

Aus dem Institut für Tieranatomie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Lehrstuhl für Tieranatomie II  
Vorstand: Prof. Dr. Dr. Fred Sinowatz

Angefertigt unter Leitung von  
Prof. Dr. Dr. Fred Sinowatz

**Histologische und immunhistochemische Untersuchungen zur Involution der  
Milchdrüse des Rindes (*Bos taurus*)**

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

von  
Joseph Meissner  
aus  
Liverpool

München 2006

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. E. P. Märtlbauer

Referent: Univ.-Prof. Dr. Dr. F. Sinowatz

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. H. Zerbe

Tag der Promotion: 10. Februar 2006

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>Seite</b>
<b>1. Einleitung</b>	6
<b>2. Literaturübersicht</b>	7
<b>2.1 Makroskopische Anatomie der Milchdrüse</b>	7
2.1.1. Milchdrüse	7
2.1.2 Gefäßversorgung	9
2.1.2.1 Arterien der Milchdrüse	9
2.1.2.2 Venen der Milchdrüse	10
2.1.2.3 Lymphgefäße der Milchdrüse	11
2.1.3 Nervenversorgung	11
<b>2.2 Mikroskopische Anatomie der Milchdrüse</b>	12
<b>2.3 Physiologie der Mamma</b>	14
2.3.1 Entwicklung und Funktion der Milchdrüse	14
2.3.1.1 Pränatale Entwicklung der Milchdrüse	14
2.3.1.2 Lactogenese (Einsetzen der Milchsekretion)	18
2.3.1.3 Milchejektion (Einschießen der Milch)	18
2.3.1.4 Galactopoesis (Fortsetzung der Milchsekretion)	18
2.3.1.5 Involution (Rückbildung)	19
<b>2.4 Apoptose in der Mamma</b>	22
2.4.1 Induktion der Apoptose	22
2.4.2 Ausführung der Apoptose	28
2.4.3 Clearance: die letzte Phase der Apoptose	30
2.4.4 Zelluläre Proliferation	31
<b>3. Material und Methoden</b>	33
<b>3.1 Untersuchungsmaterial</b>	33
<b>3.2 Probenentnahme</b>	33
<b>3.3 Fixierung und Probenaufbereitung</b>	34
<b>3.4 Histologische Untersuchungsmethoden</b>	34

3.4.1 Konventionelle histologische Färbungen	34
3.4.2 Immunhistochemische Färbungen	35
3.4.2.1 Avidin-Biotin-Methode	36
3.4.2.2 FITC-DAPI-Methode	38
3.4.2.3 APAAP-Methode	39
3.4.2.4 TUNEL	40
<b>4. Ergebnisse</b>	<b>43</b>
<b>4.1 Histomorphologie</b>	<b>43</b>
<b>4.2 Immunhistochemie</b>	<b>48</b>
4.2.1 Östrogenrezeptor	48
4.2.2 Progesteronrezeptor	53
4.2.3 Vimentin	58
4.2.4 Caspase – 3	61
4.2.5 Ki – 67	65
4.2.6 MIF	70
4.2.7 Gal – 3	73
4.2.8 Bax	78
4.2.9 Bcl – 2	81
4.2.10 CD4 / CD8	83
4.2.11 TUNEL	89
<b>5. Diskussion</b>	<b>93</b>
<b>6. Zusammenfassung</b>	<b>104</b>
<b>7. Summary</b>	<b>106</b>
<b>8. Verzeichnisse</b>	<b>108</b>
<b>8.1 Literaturverzeichnis</b>	<b>108</b>
<b>8.2 Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>139</b>
<b>9. Anhang</b>	<b>142</b>

**10. Danksagung**

144

**11. Lebenslauf**

145

## 1. Einleitung

Der programmierte Zelltod spielt eine wichtige Rolle bei der normalen Entwicklung der Milchdrüse. Der Zelltod fungiert als Gegengewicht zur Zellproliferation. Apoptose des Milchdrüsenepithels kann während der embryonalen Entwicklung, nach Vollendung des Wachstums in der Pubertät, im Zyklusverlauf, in der Laktationsperiode und in der Involution beobachtet werden. Während der Umstrukturierung des Milchdrüsenorgans in der Involutionsphase tritt die Apoptose besonders deutlich in Erscheinung. Die meisten Studien beziehen sich auf Ergebnisse, die der Untersuchung muriner Milchdrüsen entstammen. Im Unterschied zur Maus, ist das Rind in der Regel während der Involutionsphase trächtig und besitzt somit einen anderen hormonellen Status.

An der Regulierung der Apoptose sind eine Vielzahl von Proteinen beteiligt. Untersuchungen haben gezeigt, dass es sich um sehr komplexe Regelmechanismen handelt. Es existieren mehrere Proteine, die als intrazelluläre Mediatoren von Signalen, die die Apoptose der Milchdrüsenepithelzellen einleiten, eine Rolle spielen. Ziel meiner Untersuchungen, war es, das Ausmaß der Apoptose und der Zellproliferation zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Involutionsphase in den Milchdrüsenepithelzellen trächtiger und nicht trächtiger Kühe festzustellen. Die Expression und Lokalisation von Proteinen, die eine Funktion bei der Regulierung der Apoptose in der Milchdrüse und anderen Geweben ausüben sollen, wurde ebenfalls untersucht, um die Vorgänge bei der Involution der bovinen Milchdrüse besser zu verstehen.

## **2. Literaturübersicht**

### **2.1 Makroskopische Anatomie der Milchdrüse**

#### **2.1.1 Milchdrüse**

Als Milchdrüse, Mamma, wird jeder Milchdrüsenkomplex verstanden, der mit einer Zitze, Papilla mammae, ausgestattet ist (Mosimann, 1949). Die Milchdrüse ist eine modifizierte apokrine Schweißdrüse, die als Sekretionsprodukt die Milch liefert. Für eine ganze Klasse von Wirbeltieren, den Mammalia oder Säugetieren, ist die Mamma namensgebend. Die Neugeborenen dieser Wirbeltierklasse sind auf das Sekret der Milchdrüse als einzige natürliche Nährstoffquelle angewiesen. Der Milch des Rindes kommt darüber hinaus als Nahrungsmittel für den Menschen eine wichtige Bedeutung zu.

Die Milchdrüse des Rindes besteht aus vier Milchdrüseneinheiten mit getrennten Hohlraumsystemen und Drüsenbezirken, die als Mammarkomplexe bezeichnet werden. Sie stellt ein bilateral symmetrisches, an der ventralen Rumpfwand aufgehängtes Organ dar, das zur Hälfte links, zur Hälfte rechts der Medianlinie liegt. Die milchgebende Milchdrüse ist wesentlich größer als die nicht laktierende Milchdrüse. Das Euter des Rindes stellt einen halbkugeligen Drüsenkörper, Corpus mammae, dar, der, dank züchterischer Selektion, bei guten Milchkühen in der Leistengegend deutlich herunterhängt, kranial fast an den Nabel reicht und kaudal sich weit vulvawärts zwischen die Hintergliedmaßen schiebt. Die Haut der Milchdrüse ist dünn und spärlich behaart, so dass die oberflächlichen Euterven oft gut sichtbar sind. Der Hautüberzug ist, außer im Bereich der Zitze, leicht auf der Unterlage verschieblich (Rubeli, 1914).

Der Apparatus suspensorius mammarius, eine Aufhängevorrichtung aus Bändern und Bindegewebslamellen, die aus vier Haupt- und zahlreichen Nebenblättern besteht, fixiert das Euter in seiner Lage. Der Aufhängeapparat geht aus dem tiefen Blatt der äußeren Rumpffaszie hervor, die beim Pflanzenfresser auch gelbe Bauchhaut, Tunica flava, genannt wird, da sie mit elastischen Fasern von gelber Farbe durchsetzt ist. Durch die Verwachsung der Tunica flava mit dem äußeren schiefen Bauchmuskel, dem M. obliquus externus abdominis, ist die Verankerung am Rumpf gewährleistet (Meissner, 1964).

Die vier Hauptblätter treten an die laterale und mediale Oberfläche jeder Euterhälfte heran und werden als seitliche und mittlere Aufhängebänder des Euters, *Laminae laterales et mediales apparatusi suspensorii mammarii*, bezeichnet. Sie laufen in der Zitzenwand aus, vereinigen sich an der Zitzenbasis und bilden die Euterkapsel, *Capsula uberis*. Die mittleren Aufhängebänder haben ihren kranialen Ursprung in der gelben Bauchhaut dicht neben der *Linea alba* und treten als doppelblättriges, elastisches, mittleres Aufhängeband des Euters, *Ligamentum suspensorium uberis*, zwischen die Euterhälften. Dieser kraniale Teil des Aufhängeapparates trägt die Hauptmasse des Euters. Der kaudale Abschnitt ist indirekt durch das *Ligamentum pubicum craniale* mit dem knöchernen Beckenboden verbunden. Vor der Anheftung am Schambeinkamm wird der kaudale Abschnitt von der ventralen Bauchwand abgespalten, was dafür verantwortlich ist, dass Erschütterungen des Skeletts sich nur zu einem geringen Teil auf die Milchdrüse übertragen. Die seitlichen Aufhängebänder gehen oberhalb und lateral des oberflächlichen Leistenringes, *Anulus inguinalis superficialis*, aus der gelben Bauchhaut hervor. 7-10 Nebenblätter entspringen den Hauptblättern entlang der Euteroberfläche. Diese Nebenblätter dringen in das Drüsengewebe ein und unterteilen es in einzelne Lappen (Seiferle, 1949).

Die Zitzen bzw. Striche, *Papillae mammae*, des Rindes sind durch das Vorhandensein von nur einem Zitzen- bzw. Strichkanal, *Ductus papillaris*, gekennzeichnet. Der im Durchschnitt 1 cm lange Strichkanal endet distal mit einer punktförmigen Öffnung, *Ostium papillare*. Die zahlreichen Bündel glatter Muskelzellen der *Lamina propria mucosae* sind hier zum Schließmuskel, *M. sphincter papillae*, verdichtet. Proximal schließt sich der Hohlraum der Zitze, die Zitzenzisterne oder *Pars papillaris sinus lactiferi*, an. Durch einen vorspringenden Faltenkranz, die "Fürstenberg Rosette", setzt sich die Schleimhaut des Strichkanals von der Zisternenschleimhaut ab. Die Zitzenzisterne reicht als Drüsenzisterne, *Pars glandularis sinus lactiferi*, weit in die Drüsenmasse des Euters hinein. Eine 2-6 mm dicke Ringfalte, zusammengesetzt aus straffem Bindegewebe und zirkulär angeordneten Venen, verengt den Übergang vom Zitzen- zum Drüsenteil der Zisterne. Diese Einschnürung, der Fürstenberg Venenring, und die elastisch-muskulösen Fasern, die den Strichkanal umgeben, verhindern ein Abfließen der Milch außerhalb des Saugens oder Melkens. Jede Drüsenzisterne erhält Zufluß von 8-12 großen Milchgängen, den *Ductus lactiferi*, mit 5-17 mm weiten



Einmündungsöffnungen. Das Fassungsvermögen des gesamten Hohlraumsystems des Euters beträgt beim Rind etwa 10 Liter, von denen ca. 500 cm<sup>3</sup> auf jede Zisterne fallen (Rubeli, 1913).

Interlobuläres Bindegewebe, das sich von den oben erwähnten Nebenblättern abzweigt, teilt das Drüsengewebe in einzelne Drüsenläppchen, Lobuli glandulae mammae, ein. Jedes Milchdrüsenläppchen besteht aus traubenartigen, dichtstehenden Drüsenbläschen, den Glandulae mammae. Die Drüsenendstücke haben eine verzweigt alveoläre Form, wobei die einzelnen Drüsenbläschen durch dünne Septen voneinander getrennt sind. Dieser Aufbau führt zu einer extremen Oberflächenvergrößerung und verleiht der Milchdrüse die Struktur einer apokrinen Speicherdrüse mit der Fähigkeit zur Sekretstapelung (Ziegler und Mosimann, 1960). Die Drüsenbläschen sind an die intralobulären Drüsengänge angeschlossen und wie diese von kontraktile Korbzellen (Myoepithelzellen), Bindegewebsfasern und Blutkapillaren umhüllt. Die intralobulären Drüsengänge ergießen sich in die interlobulären Milchsammelgänge, die in der Zisterne münden.

## **2.1.2 Gefäßversorgung**

### **2.1.2.1 Arterien der Milchdrüse**

Die arterielle Blutzufuhr in der Milchdrüse des Rindes wird hauptsächlich durch die A. pudenda externa übernommen. Sie bekommt Unterstützung von einigen kleineren Zuflüssen aus der A. pudenda interna (Le Roux und Wilkens, 1959).

Die A. pudenda externa entspringt aus dem Truncus pudendoepigastricus, der als zweites Gefäß die A. epigastrica caudalis für die ventrale Bauchwand abgibt. Nach der Passage des Leistenspaltes tritt die A. pudenda externa von dorsal an die Euterbasis heran. Sie teilt sich über den kranialen Mammarkomplexen in eine vordere und hintere Euterarterie, A. mammae cranialis et caudalis.

