growth inhibitor (MDGI). *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 1995; 31: 25-9.

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: 191-9.

J. M. Treece GEM, and C. Llevy Lipid analyses of bovine teat canal keratin. *Journal of Dairy Science* 1966; 49: 1240.

J. Riedl EK, M. Müller, S. Seidl, R.Stolla, W. Hermanns Endoskopische, pathologisch-anatomische und histologische Befunde an der Rinderzitze 2. Veränderungen im Bereich der Fürstenbergschen Rosette. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* 2004; 111: 423 - 9.

Juergens WG, Stockdale FE, Topper YJ, Elias JJ. Hormone-dependent differentiation of mammary gland in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1965; 54: 629-34.

Kalivoda EM. Funktionelle Untersuchungen zur Endotoxintoleranz bei der Mastitis des Rindes. Inaugural-Dissertation, München, 2010

Keys JE, Capuco AV, Wood DL. Lipid synthesis by co-cultures of mammary, liver, and adipose tissue explants from sometribove (recombinant methionyl bovine somatotropin)-treated dairy cows. *In Vitro Cell Dev Biol* 1991; 27A: 249-52.

Koess C, Hamann J. Detection of mastitis in the bovine mammary gland by flow cytometry at early stages. *J Dairy Res* 2008; 75: 225-32.

Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonak J, Lind K, Sindelka R, Sjoback R, Sjogreen B, Strombom L, Stahlberg A, Zoric N. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* 2006; 27: 95-125.

Kuckartz U (2010) Statistik. Eine verständliche Einführung. VS Verlag für Sozialwissenschaften, Wiesbaden

Lahouassa H, Moussay E, Rainard P, Riollet C. Differential cytokine and chemokine responses of bovine mammary epithelial cells to *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Cytokine* 2007; 38: 12-21.

Liebich H-G (1999) Funktionelle Histologie der Haussäugetiere: Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis. Schattauer, Stuttgart; New York

Lutzow YC, Donaldson L, Gray CP, Vuocolo T, Pearson RD, Reverter A, Byrne KA, Sheehy PA, Windon R, Tellam RL. Identification of immune genes and proteins involved in the response of bovine mammary tissue to *Staphylococcus aureus* infection. *BMC Vet Res* 2008; 4: 18.

Mackenzie DD, Forsyth IA, Brooker BE, Turvey A. Culture of bovine mammary epithelial cells on collagen gels. *Tissue Cell* 1982; 14: 231-41.

MacKenzie DD, Brooker BE, Forsyth I. Ultrastructural features of bovine mammary epithelial cells grown on collagen gels. *Tissue Cell* 1985; 17: 39-51.

Matitashvili E, Bramley AJ, Zavizion B. An in vitro approach to ruminant mammary gland biology. *Biotechnol Adv* 1997; 15: 17-41.

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: 1590-7.

Menzies KK, Lefevre C, Macmillan KL, Nicholas KR. Insulin regulates milk protein synthesis at multiple levels in the bovine mammary gland. *Funct Integr Genomics* 2009; 9: 197-217.

Mitterhuemer S, Petzl W, Krebs S, Mehne D, Klanner A, Wolf E, Zerbe H, Blum H. *Escherichia coli* infection induces distinct local and systemic transcriptome responses in the mammary gland. *BMC Genomics* 2010; 11: 138.

Mosimann W, Kohler T (1990) Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie. edn. Paul Parey Verlag, Berlin und Hamburg

Mount JA, Karrow NA, Caswell JL, Boermans HJ, Leslie KE. Assessment of bovine mammary chemokine gene expression in response to lipopolysaccharide, lipotechoic acid + peptidoglycan, and CpG oligodeoxynucleotide 2135. *Can J Vet Res* 2009; 73: 49-57.

Neuvians TP, Schams D, Berisha B, Pfaffl MW. Involvement of pro-inflammatory cytokines, mediators of inflammation, and basic fibroblast growth factor in prostaglandin F2 α -induced luteolysis in bovine corpus luteum. *Biol Reprod* 2004; 70: 473-80.

Nickerson SC, Pankey JW. Cytologic observations of the bovine teat end. *Am J Vet Res* 1983; 44: 1433-41.

Niku M, Ekman A, Pessa-Morikawa T, Iivanainen A. Identification of major cell types in paraffin sections of bovine tissues. *BMC Vet Res* 2006; 2: 5.