Die vordere Euterarterie zieht im Euterparenchym kranioventral und entläßt zuerst die Aa. laterales sinus caudalis, deren Äste die lateralen Anteile des Parenchyms im Schenkelviertel versorgen. Eine dieser kleinen Arterien versorgt als A. papillaris die Schenkelzitze. Im weiteren Verlauf gibt die vordere Euterarterie mehrere Aa. laterales sinus cranialis ab, von denen eine als A. papillaris in die Bauchzitze eintritt. Die übrigen Aa. laterales sinus cranialis sind für die seitlichen Bereiche des

Bauchviertels zuständig. Die Vaskularisierung des Parenchyms an der Basis des Bauchviertels wird durch kleine Dorsaläste der vorderen Euterarterie gewährleistet. Die hintere Euterarterie verläuft kaudoventral im Schenkelviertel und entläßt den Ramus basalis caudalis, der die Lnn. mammarii mit arteriellem Blut versorgt. Die A. mammaria caudalis vaskularisiert mit mehreren Aa. laterales sinus caudalis den ventrolateralen Abschnitt des Schenkelviertels. Eine dieser Arterien versorgt distal der Zitzenbasis als A. papillaris die Schenkelzitze.

Die medialen Anteile der Bauch- und Schenkelviertel erhalten arterielles Blut über die A. mammaria media, die meist aus dem Teilungswinkel der A. pudenda externa in die A. mammaria cranialis und die A. mammaria caudalis hervorgeht (El Hagri, 1945).

Die laktierende Milchdrüse ist auf einen immensen, kontinuierlichen Blutdurchfluß angewiesen, um ihre physiologische Funktion aufrechtzuhalten. Arterio-arterielle Anastomosen sind zwischen mehreren der oben genannten Gefäße ausgebildet, so dass die Mamma auch zu Zeiten hoher Milchproduktion ausreichend mit Blut versorgt wird.

### **2.1.2.2 Venen der Milchdrüse**

Durch ein Gesamtfassungsvermögen, das dasjenige der Euterarterien um ein fünfzigfaches übersteigt, sorgen die Euterveinen für eine Verringerung der Strömungsgeschwindigkeit des Blutes im Bereich der Kapillaren. Die geringe Fließgeschwindigkeit ermöglicht die für die Milchbildung notwendigen Stofftransporte aus den Kapillaren in das Drüsene epithel.

Über mehrere muskelstarke, dickwandige Zitzenvenen, Vv. papillares, gelangt das Blut aus dem Zitzenschwellkörper, Plexus venosus papillaris, in den Fürstenberg Venenring, Circulus venosus papillaris. Von hier aus verlaufen die Venen mit den gleichnamigen, oben aufgeführten Arterien bauchwärts und münden an der Euterbasis in die vordere und hintere Euterveine, V. mammaria cranialis et caudalis. Durch Queranastomosen mit den Venen der Gegenseite bedingt, bildet sich hier der Circulus venosus mammae.

Als venöses Hauptgefäß übernimmt die V. pudenda externa den Großteil des Blutes aus dem Circulus venosus mammae. Mit der Milchader, V. epigastrica cranialis

superficialis, ist die Möglichkeit gegeben, das Blut kranial abzuführen. Die meist gut sichtbare, daumenstarke Milchader tritt in der Regel zwischen Schaufelknorpel und 8. Rippenknorpel durch die Bauchwand und mündet über die V. epigastrica cranialis in der vorderen Hohlvene, V. cava cranialis. Venovenöse Anastomosen kennzeichnen in hohem Maße das Blutrückflußsystem des Euters (Glättli, 1924).

### **2.1.2.3 Lymphgefäße der Milchdrüse**

Analog zu dem venösen System, vereinigt sich die Lymphe aus den Zitzen zunächst in einem Lymphgefäßnetz an der Euterbasis. In großen Lymphsammelgefäßen wird die Lymphe den Euterlymphknoten, Lnn. mammarii, zugeführt. Die Euterlymphknoten liegen oberhalb und kaudal der Schenkelviertel und sind nur im vergrößerten Zustand palpierbar. Unter Umgehung der Euterlymphknoten passieren einige Lymphsammelgefäße direkt den Leistenkanal und ergießen sich im medialen Darmbeinlymphknoten, Ln. Iliacus medialis. Eine weitere Abflußmöglichkeit besteht kranial über den Kniefaltenlymphknoten, Ln. subiliacus (Zwart, 1911).

### **2.1.3 Nervenversorgung**

Die Milchdrüse des Rindes wird von sensiblen und vegetativen Nerven versorgt. Die sensible Innervation der Haut, des Drüsengewebes und der Zitzen, außer den kaudalen Bereichen der Schenkelviertel, übernimmt der N. genitofemoralis. An die Haut der Bauchviertel entsenden die Rami cutanei ventrales der ersten beiden Nerven des Plexus lumbalis, N. iliohypogastricus et N. ilioinguinalis, sensible Fasern. Die Haut der Hinterfläche der Schenkelviertel wird durch den Ramus mammarius des N. pudendus sensibel versorgt (Zwart, 1911).

Die vegetative Innervation findet durch sympathische Fasern des Ganglion mesentericum caudale statt, die mit den Nervenfasern des N. genitofemoralis durch den Leistenkanal das Euter erreichen. Die Drüsenzellen werden, im Gegensatz zu den Korbzellen, glatten Muskelfasern und Gefäßen, nicht sympathisch innerviert. Parasympathische Nervenzellen sind in der Milchdrüse nicht darstellbar (Nickel et al., 1996).

## 2.2 Mikroskopische Anatomie der Mamma

Die kleinste morphologische Einheit des milchbildenden Apparates ist die Alveole (Koch, 1956). An der Bildung der Alveolen sind Drüsenepithelzellen, Myoepithelzellen, Basalmembranen und kollagenes Bindegewebe, mit elastischen Fasern, Blutkapillaren und Nerven, beteiligt.

In der Hochlaktation besitzt das Euter eine hohe Anzahl spezialisierter, sekretorisch aktiver Zellen, die das Parenchym bilden. Diese Zellen sind in der Lage täglich mehr Sekret zu produzieren, als das Organ selbst wiegt. Als Stroma wird das umgebende und stützende Fett- und Bindegewebe bezeichnet.

An der voll entwickelten Milchdrüse unterscheidet man die Drüsenendstücke (Alveolae), die Milchgänge (Ductus lactiferi), die Milchsäckchen (Sinus lactiferi) und die Strichkanäle (Ductus papillaris). Beim Kalb endet das rudimentäre Drüsensystem blind im Fettgewebepolster (mammary fat pad) mit den Endknospen oder –kappen (terminal end buds, TEB). Milchdrüsenzellen wachsen und differenzieren sich nur, wenn sie sich im Fettgewebepolster befinden. Diese Beobachtung spricht dafür, dass lokale Wachstumsfaktoren des Fettgewebes spezifisch für Milchdrüsenzellen sind (Dulbecco et al., 1982).

Man unterscheidet bei den Alveolen zwischen Epithelzellen, die das Lumen begrenzen, und Myoepithelzellen, die die Epithelzellen umgeben. Die Vorläufer der Myoepithelzellen werden "cap cells" genannt. Die meisten dieser Zellen haben Kontakt zur Basalmembran und sind hochproliferativ. Die Vorläufer der Gangepithelzellen werden als "body cells" bezeichnet. Sie bilden die Hauptmasse der TEB-Zellen und sind mehrschichtig angeordnet (Humphreys, 1999). Die unspezifischen Gangepithelzellen differenzieren sich in der Pubertät zu Alveolar- und Lumenepithelzellen (Silberstein und Daniel, 1987), so dass während der Laktation zwischen drei verschiedenen Zelltypen anhand ihrer Zellkernmorphologie unterschieden werden kann (Russo et al., 1976). In der Laktation unterscheidet man innerhalb der Epithelzellen zwischen sekretproduzierenden Endstückzellen, die durch lumenale Fetttropfchen und eine außerordentliche Menge an rauem ER zur Synthese der Milcheiweiße gekennzeichnet sind, und in dieser Hinsicht funktionell weniger gut ausgestatteten Epithelzellen. Die kontraktilen, basal gelegenen und langgezogenen Myoepithelzellen umgeben beide Epithelzelltypen mit ihren Zytoplasmaausläufern. Das Epithel der Drüsenendstücke ist in der Laktation

hochprismatisch, ansonsten isoprismatisch, und stets einschichtig. Die Milchgänge besitzen in der Hochlaktation ein einschichtiges Epithel, das teilweise zur Sekretion befähigt ist. Im Bereich der Milchgänge befindet sich eine große Menge an Myoepithelzellen (Mosimann und Kohler, 1990). Außerhalb der Hochlaktation ist das Epithel zweischichtig-isoprismatisch und besitzt eine bindegewebige Lamina propria. Die weitleumigen Räume der Euterzisterne (Durchmesser mehrere cm) enthalten zweischichtig-hochprismatisches Epithel, das basal aus einer Schicht flacher Zellen und apikal aus einer Schicht hochprismatischer Zellen besteht. In der Spätlaktation breitet sich das Zisternenepithel aus und verdrängt das einschichtige Epithel der Milchgänge. Die Fürstenberg Rosette bildet die Grenze zwischen dem Zisternenepithel und dem Epithel der Strichkanäle. Die Strichkanäle besitzen mehrschichtiges verhornendes Plattenepithel.

Über die Basalmembran verläuft der Stoffaustausch zwischen Epithelzellen und dem Gefäße führenden Bindegewebe. Sie dient als Leitschiene für Wachstum und Regeneration des Epithels und erfüllt eine formunterstützende Funktion (Mosimann und Kohler, 1990). Die Basalmembran weist einen zweischichtigen Aufbau aus Lamina basalis und Lamina reticularis auf. Die Lamina basalis besteht aus Kollagentyp IV oder V und anderen Molekülen, z.B. Laminin. In der Lamina reticularis finden sich unregelmäßig angeordnete Bündel aus Kollagenfibrillen, die in eine Grundsubstanz eingebettet sind. Im Eutergewebe ist die Lamina basalis reich an Kollagentyp IV und Laminin.

Das Gewebe, welches das Milchgangsystem umgibt, besteht aus Adipozyten und Fibroblasten, die mesenchymalen Ursprungs sind, sowie einer Grundsubstanz aus Glykosaminoglykanen, Kollagen Typ I und III und anderen Glykoproteinen. Es macht 80% des Eutervolumens aus (Weaver und Bissell, 1999).

## **2.3 Physiologie der Mamma**

Die Beanspruchung durch hohe Laktationsleistung und strenge Anforderungen an die Eutergesundheit, läßt der Milchdrüse des Rindes große Aufmerksamkeit zukommen. Das laktierende Euter ist starken Veränderungen im Laufe eines Lebens unterworfen. Auf- und Abbauvorgänge, die sich zu unterschiedlichen Zeiten in der Phase der Laktation oder während des Trockenstellens vollziehen, werden durch Zusammenwirken von Stoffwechsel- und Geschlechtshormonen gesteuert (Plath, 1996).

### **2.3.1 Entwicklung und Funktion der Milchdrüse**

Die Milchdrüse stellt eine modifizierte apokrine Hautdrüse dar (Rüsse/Sinowatz 1998). Vor jeder Laktationsperiode durchläuft die Milchdrüse in chronologischer Reihenfolge die Stadien der Mammogenese (Ausbildung der Milchdrüse), Lactogenese (Einsetzen der Milchsekretion), Galactopoese (Fortsetzung der Milchsekretion) und der Involution (Rückbildung).

#### **2.3.1.1 Pränatale Entwicklung der Milchdrüse**

In der pränatalen Entwicklungsphase zeigt sich die erste Anlage der Milchdrüse beim Rind bei einer SSL von 12-16 mm (Rüsse und Sinowatz, 1991) als Milchlinie bzw. Milchstreifen. Dies ist eine verdickte Epidermisleiste, die beim Wiederkäuer nur inguinal erhalten bleibt. Der Milchstreifen verdickt sich durch Proliferation der Epithelzellen zur Milchleiste, welche sich über das Niveau der Hautoberfläche erhebt. Durch schnelle Zellvermehrung in der Milchleiste treten einzelne Verdickungen, die Milchhügel, auf. Dazwischen gelegene Anteile der Milchleiste werden daraufhin zurückgebildet. Nach Verlagerung der Milchhügel in ventrale Richtung, durch Wachstum und Differenzierung der seitlichen Körperwand bedingt, entsprechen die Milchhügel in Anzahl und Lage den Mammarkomplexen des erwachsenen Tieres. Die erneute Proliferation des Milchhügelepithels sorgt für die Ausbildung eines soliden, zapfenförmigen Sprosses (Mammarknospe). Das Mesenchym in der Umgebung verdichtet sich zum Areolargewebe. Vom basalen Teil der Mammarknospe wachsen Epithelstränge (Primärsprosse) in das umgebende

Areolargewebe. Beim Rind wächst pro Mammarknospe ein Epithelstrang, der spätere Ductus papillaris (Strichkanal), aus. Die Zitzenbildung vollzieht sich vor allem beim Wiederkäuer unter starker Proliferation des Areolargewebes. So ragt die Mammarknospe weit über die angrenzende Hautoberfläche. Diese bei Wiederkäuer und Pferd charakteristischen Zitzen werden als Proliferationszitzen, im Gegensatz zu den Eversionszitzen der übrigen Hausäugetiere, bezeichnet. Zur gleichen Zeit wachsen vom jeweiligen Primärsproß, dessen oberflächlicher Teil den Strichkanal und dessen tiefer Teil die Zisterne (Sinus lactiferus) bildet, ausgehend Sekundärsprosse. Diese differenzieren sich später zu den Milchgängen (Ductus lactiferi) und wachsen ins Mesenchym hinein. Das neugeborene Kalb besitzt ein einfaches Gangsystem, dessen Sekundärsprosse wenig entwickelt sind.

Die weitere Entwicklung sistiert bis zur Pubertät, in der, unter dem Einfluß der zyklisch sezernierten Geschlechtshormone (Östrogene und Progesteron), sowie Somatotropin, weiteres Wachstum des Gangsystems einsetzt. Dieses Wachstum findet unter Verdrängung des beim Wiederkäuer reichlich vorhandenen Fettgewebes, das eine Platzhalterfunktion ausübt, statt. Ohne dieses Fettpolster (mammary fat pad) ist es dem Epithel der Mamma weder möglich zu proliferieren, noch sich zu differenzieren. Das Fettgewebepolster stellt lokale Wachstumsfaktoren zunächst für Milchgangverlängerung, später für die Proliferation lobulo-alveolärer Strukturen zur Verfügung. Die Gewebszunahme des 'mammary fat pad' beruht eher auf Zellhypertrophie als auf Hyperplasie (Knight und Peaker, 1982). In den verschiedenen Phasen des weiblichen Zyklus kommt es unter dem Einfluß der Geschlechtshormone zu unterschiedlichen zellulären Vorgängen. Im Proöstrus wird die DNA-Synthese durch Östrogene stimuliert (Sutton und Suhrbier, 1967). Im späten Östrus und Metöstrus finden dann vermehrt Mitosen statt (Grahame und Bertalanffy, 1972). Der Wachstumsphase im Östrus folgt eine Regressionsphase in der lutealen Phase des Zyklus (Sinha und Tucker, 1966, 1969). Somit ist die Zunahme der Gesamtzellzahl nach jedem Zyklus sehr gering. In der Pubertät und während der Trächtigkeit, wenn die Milchdrüse unter dem Einfluss ovarieller Hormone steht, wird das Wachstum des Parenchyms von einer Kollagenzunahme begleitet. Bei ovariectomierten Ratten findet keine signifikante Proliferation des Parenchyms statt, ein Kollagenzuwachs ist dennoch zu verzeichnen. Dies deutet auf autonomes, oder durch GH stimuliertes Wachstum der Kollagenkomponenten (Paape und Sinha, 1971). Das Wachstumshormon ist das entscheidende Hypophysenhormon für die

Entwicklung von TEBs. Die Wirkung wird parakrin mit Hilfe von Insulin-ähnlichem Wachstumsfaktor 1 (IGF-1) vermittelt (Kleinberg, 1997). Vor der ersten Gravidität besteht die Milchdrüse aus einem wenig entwickeltem Gangsystem in einem großen Fettpolster. Während der Trächtigkeit vergrößert und verzweigt sich das Gangsystem, die Epithelzellen proliferieren und ersetzen das Fettgewebe. Dies kennzeichnet den Anfang der Ausbildung von lobulo-alveolärem Gewebe, die in der zweiten Hälfte der Gravidität stattfindet. Hier wird das lobulo-alveoläre Wachstum von Progesteron und Prolactin unterstützt (Scheunert/Trautmann, 1987).

Allen und Doisy (1923) beschrieben die ovariellen Hormone und untersuchten deren Wirkungen auf den Reproduktionstrakt. Ein östrogenbindender Rezeptor (ER) wurde 1966 von Toft und Gorski mittels Autoradiographie im Zytosol nachgewiesen. Der Beweis für die nukleäre Lokalisation des Rezeptors gelang durch den Einsatz von monoklonalen Antikörpern und immunhistochemischen Techniken. Der Östrogenrezeptor gehört zu einer Superfamilie von Kernrezeptoren mit definierten, funktionellen Domänen (Evans, 1988). Die nukleären Rezeptoren dieser Familie bestehen aus steroidal, nicht-steroidal und Rezeptoren mit unbekanntem Liganden. Zu den Steroidrezeptoren zählen der Östrogenrezeptor, Glukokortikoidrezeptor, Androgenrezeptor und Progesteronrezeptor. Ein einheitlicher Aufbau aus sechs strukturellen und funktionellen Domänen kennzeichnet die Mitglieder der Superfamilie (Greene et al., 1986). Die zentrale DNA-bindende Domäne besitzt zwei helikale Aminosäureschleifen (Zinkfinger) und ermöglicht die Bindung des Rezeptors an das Zielgen (Klug und Schwabe, 1995; Mangelsdorf et al., 1995).

Es kommen verschiedene Formen des Östrogenrezeptors vor. Greene et al. (1986) klonierten erstmalig den ER $\alpha$ . Eine zweite Form des Östrogenrezeptors, der ER $\beta$ , wurde bei der Ratte (Kuiper et al., 1996), Maus (Tremblay et al., 1997) und beim Menschen (Mosselman et al., 1996) entdeckt. Der ER $\gamma$  stellt die dritte Form des Östrogenrezeptors dar. Dieser Rezeptor wurde bislang nur beim Knochenfisch nachgewiesen (Hawkins et al., 2000). Mittels molekularbiologischer Nachweismethoden wurde die Verteilung der einzelnen Rezeptorformen in unterschiedlichen Organen untersucht. In der Milchdrüse, im vaginalen Oberflächenepithel und im Hoden wird hauptsächlich die  $\alpha$ -Form exprimiert (Dechering et al., 2000). Als vorherrschende Rezeptorform im Uterus wurde ebenfalls der ER $\alpha$  von Couse et al. (1997) nachgewiesen. Die Organe mit dem höchsten



Gehalt an ER $\beta$  sind die Prostata und der Eierstock. In Uterus, Zervix und Vagina wird ER $\beta$  in sehr geringem Maße exprimiert. Gut nachzuweisen sind beide Rezeptorformen in Hypothalamus, Nebenhoden, Herz und Lunge (Couse et al., 1997). Im Allgemeinen agiert der ER $\alpha$  als Transkriptionsaktivator, während der ER $\beta$  die Funktion des Inhibitors übernimmt (Saji et al., 2001). Im Euter zeigt sich die höchste ER $\alpha$  m-RNA Konzentration in der frühen Mammogenese bei nicht tragenden Färsen. Mit Beginn der Laktogenese fällt die m-RNA Konzentration signifikant ab und sie bleibt während der Laktation und in den ersten vier Wochen der Involution niedrig. Die Konzentration von ER $\beta$  m-RNA war in den beobachteten Zeiträumen der Mammogenese, Laktogenese und Laktation um ein Tausendfaches niedriger als die von ER $\alpha$ . Eine deutliche Erhöhung der ER $\beta$  m-RNA Konzentration wurde erst in der Involutionsphase nach zwei bis vier Wochen festgestellt (Schams et al., 2003).

Der Progesteronrezeptor (PR) gehört zur gleichen Kernrezeptor-Superfamilie wie der Östrogenrezeptor und besitzt ebenfalls die typische Domänenstruktur (Evans, 1988). Es existieren bei Nagetieren und Menschen zwei verschiedene PR-Formen (PR-A, PR-B), die durch ein einzelnes Gen codiert werden, über die Progesteron seine Wirkung entfaltet (Schrader et al., 1981). Die beiden Rezeptorformen weisen sowohl strukturelle, als auch funktionelle Unterschiede auf. Am N-terminalen Ende des PR-B befindet sich eine zusätzliche Aminosäurekette, deren Länge bei den verschiedenen Spezies variiert (Tora et al., 1988; Giangrande und McDonnell, 1999). Im Hinblick auf die Funktion besteht der Unterschied darin, dass der PR-A die Transkription der übrigen Steroidhormonrezeptoren hemmt, während der PR-B als starker Transkriptionsaktivator fungiert (Wen et al., 1994). Die Expression des PR wird durch Östrogen kontrolliert. Unter Östrogeneinfluss nimmt die Exprimierung des PR zu und unter Progesteroneinfluss nimmt sie ab (Conneely et al., 2000; Peterson, 2000).

In der bovinen Milchdrüse wird die höchste PR m-RNA Konzentration während der frühen Mammogenese in nicht trächtigen Färsen festgestellt. In der Laktogenese zeigt sich ein deutlicher Rückgang der m-RNA Konzentration, die auch in der Laktation und in den ersten vier Wochen der Involutionsphase niedrig bleibt (Schams et al., 2003).

### **2.3.1.2 Lactogenese (Einsetzen der Milchsekretion)**

Im Milchdrüsengewebe gibt es Rezeptoren für Östrogene, Progesteron, Corticosteroide, Prolaktin und Wachstumshormon. Die Anzahl der einzelnen Rezeptorgruppen ist abhängig von Zyklusstand und Trächtigkeitsstatus (Cowie et al., 1980). Ein Komplex aus Prolactin, adrenocorticotropem Hormon, Glucocorticoiden, Somatotropin und placentären Lactogenen ist für das Einsetzen der Milchsekretion erforderlich. Progesteron bindet während der Trächtigkeit mit hoher Affinität auch an Glucocorticoidrezeptoren und somit wird die Milchdrüse erst nach dem Absinken der Progesteronkonzentration wenige Tage vor der Geburt stärker empfindlich gegenüber lactogenen Hormonen.

### **2.3.1.3 Milchejektion (Einschießen der Milch)**

In Form eines neurohormonalen Reflexbogens bewirkt die mechanische Reizung der Zitzenhaut eine Freisetzung von Oxytocin aus der Neurohypophyse, welches in der Milchdrüse eine Kontraktion der Myoepithelzellen und damit die Milchejektion hervorruft. Stresssituationen führen zur vermehrten Sekretion von Adrenalin, das zentral die Oxytocin-Freisetzung hemmt und peripher in der Milchdrüse zu einer Kontraktion der Blutgefäße und zur Relaxation der Myoepithelzellen führt (Scheunert/Trautmann, 1987).

### **2.3.1.4 Galactopoese (Fortsetzung der Milchsekretion)**

Prolactin, Somatotropin, Thyreotropin und Corticotropin sind notwendig für die Galactopoese. Durch Hormonbehandlung kann lediglich das Absinken der Milchleistung verhindert, aber keine Steigerung der physiologischen Maximalleistung erzielt werden (Scheunert/Trautmann, 1987). Die Laktationsleistung erreicht beim Rind ca. 4-6 Wochen nach der Geburt eines Kalbes ihren Höhepunkt. Mamma-Epithelzellen sind durch eine sehr hohe metabolische Aktivität ausgezeichnet (Collier, 1985). In dieser Phase der Laktation erreicht sowohl die Hypertrophie als auch die Lebensdauer der Epithelzellen ihren Höhepunkt.

### 2.3.1.5 Involution (Rückbildung)

Unter Involution wird der Verlust der Milchbildungsfähigkeit der Drüsenepithelzellen durch morphologische Rückbildungsprozesse verstanden (Mielke, 1986). Die Involution der Milchdrüse wird beim heutigen Management durch Trockenstellen ausgelöst. Der Zeitpunkt des Trockenstellens richtet sich nach dem errechneten Kalbetermin. Sechs bis acht Wochen vorher wird die laktierende Kuh trocken gestellt. In der Regel wird intrazisternal ein Langzeitantibiotikum verabreicht und die Fütterung auf die Trockenstehzeit umgestellt. Liegt die Energieversorgung einer laktierenden Kuh mit einer Milchleistung von 30 kg/d bei 133 MJ/d, so benötigt die trockenstehende Kuh nur noch 50 MJ/d (Lotthammer, 1999). Schulz et al. (1974) unterscheiden innerhalb der Trockenstehperiode zunächst die Phase der Milchstauung, die drei bis sechs Tage andauert, und die anschließende Phase der Sekretionsruhe. Die Trockenstehperiode geht ca. zehn Tage ante partum in die neue Laktation über. Nach Smith und Todhunter (1982) durchläuft die Trockenstehperiode zuerst eine Periode der aktiven Involution, auch als frühe Trockenstehperiode bezeichnet, die mit dem Aussetzen des regulären Melkens beginnt und ca. dreißig Tage dauert. Dann schliesst sich die "steady state"-Phase an, die der eigentlichen Ruheperiode entspricht und keinen exakten Anfangs- und Endzeitpunkt hat, sondern von der Gesamtlänge der Trockenstehperiode abhängt. Fünfzehn bis zwanzig Tage vor der Geburt beginnt die Phase der Kolostr- und Laktogenese, in der es bei trächtigen Kühen zur Reentwicklung des Mammagewebes sowie zur Kolostrumbildung und zur Initiierung der Laktation kommt. Nach Mielke (1986) beginnt die Trockenstehperiode mit der Stauungsphase, die zwei bis drei Tage dauert. Vom dritten Tag bis zur dritten Woche nach dem Trockenstellen schliesst sich die Phase der Rückresorption an, gefolgt von einer Ruhephase und der Phase der Sekretakkumulation. Letztere unterteilt sich einerseits in eine Periode der geringen Sekretakkumulation, die ca. vier Wochen a.p. einsetzt, andererseits in eine Periode der intensiven Sekretakkumulation, die ca. fünf Tage a.p. beginnt und der eigentlichen Laktogenese entspricht. Verkürzte Trockenstehperioden resultieren in gravierenden Leistungsverlusten in der folgenden Laktation. Verlängerte Trockenstehzeiten führen nur zu sehr geringen Leistungssteigerungen und bergen die Gefahr der Verfettung, mit negativen Auswirkungen auf den Stoffwechsel im peripartalen Zeitraum in sich (Mansfeld et al., 1999).