Ohtsuka H, Kudo K, Mori K, Nagai F, Hatsugaya A, Tajima M, Tamura K, Hoshi F, Koiwa M, Kawamura S. Acute phase response in naturally occurring coliform mastitis. *J Vet Med Sci* 2001; 63: 675-8.

Paape M, Mehrzad J, Zhao X, Detilleux J, Burvenich C. Defense of the bovine mammary gland by polymorphonuclear neutrophil leukocytes. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2002; 7: 109-21.

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

Pareek R, Wellnitz O, Van Dorp R, Burton J, Kerr D. Immunorelevant gene expression in LPS-challenged bovine mammary epithelial cells. *J Appl Genet* 2005; 46: 171-7.

Petzl W, Zerbe H, Gunther J, Yang W, Seyfert HM, Nurnberg G, Schuberth HJ. *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.

Pounden WD, Grossman JD. Wall structure and closing mechanisms of the bovine teat. *Am J Vet Res* 1950; 11: 349-54.

Pyorala S. Mastitis in post-partum dairy cows. *Reprod Domest Anim* 2008; 43 Suppl 2: 252-9.

Rabot A, Wellnitz O, Meyer HH, Bruckmaier RM. Use and relevance of a bovine mammary gland explant model to study infection responses in bovine mammary tissue. *J Dairy Res* 2007; 74: 93-9.

Radbruch A (2000) *Flow cytometry and cell sorting*, 2nd edn. Springer, Berlin; New York. xxiii, 355 p.

Rainard P, Riollot C. Innate immunity of the bovine mammary gland. *Vet Res* 2006; 37: 369-400.

Regenhard P, Petzl W, Zerbe H, Sauerwein H. The antibacterial psoriasin is induced by *E. coli* infection in the bovine udder. *Vet Microbiol* 2010; 143: 293-8.

Rinaldi M, Li RW, Bannerman DD, Daniels KM, Evock-Clover C, Silva MV, Paape MJ, Van Ryssen B, Burvenich C, Capuco AV. A sentinel function for teat tissues in dairy cows: dominant innate immune response elements define early response to *E. coli* mastitis. *Funct Integr Genomics* 2010; 10: 21-38.

Riollot 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: 161-7.

Rolle M, Mayr A (1966) Mikrobiologie und allgemeine Seuchenlehre. Lehrbuch für Tierärzte und Studierende der Tiermedizin, 3., umgearb. Aufl. edn. Enke, Stuttgart,. xx, 806 p.

Romeis B (1968) Mikroskopische Technik, 16., neubearb. und verb. Aufl. edn. Oldenbourg, München, Wien,. 757 p.

Rosenberger G (1990) Die klinische Untersuchung des Rindes, 3. edn. Parey, Hamburg

Roth J, Vogl T, Sorg C, Sunderkotter C. Phagocyte-specific S100 proteins: a novel group of proinflammatory molecules. Trends Immunol 2003; 24: 155-8.

Royet JP. Stereology: a method for analyzing images. Prog Neurobiol 1991; 37: 433-74.

Shafer-Weaver KA, Sordillo LM. Bovine CD8+ suppressor lymphocytes alter immune responsiveness during the postpartum period. Vet Immunol Immunopathol 1997; 56: 53-64.

Shamay A, Cohen N, Niwa M, Gertler A. Effect of insulin-like growth factor I on deoxyribonucleic acid synthesis and galactopoiesis in bovine undifferentiated and lactating mammary tissue in vitro. Endocrinology 1988; 123: 804-9.

Shamay A, Homans R, Fuerman Y, Levin I, Barash H, Silanikove N, Mabeesh SJ. Expression of albumin in nonhepatic tissues and its synthesis by the bovine mammary gland. J Dairy Sci 2005; 88: 569-76.

Shen-Orr SS, Tibshirani R, Khatri P, Bodian DL, Staedtler F, Perry NM, Hastie T, Sarwal MM, Davis MM, Butte AJ. Cell type-specific gene expression differences in complex tissues. Nat Methods 2010; 7: 287-9.

Shuster DE, Kehrlı ME, Jr., Rainard P, Paape M. Complement fragment C5a and inflammatory cytokines in neutrophil recruitment during intramammary infection with *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1997; 65: 3286-92.

Sordillo LM, Shafer-Weaver K, DeRosa D. Immunobiology of the mammary gland. *J Dairy Sci* 1997; 80: 1851-65.

Sordillo LM, Streicher KL. Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2002; 7: 135-46.