Der zeitliche Ablauf und das Ausmaß der Involution bei Milchkühen verhalten sich anders als bei der vorherrschenden Versuchstiergruppe, den Nagern. Strange et al. (1992) zeigten, dass viele der apoptotischen Epithelzellen bei Ratten und Mäusen ins Alveolarlumen abgegeben werden, was zum Zusammenbruch der alveolären Struktur der Milchdrüse in den ersten 2 Wochen der Involution führt. Bei heutigem Management ist die Milchkuh zum Zeitpunkt des Trockenstellens trächtig. Somit wirkt der hormonelle Einfluß auf die Mammogenese und Lactogenese während den letzten Wochen der Trächtigkeit den Stimuli der Involution entgegen. Die gesamte Trockenstehperiode über bleibt so die alveoläre Struktur der Milchdrüse grundsätzlich erhalten, ohne eine starke Abstoßung der Epithelzellen ins Alveolarlumen oder Verlust der Verbindung zur Basalmembran (Capuco und Akers, 1999). Bei verkürzten Trockenstehzeiten bleibt die Morphologie der Mamma besser intakt (Hurley, 1989), die Nettoveränderung der Zellzahl relativ gering (Akers et al., 1990; Capuco et al., 1997). Der Anteil am Mammagewebe, der von Drüsenepithelzellen gebildet wird, ist unabhängig vom Laktationsstatus oder Trächtigkeitstag. Dagegen verringert sich die luminale Fläche des Mammagewebes auf ein Minimum von 9,5% 35 Tage praepartum. Kühe, die durchgehend gemolken werden, weisen am gleichen Tag eine luminale Fläche von 21% auf. Vom Tag 35 praepartum an vergrößert sich die luminale Fläche bei den trockenstehenden Kühen und übertrifft die Fläche im laktierenden Euter sieben Tage praepartum. Die Fläche, die von Stromaelementen eingenommen wird verhält sich umgekehrt. Die stromale Fläche im Mammagewebe trockenstehender Kühe erreicht ein Maximum am Tag 35 praepartum. Sieben Tage praepartum ist ein Minimum an Stromaelementen vorhanden. Dies ist weniger als bei den laktierenden Kühen zum gleichen Zeitpunkt (Capuco und Akers, 1999). Diese Daten belegen die Aufeinanderfolge von Absorption der Milch am Anfang der Trockenstehperiode und Akkumulation des Sekrets am Ende der Lactogenese.

Die zytologischen Veränderungen des bovinen Milchdrüsengewebes in den Wochen nach dem letzten Melken wurden von Holst et al. (1987) und Sordillo et al. (1988) beschrieben. In den ersten 24 Stunden reduziert sich die Verschmelzungsbereitschaft der Sekretvakuolen mit der apikalen Zellmembran. Dies führt zu einer Akkumulation von Sekretgranula und Fetttropfen in den Epithelzellen. Durch Verschmelzung der Vakuolen entstehen "Riesenvakuolen", die unter dem Lichtmikroskop nach 2-3 Tagen sichtbar sind. In den ersten 48 Stunden verringert

sich die Anzahl der Zellorganellen, die an der Milchsynthese beteiligt sind: der Golgi-Apparat erscheint deutlich reduziert und die große Menge an rauem ER nimmt nach ein paar Tagen drastisch ab. Nach zwei Wochen ergibt sich für die meisten Zellen eine erhebliche Einschränkung der sekretorischen Aktivität. Die Zellen bleiben aber intakt und sind weiterhin mit relativ vielen Organellen ausgestattet, die die Synthese einiger sekretorischer Komponenten, z.B. Lactoferrin (Goodman et al., 1991), während der Trockenstehperiode ermöglichen. 30 Tage nach dem letzten Melken enthalten die Epithelzellen nur wenige Sekretvakuolen. In den 2 Wochen vor der Kalbung vermehrt sich die Anzahl der sekretorisch aktiven Zellen, so dass 7 Tage praepartum fast alle Alveolarzellen Zytoplasmavergrößerung, Akkumulation basaler Fetttropfen und apikaler Sekretvakuolen, die Charakteristika einer sekretorisch aktiven Zelle, aufweisen. Capuco et al. (1997) untersuchten die Zelltypen bei laktierenden und trockenstehenden Kühen. Eine Woche vor der Kalbung ist die Gesamtzellzahl in der Mamma bei beiden Gruppen gleich. Der Anteil der Drüsenepithelzellen im trockenstehenden Euter beträgt 83%, während das durchgehend gemolkene Euter nur zu 74% aus Drüsenepithelzellen besteht. Während Involution und Laktation reichern sich unterschiedliche T-Lymphozyten Populationen im Eutersekret an.  $CD4^+$  und  $CD8^+$  sind Zelloberflächenproteine, die auf reifen T-Zellen vorkommen und sich durch die Klassen von MHC-Molekülen, die sie erkennen, unterscheiden.  $CD4^+$  bindet an das MHC-II-Molekül, während  $CD8^+$  das MHC-I-Molekül erkennt. Ungefähr zwei Drittel der peripheren T-Zellen exprimieren  $CD4^+$ , und ein Drittel exprimiert  $CD8^+$ .  $CD4$  ist ein einzelkettiges, transmembranäres Glykoprotein, dessen Molekulargewicht 55 kD beträgt. Wenn  $CD4$  und der T-Zell-Rezeptor gleichzeitig an denselben MHC-II : Peptid-Komplex binden, erhöht sich die Empfindlichkeit der T-Zelle für ein Antigen erheblich, weshalb man diese akzessorischen Moleküle auch als Corezeptoren bezeichnet. Die zur Aktivierung der T-Zelle benötigte Antigenmenge verringert sich in diesem Fall auf ein Hundertstel.  $CD8$  ist ein durch eine Disulfidbrücke verbundenes Heterodimer aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Kette.  $CD8$  erhöht die Empfindlichkeit von T-Zellen für durch MHC-I-Moleküle präsentiertes Antigen um das Hundertfache (Zamoyska, 1998). Im Verlauf einer Laktationsperiode verändert sich das Verhältnis von  $CD4^+$  (Helferzellen) zu  $CD8^+$  (Suppressorzellen) Zellen. Während der Laktation sind  $CD8^+$  Zellen im Eutersekret viel zahlreicher als  $CD4^+$  Zellen (Park et al., 1992). Das

Verhältnis  $CD4^+/CD8^+$  im Eutersekret nimmt in der frühen Laktation einen Wert von 0.5 an. Im Verlauf der Laktation verschiebt sich dieser Wert zugunsten der  $CD4^+$  Zellen und beträgt am Ende der Laktation 0.8 (Asai et al., 1998). Die Akkumulation der  $CD8^+$  T-Zellen in der unmittelbaren Umgebung des Epithels lässt die Vermutung zu, dass die Suppressorzellen zur Erhaltung der Struktur der Milchdrüse durch die Beseitigung beschädigter oder infizierter Zellen beitragen (Taylor et al., 1994). Mit Beginn des Trockenstellens steigt das Verhältnis  $CD4^+/CD8^+$  sprunghaft an. Am Anfang der Trockenstehperiode beträgt der Wert 1.2. Am Ende der Trockenstehperiode ist das Verhältnis  $CD4^+/CD8^+$  schon bei 3.7 (Asai et al., 1998). Der Mechanismus, der die selektive Zunahme der  $CD4^+$  T-Zellen in der Trockenstehperiode, sowie das Ansteigen der  $CD8^+$  T-Zellen in der Laktationsperiode bewirkt, ist noch nicht bekannt.

## **2.4 Apoptose in der Mamma**

Der programmierte Zelltod (Apoptose) spielt auch bei der normalen Entwicklung der Milchdrüse eine wichtige Rolle. Während der Umstrukturierung des Milchdrüsengewebes in der Involutionsphase tritt die Apoptose besonders deutlich in Erscheinung (Rosfjord und Dickson, 1999).

Hormone, wie Östrogen und Progesteron, nehmen entscheidenden Einfluß auf die Morphogenese der Milchdrüse. Lokale Faktoren der Mamma, wie z.B. die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix, Wachstumsfaktoren und Integrine, steuern die Apoptose auf Organniveau. Schließlich reagiert die einzelne Zelle durch ihr eigenes Genexpressionsmuster auf aktivierende bzw. inhibierende Signale und moduliert so die Apoptose.

### **2.4.1 Induktion der Apoptose**

Es existieren bei Säugetieren zwei verschiedene Möglichkeiten zur Induktion von Apoptose, die durch das Auftreten von Effektor-Caspasen gekennzeichnet ist (Strasser et al., 2000). Die Caspasen bestehen aus einer Gruppe von 10 spezifischen Proteasen, die in inaktiver Form in der Zelle vorliegen und analog zur Blutgerinnungskaskade durch Proteolyse in ihre aktive Form umgewandelt werden. Die Apoptose wird irreversibel sobald die Effektor-Caspasen (Caspase 3, 6, 7) ihre

proteolytische Aktivität aufgenommen haben (Thornberry und Lazebnik, 1998), da die Proteolyse, im Gegensatz zu den meisten anderen posttranslationalen Modifikationen, einen irreversiblen Prozeß darstellt.

Bei der extrinsischen, Todesrezeptor-induzierten Apoptose wandeln "Todesrezeptoren" (death receptors) extrazelluläre Signale so um, dass intrazellulär Effektor-Caspasen durch die Initiator-Caspase-8 aktiviert werden. Intrazellulär kann auch NF- $\kappa$ B (nuclear factor-kappa-b), eine Transkriptionsfaktorfamilie, aktiviert werden und die Apoptose modulieren. Durch die Todesrezeptoren können die Effektor-Caspasen innerhalb von Sekunden aktiviert werden, was zur apoptotischen Destruktion der Zelle innerhalb von Stunden führt. Die Todesrezeptoren gehören der TNF-Rezeptor-Gen-Superfamilie an. Sie sind durch gleichartige, cystein-reiche extrazelluläre Domänen und homologe zytoplasmatische Sequenzen, die sogenannten Todesdomänen (death domains), charakterisiert (Ashkenazi und Dixit, 1998). In den Todesdomänen befinden sich einerseits CARDs (caspase recruitment domain), wo nach Oligomerisation die Initiator-Caspase-8 entsteht, welche aus Pro-Caspase-9 die Effektor-Caspase-9 abspaltet, andererseits kann an den Todesdomänen auch NIK (NF- $\kappa$ B inducing kinase) freigesetzt werden. Dieses führt zur Phosphorylierung des zytoplasmatisch lokalisierten I- $\kappa$ B/ NF- $\kappa$ B-Komplexes, wodurch NF- $\kappa$ B frei wird, um nach Passieren der Kernmembran als Transkriptionsfaktor aktiv zu werden (Clarkson und Watson, 1999). Die am besten untersuchten Todesrezeptoren sind CD95 (Fas, Apo-1), Apo-2 (Killer), Apo-3 (LARD) und der TNFR-1, an dessen Todesdomänen die Freisetzung von NF- $\kappa$ B eingeleitet werden kann. Mitglieder der NF- $\kappa$ B-Familie aktivieren die Transkription verschiedener Gene. Als Genprodukte können inflammatorische und chemotaktische Zytokine, hämatopoetische Wachstumsfaktoren, Antikörper, MHC-I Moleküle, Zytokinrezeptoren, Integrine und die Zelladhäsionsmoleküle E-Selektin, ICAM und VCAM-I genannt werden (Collins, 1993). Die DNA-bindenden Untereinheiten der NF- $\kappa$ B-Familie sind p50 (NFKB1), p65 (RelA), c-Rel (Rel), p52 (NFKB2) und RelB. Diese Proteine können untereinander homo- und heterodimerisieren. Die Affinität einzelner Untereinheiten zu bestimmten Promoterbereichen ist unterschiedlich genug, um eine selektive Regulation NF- $\kappa$ B-abhängiger Gene zu gewährleisten (Kunsch et al., 1992). Beg et al. (1995) untersuchten Mäuse mit einem Mangel an der p65-Untereinheit. Es zeigte sich eine embryonale Sterblichkeit am 15./16. Trächtigkeitstag aufgrund von massiver Leberdegeneration mit Apoptose. Grimm et al. (1996) wiesen für p65 pro-

apoptotische Eigenschaften in COS-Zellen nach. Diese Beobachtungen und weitere Untersuchungen von Bäuerle et al. (1996) und VanAntwerp et al. (1998) lassen den Schluß zu, dass die Auswirkungen von NF- $\kappa$ B auf die Apoptose vom Zelltyp, Stimulus und von der aktivierten Untereinheit abhängt. Die genauen Funktionen der NF- $\kappa$ B-Familie sind im Detail nicht bekannt. Unbestritten ist jedoch, dass diese Transkriptionsfaktoren eine Rolle bei der Steuerung der Milchdrüsenentwicklung besitzen. Clarkson und Watson (1999) wiesen hohe NF- $\kappa$ B-Aktivität in der Trächtigkeit und in der frühen Involution, sowie niedrige Aktivität in der Laktation nach.

Ein anderer, für die Milchdrüse bedeutsamer Transkriptionsfaktor, STAT-3 (signal transducer and activator of transcription-3), wird als erster Transkriptionsfaktor in den ersten Stunden nach dem Absetzen nachgewiesen (Li et al., 1997). Yang et al. (1998) zeigten, dass NF- $\kappa$ B-Aktivität durch STAT-3 induziert wird. STATs gehören zu einer Familie zunächst inaktiver Transkriptionsfaktoren, die als zelluläre Antwort auf Zytokin- oder Wachstumsfaktorstimulation aktiviert werden (Ihle, 1996). Aktivierte STATs bilden ebenso wie die NF- $\kappa$ B-Familie Homo- bzw. Heterodimere und werden in den Zellkern verlagert, wo sie an entsprechende Promotorsequenzen andocken. Überexpression des Wild-Typs STAT-3 beschleunigte IL-6 oder LIF-induzierte Apoptose in myeloischen Leukämie-Zellen. Die durch die gleichen Zytokine induzierte Apoptose wird in Abwesenheit von STAT-3 blockiert (Minami et al., 1996). Die Bedeutung von STAT-5 für die Entwicklung der Milchdrüse zeigten Liu et al. (1997) und Teglund et al. (1998) anhand von STAT-5a Knockout-Mäusen. Diese Mäuse waren mit Ausnahme der Milchdrüsen phänotypisch identisch mit der Kontrollgruppe. Die Milchdrüsen der Knockout-Mäuse zeigten während der Trächtigkeit keine Entwicklung und waren unfähig zu laktieren. STAT-5 wird in der Trächtigkeit und während der Laktation aktiviert, aber in der Involutionsphase herunterreguliert. Eine Behandlung mit Prolaktin, welches STAT-5 aktiviert, bedingt bei Mäusen eine Verzögerung der Apoptose und Involution der Milchdrüse (Sheffield und Kotolski, 1992; Travers et al., 1996). Streuli et al. (1995) zeigten die Notwendigkeit von STAT-5 zur Transduktion von 'Überlebenssignalen' aus der extrazellulären Matrix. Anders verhält es sich mit STAT-3, welches am Anfang der Involution spezifisch aktiviert wird (Liu et al., 1996; Philp et al., 1996). Die reziproke Aktivierung von STAT-3 und STAT-5 am Anfang der Involution läßt gegensätzliche Funktionen bei der Regulierung der Apoptose vermuten. In der Abwesenheit von



STAT-3 kommt es zu einem geringeren Ausmaß der Apoptose und einem verspäteten Einsetzen der Involution (Chapman et al., 1999). Am transgenen Mausmodell (Selbert et al., 1998) ist bei STAT-3-negativen Mäusen eine zwei bis dreifache Verringerung der Apoptoserate zu beobachten, was für eine Rolle des STAT-3 als wichtiges Todessignal für die Milchdrüse spricht. Eine solche Verringerung der Apoptoserate reicht aus, um für eine signifikante Verzögerung der Involution zu sorgen. Howie et al. (1994) demonstrierten, dass eine Apoptoserate von 1%-2%, zu einem Verlust von 50% der Gesamtzellzahl innerhalb der nächsten 48 Stunden führen kann.

Die zweite, intrinsische Möglichkeit zur Regulation der Apoptose besteht über verschiedene Mitglieder der Bcl-2-Familie. Die Bcl-2-Familie enthält sowohl pro-, als auch antiapoptotisch wirksame Proteine, denen eine strukturelle Ähnlichkeit in der Bcl-2-Homologieregion (BH) gemeinsam ist (Adams und Cory, 1998). Viele der Bcl-2-Proteine sind in intrazellulären Membranen, wie der Außenmembran der Mitochondrien, im endoplasmatischen Retikulum und in der Kernmembran lokalisiert (Lithgow et al., 1994). In den Außenmembranen der Mitochondrien sind die Bcl-2-Proteine durch eine hydrophobe Kette von Aminosäuren am COOH-terminalen Ende verankert. Die funktionell bedeutsamen BH-Regionen richten sich zum Zytoplasma hin aus. Diese BH-Regionen können sich zu Kanälen formieren und so die Membranintegrität beeinflussen. Einige pro-apoptotische Mitglieder der Bcl-2-Familie sind Bax, Bak, Bad, und Bcl-x<sub>S</sub>. Antiapoptotisch wirkende Proteine sind unter anderem Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub> (Green und Reed, 1998; Oltvai et al., 1993; Chittenden et al. 1995; Kiefer et al., 1995; Boise et al., 1993). Bei dem Bcl-2 gesteuerten Alternativweg zur Aktivierung der Caspase-Kaskade wird durch proapoptotische Mitglieder der Bcl-2-Familie die Bildung eines großen Kanals, des sogenannten "PT pore", in der Mitochondrienmembran induziert. Dieser Kanal ist durchlässig für Moleküle bis zu einer Größe von 1,5 kD. Antiapoptotische Bcl-2-Proteine verhindern entweder die Entstehung eines solchen Kanals, oder sie formieren sich zu anderen Kanälen, durch die der Protonenausstoß aus den Mitochondrien gefördert wird bzw. die mitochondriale Ca<sup>2+</sup>-Pufferkapazität vergrößert wird (Green und Reed, 1998). Pro- und antiapoptotische Bcl-2-Proteine können Heterodimere bilden und so den Ionenkanal verändern. Durch die Öffnung des "PT pore" kommt es zum Zusammenbruch der Atmungskette aufgrund eines H<sup>+</sup>-Influges. Die Hyperosmolarität in der mitochondrialen Matrix führt zu einer Streckung der in viele Cristae gelegte

innere Mitochondrienmembran. Die äußere Mitochondrienmembran kann mit dieser Expansion nicht mithalten und reißt. Dadurch werden Caspase-aktivierende Proteine aus dem intermembranösen Raum frei. Die Apoptosemediatoren, die aus Mitochondrien freigesetzt werden, sind Procaspase-3, Zytochrom c und AIF (apoptosis-inducing-factor). Apaf-1 und Zytochrom c sorgen für die Umwandlung von Procaspase-9 in die aktive Form. Durch Caspase-9 werden wiederum direkt Effektor-Caspasen aktiviert (Green und Reed, 1998). Bax ist proapoptotisch wirksam und besitzt ein Molekulargewicht von 21 kDa. Die Bax-Proteine können sowohl miteinander homodimerisieren, als auch mit anderen Proteinen der Bcl-2-Familie heterodimerisieren und sich so in intrazelluläre Membranen einfügen (Wolter et al., 1997). Die Gesamtmenge an Bax in Mammazellkulturen war in apoptotischen und überlebenden Zellkulturen gleich (Pullan et al., 1996). Die Menge an Bax mRNA war jedoch in apoptotischen Zellen dramatisch erhöht und das durch FITC markierte Bax war nur in apoptotischen Zellen nachweisbar (Metcalf et al., 1996). Heermeier et al. (1997) wiesen Bax in Epithelzellen während der Involution nach mit einer Konzentrationserhöhung in der späten Involutionsphase. Im Schafeuter wurde von Colitti et al. (1999) der früheste durch Apoptose bedingte Verlust an Epithelzellen zwei Tage post lactationem festgestellt. Die Apoptoserate steigerte sich bis zum achten Tag post lactationem. Bax wurde während dieser Phase ebenfalls nachgewiesen, wobei die höchste Konzentration am achten Tag post lactationem festgestellt wurde. Bcl-2 ist ein antiapoptotisch wirksames Protein der Bcl-2-Familie. Metcalfe et al. (1996) zeigten, dass Bcl-2 zwar in den luminalen Epithelzellen der Milchgänge, die bei der Maus keinen Kontakt zur Basalmembran haben, exprimiert wird, jedoch nicht in den Alveolarepithelzellen, die direkt mit der Basalmembran in Verbindung sind. Sie ziehen die Schlussfolgerung, dass die Expressierung von Bcl-2 das Überleben der Alveolarzellen nicht beeinflusst.

Das p53-Tumorsuppressorgen kodiert für das Protein p53, welches den Zellzyklus kontrolliert. p53 kann die Apoptose in Gang setzen und ist ein Transkriptionsfaktor des Bax-Gens (Miyashita und Reed, 1995). Li et al. (1996) zeigten, dass die Involution der Milchdrüse in Abwesenheit von p53 den normalen Verlauf nimmt. Die Apoptose der Alveolarzellen hatte ohne p53 gewohnte Ausmaße. Diese Beobachtungen lassen den Schluß zu, dass die Apoptose in der Mamma p53-unabhängig verläuft.

Eine Reihe von Wachstumsfaktoren nimmt durch die Aktivierung der Transkription von Bcl-2-Genen Einfluß auf die Apoptose. In Anwesenheit von EGF (epidermal growth factor) steigt die Expression von Bcl-x<sub>L</sub> im Milchdrüsenepithel, nach seiner Entfernung sinkt sie (Nass et al., 1996). Die Expression von EGF ist niedrig im juvenilen und im Euter trächtiger Tiere. Gegen Ende der Trächtigkeit steigt die EGF-Expression an. Sie erreicht ihren Höhepunkt während der Laktation, wobei hohe Konzentrationen von EGF in der Milch auftreten (Carpenter, 1980; Beardmore und Richards, 1983). Weitere Experimente mit Zellkulturen zeigen, dass andere Wachstumsfaktoren wie IGF-1 (insulin-like growth factor) und bFGF (basic fibroblast growth factor) als Überlebensfaktoren für das Milchdrüsenepithel fungieren (Hadsell et al. 1988; Rosfjord und Dickson, 1999). Während der Involution synthetisieren Epithelzellen hohe Mengen an IGFBP-5 (insulin-like growth factor binding protein-5) (Tonner et al., 1997). In den ersten 24 Stunden nach dem Absetzen kommt es zu einer 10-fachen Erhöhung der Expression von IGFBP-5 mRNA und IGFBP-5 Protein, zusammen mit einer erhöhten Expression weiterer Mitglieder der IGFBP-Familie (Tonner et al. 1995; Mol et al. 1997). Hohe Konzentrationen von IGFBP-5 bewirken eine geringe Verfügbarkeit von IGF-1 für das Milchdrüsenepithel. Vermehrte Expression von IGFBP-5 korreliert auch in anderen Geweben mit programmiertem Zelltod (Guenette und Tenniswood, 1995; Phillips et al., 1994). Der Wachstumsinhibitor TGF $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ ) induziert ebenfalls die Apoptose der Epithelzellen (Silbertstein und Daniel, 1987). Die Expression von TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 und TGF $\beta$ 3 nimmt in den ersten 2-3 Tagen nach dem Absetzen stark zu und bleibt in der Involutionsphase hoch. Während der Laktation ist TGF $\beta$ 1-mRNA dagegen nicht nachweisbar (Strange et al., 1992; Atwood et al., 1995). Der TNF $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ ) ist ein Wachstumsfaktor, der hauptsächlich an der Oberfläche aktivierter Makrophagen zu finden ist (Carswell et al., 1975). Der TNF $\alpha$ -Rezeptor ist strukturell dem CD95-Rezeptor sehr ähnlich und besitzt ebenso 'death domains', an denen die Caspase-Kaskade ausgelöst wird (Ashkenazi und Dixit, 1998).