Strandberg Y, Gray C, Vuocolo T, Donaldson L, Broadway M, Tellam R. Lipopolysaccharide and lipoteichoic acid induce different innate immune responses in bovine mammary epithelial cells. *Cytokine* 2005; 31: 72-86.

Tanaka Y, Imai T, Baba M, Ishikawa I, Uehira M, Nomiya H, Yoshie O. Selective expression of liver and activation-regulated chemokine (LARC) in intestinal epithelium in mice and humans. *Eur J Immunol* 1999; 29: 633-42.

Taylor BC, Dellinger JD, Cullor JS, Stott JL. Bovine milk lymphocytes display the phenotype of memory T cells and are predominantly CD8+. *Cell Immunol* 1994; 156: 245-53.

Tetens J, Friedrich JJ, Hartmann A, Schwerin M, Kalm E, Thaller G. The spatial expression pattern of antimicrobial peptides across the healthy bovine udder. *J Dairy Sci* 2010; 93: 775-83.

Thomas LH, Leigh JA, Bland AP, Cook RS. Adherence and colonization by bacterial pathogens in explant cultures of bovine mammary tissue. *Vet Res Commun* 1992; 16: 87-96.

Vogl T, Propper C, Hartmann M, Strey A, Strupat K, van den Bos C, Sorg C, Roth J. S100A12 is expressed exclusively by granulocytes and acts independently from MRP8 and MRP14. *J Biol Chem* 1999; 274: 25291-6.

Warburg O. Versuche an überlebendem Karzinomgewebe. *Biochemische Zeitung* 1923; 142: 317-33.

Weibel ER (1979) *Stereological methods*. Academic Press, London ; New York

Wellnitz O, Kerr DE. Cryopreserved bovine mammary cells to model epithelial response to infection. *Vet Immunol Immunopathol* 2004; 101: 191-202.

Widdison S, Watson M, Piercy J, Howard C, Coffey TJ. Granulocyte chemotactic properties of *M. tuberculosis* versus *M. bovis*-infected bovine alveolar macrophages. *Mol Immunol* 2008; 45: 740-9.

Yang J, Kennelly JJ, Baracos VE. The activity of transcription factor Stat5 responds to prolactin, growth hormone, and IGF-I in rat and bovine mammary explant culture. *J Anim Sci* 2000; 78: 3114-25.

Yang W, Zerbe H, Petzl W, Brunner RM, Gunther J, Draing C, von Aulock S, Schuberth HJ, Seyfert HM. 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: 1385-97.

Zavizion B, Politis I, Gorewit RC. Bovine mammary myoepithelial cells. 2. Interactions with epithelial cells in vitro. *J Dairy Sci* 1992a; 75: 3381-93.

Zavizion B, Politis I, Gorewit RC. Bovine mammary myoepithelial cells. 1. Isolation, culture, and characterization. *J Dairy Sci* 1992b; 75: 3367-80.

Zavizion B, Gorewit RC, Politis I. Subcloning the MAC-T bovine mammary epithelial cell line: morphology, growth properties, and cytogenetic analysis of clonal cells. *J Dairy Sci* 1995; 78: 515-27.

Zavizion B, van Duffelen M, Schaeffer W, Politis I. Establishment and characterization of a bovine mammary epithelial cell line with unique properties. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 1996; 32: 138-48.

IX. DANKSAGUNG

Zunächst möchte ich mich besonders bei Herrn Prof. Dr. Holm Zerbe für die Überlassung des Themas und das in mich gesetzte Vertrauen herzlich bedanken. Außerdem danke ich für die umfassende und umsichtige Betreuung. Durch konstruktive Vorschläge und das Knüpfen von Kontakten hat er die Arbeit wesentlich vorangebracht.

Im besonderen Maße bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. Hans-Joachim Schuberth für die Betreuung des molekularbiologischen und immunologischen Teilprojekts dieser Arbeit. Ohne seinen geistigen Input und seinen Scharfsinn wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen.

Recht herzlich bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. Rüdiger Wanke für das Ermöglichen der Durchführung von quantitativ stereologischen Untersuchungen am Institut für Tierpathologie der Ludwig-Maximilians-Universität München und die Anregungen zu dieser Arbeit.

Ein außerordentlicher Dank gilt Dr. Wolfram Petzl für die hervorragende Betreuung. Auftretende Probleme und Fragen hat er durch seine Kompetenz und mit viel Tatendrang und Optimismus jederzeit beseitigen können. Auch Zweifel und Niedergeschlagenheit konnte er schnell in Zuversicht verwandeln.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Dr. Anja Sipka dafür bedanken, dass sie mir in Hannover die molekularbiologischen Techniken beibrachte, mir dabei und darüber hinaus mit Rat und Tat zur Seite stand und während meiner Zeit in Hannover, auch außerhalb des Labors, dafür sorgte, dass ich mich wohl fühlte.

Ein spezielles Dankeschön geht an Dr. Andreas Blutke für die kompetente Betreuung der quantitativ stereologischen Untersuchungen. Mit enormen Einsatz und immer wieder neuen Ideen hat er mich dazu gebracht tausende Punkte zu zählen. Geduldig hat er erklärt und korrigiert und entscheidend zu dem Entstehen dieser Arbeit beigetragen.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) danke ich für die Finanzierung des Projektes.

Bedanken möchte ich mich bei Dr. Carola Sauter-Louis für die statistische Auswertung und bei Dr. Oliver Stadler für die Hilfe bei der Formatierung.

Ein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. Harald Kyri für das Ermöglichen der Probenentnahmen am Schlachthof der Firma A. Moksel AG in Buchloe. Durch sein Engagement konnte diese Arbeit überhaupt erst in dem vorliegenden Rahmen durchgeführt werden. Ganz besonders möchte ich mich auch bei den übrigen Mitarbeitern des Schlachthofs bedanken, die uns sehr unkompliziert und hilfsbereit bei den Untersuchungen der Tiere und den Probenentnahmen unterstützt haben.

Bei Katharina Mühlbauer möchte ich mich von ganzem Herzen für die schöne Zeit als „Mastitis-Team“, für die tatkräftige Unterstützung bei der Probenentnahme am Schlachthof, sowie für das Korrekturlesen bedanken.

Bei Dr. Eva Kalivoda möchte ich mich herzlich für die gründliche Einweisung in die Arbeit im Zelllabor und die Anleitung und Unterstützung bei meinen ersten Versuchen bedanken. Bei Dr. Tobias Pfister bedanke ich mich für die freundliche Unterstützung während der Einarbeitungszeit in der Klinik.

Bedanken möchte ich mich auch bei Frau Christina Beyer und Frau Bernica Kubat für die Unterstützung im Zelllabor. Ein ausdrücklicher Dank gilt auch Dr. Frank Weber für seinen unermüdlichen Einsatz bei Fragen und Problemen im Labor.

Bei den Mitarbeitern der AG Immunologie der TiHo Hannover möchte ich mich für die freundliche Aufnahme und die Unterstützung im Labor bedanken.

Den Mitarbeitern des Instituts für Tierpathologie der LMU München danke ich ebenfalls für die Unterstützung während meiner Arbeit dort. Expliziter Dank gilt dabei Dr. Tanja Poth, Dr. Pierre Börjes, Frau Lisa Pichl und Frau Elisabeth Kemper.

Beim Tierärzteteam der Klinik für Wiederkäuer möchte ich mich für die schöne und lehrreiche Zeit in der Klinik bedanken. Dem Pfligenteam danke ich für die gute Zusammenarbeit, besonders bei der Blutentnahme an Versuchstieren. Ein großer Dank gilt auch den ehemaligen und aktuellen Doktoranden und Doktorandinnen. Die gute Zusammenarbeit und die gegenseitige Unterstützung, sowie das freundschaftliche Miteinander haben mir das Doktoranden-Dasein erleichtert und verschönert. Zutiefst bedanken möchte ich mich auch bei Frau Rita Radloff für die stetige Hilfe bei organisatorischen und anderen Fragen.

Ein großes Dankeschön geht an Agnes Sonta für die außerordentliche Hilfe bei der Übersetzung der Zusammenfassung.

Ich danke meiner Familie für den bedingungslosen Rückhalt und die seelische Unterstützung. Bei meinem Vater Uwe Lind bedanke ich mich außerdem insbesondere herzlich für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Bei Volker Bickert bedanke ich mich von ganzem Herzen für das Korrekturlesen und die wertvollen Computer-Tips, außerdem für geduldiges Zuhören und vor allem für die schöne gemeinsame Zeit. Sie hat mir die nötige Kraft gegeben, um mit vollem Einsatz weiterzumachen.

Ein ganz besonders herzlicher Dank gilt Katharina Waldmüller, nicht nur für unzählige Fahrten zum Schlachthof und die Hilfe bei der Probenentnahme, sondern auch dafür, dass ich in ihr von Anfang an eine tolle Partnerin zur gemeinsamen Bewältigung der Tücken einer Doktorarbeit hatte.