## 2.4.2 Ausführung der Apoptose

Die Caspasen (cysteinyll aspartate-specific proteinases), spezifische Proteasen, bringen die Apoptose durch die Irreversibilität der Proteolyse zum 'point of no return'. Caspasen werden in Initiatoren (Caspase 2, 8, 9, 10), Effektoren (Caspase 3, 6, 7) und inflammatorisch wirksame Caspasen (Caspase 1, 4, 5) eingeteilt. Sie regulieren ihre Aktivität durch positive oder negative Feedback-Mechanismen selbst (Thornberry und Lazebnik, 1998). Die Caspasen haben untereinander Ähnlichkeit in der Aminosäuresequenz, Struktur und Substratspezifität. Sie spalten Proteine stets nach einem Asparaginsäure-Rest. Proteine, die Zellen vor der Apoptose bewahren, werden durch Caspasen inaktiviert. CAD (caspase-activated deoxyribonuclease) liegt in vitalen Zellen als Komplex mit I<sup>CAD</sup> (inhibitor of the caspase-activated deoxyribonuclease), der als Chaperone für CAD funktioniert, vor. I<sup>CAD</sup> wird durch Caspase-3 von CAD abgespalten. Freies CAD kann nun in den Zellkern gelangen und die DNA-Fragmentation einleiten (Liu et al., 1997; Enari et al., 1998). Die Caspase-3, eine der Effektor-Caspasen, kommt als inaktive Vorstufe mit einem Molekulargewicht von 32kDa vor. Die proteolytisch aktive Form besitzt ein Molekulargewicht von 17kDa (Thornberry und Lazebnik, 1998). Baumann et al. (2003) zeigten, dass MIF das Vorkommen der aktiven Form verhindert. Der macrophage migration inhibitory factor (MIF) ist ein proinflammatorisches Zytokin, das von Monozyten/Makrophagen und T-Lymphozyten abgesondert wird (Baugh und Bucala, 2002). MIF hemmt die Migration der Makrophagen (Bloom und Bennett, 1966; David, 1966). Darüber hinaus ist MIF auf verschiedene Arten antiapoptotisch wirksam.

Bid und Bax sind proapoptotische Mitglieder der Bcl-2-Familie. Sie können sowohl unabhängig voneinander (Kim et al., 2000), als auch in Synergie (Desagher et al., 1999) den Verlust der Integrität der Mitochondrienmembran herbeiführen. Dadurch gelangen Apoptosemediatoren, z.B. Cytochrom c und Procaspase-3, ins Zytosol. Cytochrom c formiert sich mit Apaf-1 und Caspase-9 zu einem Komplex, der, bei Vorhandensein von dATP, die Aktivierung von Caspase-3 bedingt (Li et al., 1997). Die Proteolyse, aus der aktive Spaltprodukte von Bid und Bax hervorgehen, wird durch MIF verhindert (Baumann et al., 2003). Dadurch, dass die Mitochondrienmembranen intakt bleiben, wird die Caspase-3-Aktivierung unterbunden.

Die durch das Tumorsuppressorgen p53 eingeleitete Apoptose wird in Anwesenheit von MIF unterbunden. MIF hemmt die p53-vermittelte Aktivierung der Transkription (Hudson et al., 1999). Kleemann et al. (1998) wiesen für MIF eine Funktion als Thiolprotein Oxidoreduktase nach. Nguyen et al. (2003) untersuchten den Einfluss von MIF auf durch verschiedene Reize ausgelöste Apoptose. Ihr Ergebnis offenbart, dass MIF ein sehr potenter Inhibitor der durch oxidativen Stress eingeleiteten Apoptose ist. Da die p53-Aktivität durch Redoxmechanismen reguliert wird (Rainwater et al., 1995; Hainhaut und Mann, 2001), vermutet man, dass MIF die p53-Aktivität in seiner Funktion als Oxidoreduktase verändert.

Galektin-3 besitzt eine Masse von 31 kDa und ist im Bezug auf die antiapoptotische Wirkung dem MIF sehr ähnlich. Galektine gehören zu einer Familie tierischer Lektine, die an  $\beta$ -Galaktoside binden (Cooper und Barondes, 1999). Galektin-3 wird in einer Vielzahl von Epithelzellen, dendritischen Zellen und Entzündungszellen, vor allem Makrophagen, stark exprimiert (Liu, 2001). Von den vierzehn bis dato entdeckten Galektinen ist Gal-3 das einzige mit einem hemmenden Effekt auf die Apoptose. Von Gal-1, -7 und -9 ist bekannt, dass sie die Apoptose vorantreiben (Yang und Liu, 2003). Nach dem Wirken intrinsischer, proapoptotischer Signale auf die Zelle, reichert sich Gal-3 vor allem im intermembranösen Raum der Mitochondrien an. Als Resultat bleibt die Mitochondrienmembran intakt und die Freisetzung von Zytocrom c wird verhindert. In Abwesenheit dieses wichtigen Apoptosemediators schlägt die Aktivierung der Caspase-Kaskade fehl und die Apoptose wird wirkungsvoll gehemmt (Yu et al., 2002).

Anoikis ist eine besondere Form der Apoptose, die durch den Verlust der Zellverankerung, und damit verbundenem Ausbleiben der Interaktionen zwischen Epithelzellen und extrazellulärer Matrix, ausgelöst wird (Frisch und Francis, 1994). Kim et al. (1999) wiesen nach, dass Gal-3 in der Lage ist die Vitalität der Zellen, auch nach dem Entfernen aus dem Zellverband, zu erhalten. Die Autoren vermuten in diesem Zusammenhang eine Arretierung des Zellzyklus in der G1-Phase durch Gal-3, da während dieser Phase des Zellzyklus die Zellen gegenüber Anoikis unempfindlich sind.

Antiapoptotische Bcl-2-Proteine werden durch Caspasen gespalten. Nach der Spaltung bleibt scheinbar ein Fragment zurück, welches proapoptotisch wirkt (Xue und Horvitz, 1997; Cheng et al., 1997; Adams und Cory, 1998). Durch die proteolytische Aktivität der Caspasen kommt es zu dem Zusammenbruch

verschiedener Zellstrukturen. Die Kernlamina, eine aus intermediären Filamenten bestehende Struktur unter der Kernmembran, ist an der Chromatinorganisation beteiligt. Nach Spaltung der Kernlamina kommt es zur Chromatinkondensation (Orth et al., 1996). Proteine, die an der Regulierung des Zytoskeletts beteiligt sind, werden ebenfalls von Caspasen gespalten. Infolgedessen kommt es zum Verlust der Zellmembranintegrität und zur Störung der Interaktionen mit der Basalmembran. Gelsolin, ein Protein, das Aktinfilamente kontrolliert schneidet, wird nach Spaltung in ein Fragment umgewandelt, das permanent schneidet (Kothakota et al., 1997). Integrine, die die Basalmembran mit der Zellmembran verankern werden ebenfalls durch Caspasen gespalten (Thornberry und Lazebnik, 1998). Die proteolytische Aktivität der Caspasen führt zu morphologisch meß- und sichtbaren Ereignissen. Dazu gehören Chromatinkondensation, Auflösung der Zellmembran und Aufreißen der Kernmembran (Kerr et al., 1972; Wyllie et al., 1980)

#### **2.4.3 Clearance: die letzte Phase der Apoptose**

Die Beseitigung (Clearance) abgestorbener Zellen findet durch professionelle Phagozyten (Makrophagen), semi-professionelle Phagozyten (z.B. Fibroblasten) und 'Amateurphagozyten' (z.B. Epithelzellen) statt (Fadok, 1999). Durch die Clearance kann eine große Anzahl Zellen ohne Störung der Gewebestruktur oder -funktion entfernt werden (Kerr et al., 1972; Wyllie et al., 1980; Savill, 1997; Ren und Savill, 1998; Fadok und Henson, 1998). Die Beseitigung der Zellen findet schnell und ohne Entzündungsreaktion, d.h. ohne eine Einwanderung neutrophiler Granulozyten, statt. Walker et al. (1989) zeigten, dass während der Involution der Milchdrüse bei Ratten und Mäusen apoptotische Epithelzellen sowohl durch Makrophagen, als auch durch gesunde, benachbarte Epithelzellen phagozytiert werden. Da die Involution der Milchdrüse bei Milchkühen nicht im solchen Maße mit Epithelzellverlust und Strukturveränderung einhergeht, wie bei Ratten und Mäusen (Capuco und Akers, 1999), ist bei Rindern eine extrem erhöhte Phagozytose nicht zu erwarten. Die Beseitigung apoptotischer Zellen erfordert einen Differenzierungsprozess der Phagozyten, da frisch isolierte Monozyten und Gewebsmakrophagen nicht in der Lage sind apoptotische Zellen aufzunehmen (Newman et al., 1982; Savill et al., 1989). Spezifische Rezeptoren auf der Oberfläche der Phagozyten und Liganden der apoptotischen Zellen müssen ausgebildet werden, bevor es zur Phagozytose kommt.

Potentielle Rezeptoren sind CD14, CD4/CD8, Lektine und Class A scavenger receptors (Devitt et al., 1998; Duvall et al., 1985; Platt et al., 1996). Weitere Rezeptoren, die an der Signaltransduktion beteiligt sein sollen, sind  $\alpha\beta 3$  (vitronectin receptor-VnR), CD36 (Class B scavenger receptor and thrombospondin receptor) und der ABC1 transporter (Savill et al., 1990; Savill et al. 1992; Luciani und Chimini, 1996). Schon relativ früh im apoptotischen Prozess wird Phosphatidylserin (PS) vom inneren Blatt der Zellmembran zum äußeren Blatt verlagert (Fadok et al., 1992). Dieses Phospholipid scheint speziell von Makrophagen erkannt zu werden. Die Struktur des Rezeptors an den Makrophagen ist noch unbekannt. Wang et al. (1998) fanden heraus, dass einige der Rezeptoren, von denen bekannt ist, dass sie die Aufnahme apoptotischer Zellen einleiten, PS erkennen. Dazu gehören CD36, CD68 und CD14. Über die Rezeptoren auf den Epithelzellen, die zur Phagozytose befähigt sind, ist wenig bekannt. Von Interesse ist es, dass CD36 auf einer Vielzahl von Epithelzellen, darunter auf dem Epithel von Milchdrüse, Retina, Haut und Mucosa, vorhanden ist (Aoki et al., 1997; Gomez et al., 1997; Simon et al., 1996; Berglund et al., 1996; Ryeom et al., 1996).

Die Apoptose einer Zelle endet mit ihrer Aufnahme durch einen Phagozyten. Im Gegensatz zur Nekrose findet hier kein Austritt von Zytoplasma- oder Kernmaterial in der unmittelbaren Umgebung statt und eine Entzündungsreaktion bleibt aus (Rosfjord und Dickson, 1999).

#### **2.4.4 Zelluläre Proliferation**

Die zelluläre Proliferation ist ein grundlegender, biologischer Prozess, der komplexen, koordinierten Kontrollmechanismen unterliegt.

Der Ki-67 Antikörper wird als Proliferationsmarker zur quantitativen Erfassung der Proliferationsrate eines Gewebes eingesetzt. Der Zellzyklus stellt die Abfolge von Phasen der Zellreifung und Zellteilung dar. In der  $G_1$ -Phase findet eine kontinuierliche Erhöhung der RNA- und Proteinsynthese statt. Eine  $G_1$ -Phase ohne nachfolgende Synthesephase wird als  $G_0$ -Phase bezeichnet. Während der S-Phase, der DNA-Synthesephase, wird die DNA verdoppelt. Die  $G_2$ -Phase stellt die prämitotische Vorbereitungsphase dar. Auf die  $G_2$ -Phase folgt die Mitosephase (M-Phase), in der zwei identische diploide Tochterzellen entstehen (Howard und Pelc, 1951). Die Expression des nukleären Ki-67 Antigens ist im Verlauf des

Zellzyklus nicht konstant. Sie beginnt in der späten G<sub>1</sub>-Phase und erreicht unter stetiger Zunahme in der Mitose ihren Höhepunkt. Das Antigen ist in der G<sub>0</sub>-Phase und der frühen G<sub>1</sub>-Phase nicht nachweisbar (Gerdes et al., 1984).

Gerdes et al. (1983) stellten einen monoklonalen Antikörper, der das Ki-67 Antigen proliferierender Zellen markiert, als erste her. Die Namensgebung erfolgte anhand des Orts der erstmaligen Produktion (Kiel) und dem antikörperproduzierenden Klon, dessen Anzucht an der 67. Stelle der Mikrotiterplatte gelang (Brown und Gatter, 1990). Als Weiterentwicklung des Ki-67 Antikörpers stellten Cattoretti et al. (1992) drei monoklonale Antikörper (MIB 1-3) her, die gegen rekombinante Abschnitte des Ki-67 Antigens gerichtet sind. Der Einsatz des MIB-1 Antikörper in der Immunhistochemie bietet gegenüber dem des Ki-67 Antikörpers einen entscheidenden Vorteil. Die Untersuchungen, die bisher auf Gefrierschnitte beschränkt waren, konnten mit Hilfe des MIB-1 Antikörpers auf Paraffinschnitte ausgedehnt werden. Der Nachweis proliferierender Zellen in Paraffinschnitten von Geweben der Haustiere wurde damit durchführbar (Teter et al., 1995).



### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Untersuchungsmaterial

Zur Untersuchung gelangten zehn Euterbiopsien von drei Kühen der Rasse Swiss Brown, sowie acht Gewebeproben des Euters von vier Kühen der Rasse Deutsches Fleckvieh. Sie wurden zu verschiedenen Zeiten der Trockenstehperiode entnommen (s. Tabelle 1).

**Tabelle 1: Untersuchungsmaterial**

Pröp. Nr.	Stadium	trächtig	Probenart
297	8 h trocken	nein	Biopsie
298	24 h "	"	"
299	108 h "	"	"
449	24 h trocken	ja	Biopsie
450	48 h "	"	"
451	96 h "	"	"
452	14 d "	"	"
453	24 h trocken	nein	Gewebe
454	"	"	"
455	48 h trocken	nein	Gewebe
456	"	"	"
457	96 h trocken	nein	Gewebe
458	"	"	"
465	14 d trocken	nein	Gewebe
466	"	"	"
304	14 d prepart.	ja	Biopsie
305	7 d "	"	"
306	Kalbung	"	"

#### 3.2 Probenentnahme

Die Euterbiopsien wurden von Prof. Schams in der Lehr- und Versuchsanstalt Weihenstephan am stehenden und sedierten Tier gewonnen. Mit der Biopsiekanüle nach Bergström (1962) wurden in einer Tiefe von 3,5cm aus dem oberen Drittel des

jeweiligen Euterviertels Proben mit einer Seitenlänge von 5mm entnommen und in verschiedene Fixierlösungen (siehe 3.3) gegeben. Die Entnahme der Gewebeproben 453-466 erfolgte am Städtischen Schlachthof München. Das gesamte Euter wurde kurz nach der Schlachtung vom Schlachtkörper abgetrennt. Am Präpariertisch wurden aus den vier Vierteln des Euters Proben mit einer Seitenlänge von 5mm entnommen und in verschiedene Fixierlösungen (siehe 3.3) gegeben.

### **3.3 Probenaufbereitung und Fixierung**

Für die lichtmikroskopischen und immunhistochemischen Verfahren wurden die Proben in Bouin Lösung (Romeis 1989) und Methanol / Eisessig (2:1) fixiert. Die Gewebeproben wurden für 6 Stunden, die Biopsieproben für 3 Stunden einer Fixierung unterzogen. Anschließend wurden die Proben bei 4°C in 70 % Ethanol gelagert. Im Einbettungsautomaten (Shandon Duplex Processor, Fa. Shandon) wurden die Proben über 24 Stunden in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert, mit flüssigem Paraplast® (Fa. Sherwood medicae, Sussex, UK) infiltriert und daraufhin unter Zuhilfenahme eines Histostat Tissue Embedding Centers (Fa. Reichert-Jung, Wien, Österreich) in Blöcke gegossen. Aus jedem Block wurden 5 µm dicke Schnitte mit dem Rotationsmikrotom Typ 1516 (Fa. Leitz GmbH, Wetzlar) hergestellt. Nach dem Aufbringen auf Objektträger (Fa. Menzel, Braunschweig; beschichtet / unbeschichtet) und 24 stündiger Trocknung im Wärmeschrank (Fa. Bender & Hobein, München-Karlsruhe) bei 40°C, wurden die histologischen Schnitte dunkel und trocken bei Zimmertemperatur bis zur weiteren Verwendung gelagert.

### **3.4 Histologische Untersuchungsmethoden**

#### **3.4.1 Konventionelle histologische Färbungen**

Auswertung und Beurteilung der Schnitte wurden mit einem Forschungsmikroskop (Aristoplan, Fa. Leitz GmbH, Wetzlar) vorgenommen. Mit dem Kamerasystem für die automatische Mikrofotografie (Orthomat E, Fa. Leitz) wurde fotografiert und unter der Verwendung der Software Adobe Photoshop Version 6.0 fand die Bearbeitung der Fotos statt. Die Ermittlung der Bindegewebsfläche, der Gesamtfläche, der Alveolarlumenfläche, Zellkerndurchmesser und der Epithelhöhe wurde durch

Benutzung der Software Carnoy 2.0 bewerkstelligt. In der 10fachen Vergrößerung wurden die Flächen des gesamten Präparates vermessen. Das Ausmessen der Epithelhöhe fand bei 40facher Vergrößerung statt. Dabei wurden jeweils 150 Epithelzellen vermessen und der Durchschnittswert ermittelt.

Nach Entparaffinieren und Rehydrierung der Schnitte wurden die folgenden konventionellen histologischen Färbungen zur Beurteilung durchgeführt (siehe auch Anhang).

Folgende Übersichtsfärbungen (Romeis, 1989) wurden angefertigt:

- Hämalaun-Eosin-Färbung (H.E.)
- Resorcinfuchsin-Kernechtrot (nach Weigert)
- PAS-Reaktion (nach Mc Manus)
- Trichromfärbung (nach Masson und Goldner)

### **3.4.2 Immunhistochemische Färbungen**

Für die immunhistochemischen Nachweise wurde die ABC-Methode (Avidin-Biotin-Complex) nach Guesdon et al. (1979) und Hsu et al. (1981) zur Darstellung der Antigene an Bouin-fixierten Paraffinschnitten angewandt. Bei der ABC-Methode wird ein biotinylierter Sekundärantikörper durch den Avidin-Biotin-Meerrettich-Peroxidase-Komplex markiert und der Ort der Antigen-Antikörper-Reaktion schließlich durch das Chromogen 3,3 Diaminobenzidin (DAB) dargestellt. Die APAAP-Methode (alkaline phosphatase-anti-alkaline phosphatase) fand bei der Bestimmung der Mitoserate durch Nachweis des Ki-67-Proteins Anwendung. Nach Inkubation mit monoklonalen Primärantikörpern werden die Schnitte durch verschiedene Reagentien geführt, einschließlich Anti-Maus IgG, und danach mit APAAP-Komplexen unter Einhaltung verschiedener Zeitintervalle inkubiert. Diese Methode ist zeitsparend, da die Inkubation mit dem Primärantikörper nicht über Nacht erfolgen muß. Als dritte Methode wurden FITC-markierte Antikörper gegen CD4 und CD8 verwendet. Die Kernfärbung erfolgte mit DAPI. Die Auswertung der Präparate erfolgte mit dem

Laboratoriums- und Forschungsmikroskop (Dialux 20, Fa. Leitz) und dem confokalen Mikroskop (LSM 510 meta, Zeiss, Jena). Mittels eines Handzählgerätes wurden jeweils die positiven Epithelzellen aus 6 x 50 Epithelzellen entsprechend ausgezählt. Um falsch-negative und falsch-positive Ergebnisse auszuschließen, wurde bei allen Versuchen je eine Negativ-Kontrolle, die nur mit Puffer inkubiert wurde, und je eine Positiv-Kontrolle mit Gewebe, das die entsprechenden Antigene enthält, mit inkubiert.

### **3.4.2.1 Avidin-Biotin-Methode**

1. Aufbewahrung der Paraffinschnitte im Wärmeschrank bei 40°C 16 h vor Versuchsbeginn.
2. Entparaffinierung der Schnitte in Xylol für 2 x 30 min. und anschließende Rehydrierung in absteigender Alkoholreihe (Isopropanol, 96% Ethanol, 70% Ethanol) bis Aqua dest. für jeweils 5 Minuten.
3. 3 x 5 Minuten in Phosphate Buffered Saline (PBS<sup>1)</sup>) Puffer (pH 7,4)
4. Mikrowellenbehandlung<sup>2)</sup>: Schnitte werden in entsprechenden Puffer<sup>3)</sup> überführt und 3 x 5 Minuten bei 600 Watt in der Mikrowelle erhitzt. Um ein Trockenwerden der Schnitte zu vermeiden, muss verdampfte Pufferlösung, vor dem Absinken des Pufferpegels unter die Schnitthöhe, ersetzt werden. Nach dem letzten Erhitzungsvorgang werden die Schnitte 30 Minuten zum Abkühlen in heißer Pufferlösung belassen.
5. 3 x 5 Minuten in PBS spülen.
6. Endogene Peroxidase hemmen in 7,5% Hydrogenperoxidlösung für 10 Minuten bei RT.
7. Leitungswasser fließend für 10 Minuten
8. 3 x 5 Minuten in PBS spülen.
9. Blockierung unspezifischer Bindungsstellen durch Auftragen von 100µl Normalserum<sup>4)</sup>/Schnitt.
10. Abgießen des Normalserums und Auftragen des Primärantikörpers (siehe Tabelle 2). Einhaltung der erforderlichen Inkubationszeit<sup>5)</sup>.
11. 3 x 5 Minuten in PBS spülen.
12. Inkubation mit dem Sekundärantikörper für 30 Minuten bei RT(siehe Tabelle 2).
13. 3 x 5 Minuten in PBS spülen.

14. Markierung des biotinylierten Sekundärantikörpers mit Streptavidin-Biotin-Meerrettich-Peroxidase-Komplex (Fa. DAKO, Hamburg): Inkubation für 30 Minuten bei RT.
15. 3 x 5 Minuten in PBS spülen.
16. Entwicklung in DAB<sup>6)</sup>-Lösung für 10 Minuten bei RT im Dunkeln.
17. Spülung je 5 Minuten in PBS und dann in Leitungswasser.
18. Evtl. Gegenfärbung der Kerne für 30 Sekunden in Hämalaun.
19. 10 Minuten fließend wässern in Leitungswasser.
20. Entwässern in aufsteigender Alkoholreihe (70% Ethanol, 96% Ethanol, Isopropanol). Anschließend 3 x 5 Minuten in Xylol.
21. Eindeckeln mit Eukitt<sup>® 7)</sup>.

#### Erläuterungen<sup>1-7)</sup>

<sup>1)</sup>PBS Puffer: 42,5g NaCl + 6,35g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-2H<sub>2</sub>O + 1,95g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O in 5l Aqua dest. lösen und pH 7,4-7,6 einstellen.

<sup>2)</sup>Mikrowellenbehandlung: alle außer Vimentin, MIF und Gal-3.

<sup>3)</sup>Mikrowellenpuffer: Citratpuffer 10mM (pH 6,0) für PR, ER

Puffer von Biologo<sup>®</sup> für Caspase-3

Puffer von Dako<sup>®</sup> pH 6,1 für bcl-2; pH 9,1 für bax

<sup>4)</sup>Normalserum: Vector<sup>®</sup> Elite Serum für Caspase-3, bax und bcl-2

Dako<sup>®</sup> Protein-Block-Serum-Free für PR, ER, Vimentin, Gal-3 und MIF.

<sup>5)</sup>Inkubationszeit des Primärantikörpers: Über Nacht bei PR, ER, MIF, Gal-3

1 h bei Caspase-3, bax, bcl-2

30 min. bei Vimentin

<sup>6)</sup>DAB: 3,3 Diaminobenzidin

Herstellen der Lösung: 50 ml Puffer+0,15ml 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Von dieser Stammlösung 0,4 ml zu einer Mischung aus 60 ml Aqua dest. und 6 DAB Tabletten geben. Nach Mischung und Filtration wird für 5 Minuten inkubiert.

<sup>7)</sup>Eindeckmittel: Eindeckeln mit Eukitt<sup>®</sup> (Riedel-de-Haen AG)

### 3.4.2.2 FITC-DAPI-Methode

1. Aufbewahrung der Paraffinschnitte im Wärmeschrank bei 40°C 16 h vor Versuchsbeginn.
2. Entparaffinierung der Schnitte in Xylol für 2 x 30 min. und anschließende Rehydrierung in absteigender Alkoholreihe (Isopropanol, 96% Ethanol, 70% Ethanol) bis Aqua dest. für jeweils 5 Minuten.
3. 3 x 5 Minuten in Phosphate Buffered Saline (PBS<sup>1)</sup>) (pH 7,4)
4. Endogene Peroxidase hemmen mit 7,5% Hydrogenperoxidlösung für 10 Minuten bei RT.
5. Leitungswasser fließend für 10 Minuten
6. 3 x 5 Minuten in PBS spülen.
7. Blockierung unspezifischer Proteinbindungsstellen durch Auftragen von Dako<sup>®</sup> Protein-Block-Serum-Free (100µl/Schnitt).
8. Abgießen des Proteinblockers und Auftragen des Primärantikörpers aus der Maus MAB anti bovine mit einer Verdünnung von 1:200. Anschließend Inkubation über Nacht im Kühlschrank bei 5°C.
9. 3 x 5 Minuten in PBS spülen.
10. Für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit Anti-Maus IgG FITC<sup>2)</sup> vom Kaninchen (Verd. 1:10) inkubieren.
11. 3 x 5 Minuten in PBS spülen
12. DAPI<sup>3)</sup> (Verd. 1:1000) 10 Minuten bei RT inkubieren.
13. 3 x 5 Minuten in PBS spülen
14. 10 Minuten fließend wässern in Leitungswasser.
15. Entwässern in aufsteigender Alkoholreihe (70% Ethanol, 96% Ethanol, Isopropanol). Anschließend 3 x 5 Minuten in Xylol.
16. Eindecken mit Gel Mount von biomed<sup>®</sup>.

#### Erläuterungen<sup>1-3)</sup>

<sup>1)</sup>PBS Puffer: 42,5g NaCl + 6,35g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-2H<sub>2</sub>O + 1,95g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O in 5l Aqua dest. lösen und pH 7,4-7,6 einstellen.

<sup>2)</sup>FITC: Fluoresceinisothiocyanat.

<sup>3)</sup>DAPI: 4,6-Diamidin-2-phenylindol

### 3.4.2.3 APAAP-Methode

1. Aufbewahrung der Paraffinschnitte im Wärmeschrank bei 40°C 16 h vor Versuchsbeginn.
2. Entparaffinierung der Schnitte in Xylol für 2 x 30 min. und anschließende Rehydrierung in absteigender Alkoholreihe (Isopropanol, 96% Ethanol, 70% Ethanol).
3. 2 x spülen in Aqua dest. für je 5 Minuten.
4. 2 x waschen in Tris-Puffer<sup>1)</sup> für je 5 Minuten.
5. Schnitte werden in Puffer von Dako (Hamburg, Deutschland) (pH 6,1) überführt und 3 x 10 min. bei 600 Watt in der Mikrowelle erhitzt. Um ein Trockenwerden der Schnitte zu vermeiden, muss verdampfte Pufferlösung, vor dem Absinken des Pufferpegels unter die Schnitthöhe, ersetzt werden. Nach dem letzten Erhitzungsvorgang werden die Schnitte 20 Minuten zum Abkühlen in heißer Pufferlösung bei Raumtemperatur belassen.
6. 2 x 5 Minuten in Tris-Puffer waschen.
7. Mit Primärantikörper Ki-67 von Dako<sup>®</sup> (Verd. 1:50) für 1 Stunde bei RT inkubieren.
8. 2 x 5 Minuten in Tris-Puffer waschen
9. Inkubation mit Anti-Maus IgG vom Kaninchen (Verd. 1:25) für 30 Minuten.
10. 2 x 5 Minuten in Tris-Puffer waschen
11. Inkubation mit APAAP<sup>2)</sup> Mouse Monoclonal Komplex (Verd. 1:50) für 30 Minuten.
12. 2 x 5 Minuten in Tris-Puffer waschen
13. Inkubation mit Anti-Maus IgG vom Kaninchen (Verd. 1:25) für 10 Minuten.
14. Inkubation mit APAAP Mouse Monoclonal Komplex (Verd. 1:50) für 10 Minuten.
15. 2 x 5 Minuten in Tris-Puffer waschen
16. Färben mit Fast Red<sup>3)</sup> für 15 Minuten.
17. 2 x 5 Minuten in Tris-Puffer waschen.
18. 5 Minuten mit Leitungswasser spülen.
19. Evtl. Gegenfärbung der Kerne für 30 Sekunden in Hämalaun
20. 10 Minuten fließend wässern in Leitungswasser.
21. Eindecken mit Kaisers<sup>®</sup> Glyceringelatine.

Erläuterungen<sup>1-3)</sup>

<sup>1)</sup>Tris-Puffer: 43,4g NaCl + 34,25g Trisma Hydro

<sup>2)</sup>APAAP: Monoclonal alkaline phosphatase-anti-alkaline phosphatase complex

<sup>3)</sup>Fast Red: 1 Tabl. (Sigma F 4648) in 1ml Aqua dest. und 10ml Tris-Puffer gelöst

#### **3.4.2.4 TUNEL (Terminal deoxynucleotide transferase-mediated deoxyuridine nick end labelling)**

Es wurden mit Hilfe des ApopTag<sup>®</sup> Plus In Situ Apoptosis Detection Kit #S7110 (Fa. Oncor, Inc., USA) DNA-Fragmente sichtbar gemacht.

1. Aufbewahrung der Paraffinschnitte im Wärmeschrank bei 40°C 16 h vor Versuchsbeginn.
2. Entparaffinierung der Schnitte in Xylol für 2 x 30 min. und anschließende Rehydrierung in absteigender Alkoholreihe (Isopropanol, 96% Ethanol, 70% Ethanol) bis Aqua dest. für jeweils 5 Minuten.
3. 2 x 5 Minuten in Phosphate Buffered Saline (PBS<sup>1)</sup>) (pH 7,4).
4. Inkubieren der Schnitte mit Proteinase K (ApopTag<sup>®</sup>) (5µg/ml PBS) für 10 min. im Wasserbad bei 37°C.
5. 4 x 5 min. spülen in Aqua dest..
6. Hemmung der endogenen Peroxidase mit Hydrogenperoxidlösung (6ml 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lsg. in 54 ml PBS) bei Raumtemperatur für 5 min.
7. 2 x 5 min. in PBS spülen.
8. Spülen mit Äquilibriumspuffer für 15 sek. bei Raumtemperatur (13µl/cm<sup>2</sup>).
9. Inkubation mit Tdt-Enzym Arbeitslösung<sup>2)</sup> für 1 h bei 37°C in feuchter Kammer im Brutschrank (10µl/cm<sup>2</sup>); Schnitte mit Folie abdecken.
10. 10 min. mit der Stopplösung<sup>3)</sup> (Celloshaker<sup>®</sup>) inkubieren.
11. 2 x 5 min. in PBS spülen.
12. Inkubation mit Anti-Digoxigenin-Fluorescein (S7110-6) für 30 min. bei Raumtemperatur (13µl/cm<sup>2</sup>); Schnitte mit Folie abdecken.
13. 2 x 5 min. in PBS spülen.
14. Eindecken der Schnitte mit Eukitt<sup>®</sup> (Fa. Riedel-de Haen, Seelze).



### Erläuterungen<sup>1-3)</sup>

<sup>1)</sup>PBS Puffer: 42,5g NaCl + 6,35g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-2H<sub>2</sub>O + 1,95g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O in 5l Aqua dest. lösen und pH 7,4-7,6 einstellen.

<sup>2)</sup>Tdt-Enzym Arbeitslösung: 70µl Reactionbuffer + 30µl tdt Enzym, auf Eis 6h haltbar.

<sup>3)</sup>Stopplösung: 2ml Stammlösung + 68ml Aqua dest..

**Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Primär- und Sekundärantikörper**

<b>Antigen</b>	<b>Primär-antikörper</b>	<b>Sekundär-antikörper</b>	<b>Firma</b>	<b>Inkubationszeit</b>	<b>Vorbehandlung</b>
<b>Östrogenrezeptor (ER<math>\alpha</math>)</b>	Kaninchen Anti-ER $\alpha$ Verd. 1: 400	Anti-Schwein IgG biot. v. Kaninchen Verd. 1: 300	Santa Cruz Heidelberg	über Nacht	Mikrowelle/ Citratpuffer
<b>Progesteronrezeptor (PR)</b>	Rind Anti-PR Verd. 1: 200	Anti-Maus IgG biot. v. Kaninchen Verd. 1: 300	Beckmann/ Coulter Krefeld	über Nacht	Mikrowelle/ Citratpuffer
<b>Vimentin</b>	Maus Anti-Vimentin Verd. 1: 200	Anti-Maus Ig G biot. v. Kaninchen Verd. 1: 300	Dako Hamburg	über Nacht	0,1% Protease
<b>Caspase-3</b>	Kaninchen Anti-Caspase-3 polyclonal Verd. 1: 150	Vektor Elite Kit	BD Pharmingen Heidelberg	1 h	Mikrowelle Biologopuffer
<b>Ki-67</b>	Maus Anti-Ki-67 Verd. 1: 50	Anti-Maus Ig G v. Kaninchen Verd. 1: 25	Dako Hamburg	1 h	Mikrowelle Dakopuffer
<b>MIF</b>	Kaninchen Anti-MIF Verd. 1: 100	Anti-Kaninchen IgG v. Schwein Verd. 1: 300	Dako Hamburg	über Nacht	Dako Protein Block Serum-Free
<b>Gal-3</b>	Kaninchen Anti-Gal-3 Verd. 1: 50	Anti-Kaninchen IgG v. Schwein Verd. 1: 300	Dako Hamburg	über Nacht	Dako Protein Block Serum-Free
<b>Bax</b>	Maus Anti-Bax Verd. 1: 100	Vektor Elite Kit	Zytomed Berlin	1 h	Mikrowelle Dakopuffer
<b>Bcl-2</b>	Maus Anti-Bax Verd. 1: 100	Vektor Elite Kit	Dako Hamburg	1 h	Mikrowelle Dakopuffer
<b>CD4/CD8</b>	Maus Anti-CD4/CD8 Verd. 1: 200	Anti-Maus IgG FITC v. Kaninchen Verd. 1: 10	Dako Hamburg	über Nacht	Dako Protein Block Serum-Free

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Histomorphologie

Die Epithelhöhe schwankt in der Involution zwischen 12,2 $\mu$ m und 11,7 $\mu$ m. Das Alveolarepithel ist in der Milchdrüse der graviden Kühe 24h und 48h nach dem Trockenstellen am höchsten. Die niedrigste Epithelhöhe von 11,7 $\mu$ m wird im Euter der graviden Kühe 14 Tage nach dem Trockenstellen und im Euter der nicht graviden Kühe 96h nach dem Trockenstellen gemessen.

Der Zellkerndurchmesser der Alveolarepithelzellen schwankt in der Involution zwischen 6,3 $\mu$ m und 6,0 $\mu$ m. Die geringste Ausdehnung erfährt der Zellkern in der Milchdrüse der nicht graviden Kühe 48h und 96h nach dem Trockenstellen.

Das Verhältnis von Epithelhöhe zu Zellkerndurchmesser nimmt in der Involution einen Wert zwischen 1,95 und 1,87 an.

Diesen Ergebnissen zufolge besteht die Tendenz, dass Epithelhöhe und Zellkerndurchmesser bei graviden Kühen grösser sind. Die Unterschiede zwischen den Datensätzen der Vergleichsgruppen gravide/nicht gravide sind jedoch nicht signifikant. Dies ergab der statistische t-Test nach W.S. Govett (1876-1937), wobei eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p=0,05$  vorausgesetzt wurde.

**Tabelle 3: Epithelhöhe/Zellkerndurchmesser**

Tiername	Stadium	Epithelhöhe E	Zellkerndurchmesser Z	E/Z	trächtig
<b>Toulouse</b>	24 h trocken	12,2µm	6,3µm	1,94	ja
"	48 h trocken	12,2µm	6,3µm	1,94	"
"	96 h trocken	12,1µm	6,3µm	1,92	"
"	14 d trocken	11,7µm	6,2µm	1,89	"
<b>Arnika</b>	14 d praepart.	12,0µm	6,3µm	1,9	ja
"	7 d praepart.	11,8µm	6,3µm	1,87	"
"	Kalbung	12,0µm	6,3µm	1,9	"
<b>Ariee</b>	8 h trocken	12,0µm	6,3µm	1,9	nein
"	24 h trocken	12,0µm	6,2µm	1,93	"
"	108 h trocken	11,9µm	6,2µm	1,91	"
<b>Atlantis</b>	24 h trocken	11,8µm	6,3µm	1,87	nein
"	"	11,9µm	6,2µm	1,91	"
<b>Salamina</b>	48 h trocken	11,8µm	6,1µm	1,93	nein
"	"	11,8µm	6,1µm	1,93	"
<b>Tia</b>	96 h trocken	11,7µm	6,1µm	1,91	nein
"	"	11,8µm	6,0µm	1,97	"
<b>Titanic</b>	14 d trocken	12,0µm	6,2µm	1,93	nein
"	"	12,1µm	6,2µm	1,95	"

Der Anteil des Bindegewebes an der Gesamtfläche ist 14 Tage vor der Kalbung mit 90,76% am grössten. Zu diesem Zeitpunkt ist der Anteil der Alveolarlumina an der Gesamtfläche mit 3,41% am geringsten. Der Bindegewebsanteil sinkt 14 Tage vor der Kalbung von 90,76% kontinuierlich auf 31,84%, was dem geringsten festgestellten Bindegewebsanteil entspricht, am Tag der Kalbung. Im gleichen Zeitraum steigt die Alveolarlumenfläche kontinuierlich von 3,41% auf 38,66%. Der grösste Anteil der Alveolarlumina an der Gesamtfläche wird 96h nach dem Trockenstellen im Milchdrüsengewebe der nicht trächtigen Kuh mit 43,17% gemessen.

Diesen Ergebnissen zufolge besteht die Tendenz, dass die Alveolarlumenfläche in den letzten 14 Tagen vor der Geburt zunimmt, während die Bindegewebsfläche im gleichen Zeitraum abnimmt.

Die Unterschiede zwischen den Datensätzen der Vergleichsgruppen hochträchtig/nicht hochträchtig sind jedoch nicht signifikant. Dies ergab der

statistische t-Test nach W.S. Govett (1876-1937), wobei eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p=0,05$  vorausgesetzt wurde.

**Tabelle 3a: Alveolarlumenfläche/Bindegewebsfläche**

Tiername	Stadium	Gesamtfläche ( $\mu\text{m}^2$ )	Alveolarlumenfläche ( $\mu\text{m}^2$ )	Bindegewebsfläche ( $\mu\text{m}^2$ )	Alveolarlumenanteil	Bindegewebsanteil	trächtig
<b>Tolouse</b>	24 h trocken	461776	22043	351613	4,77%	76,14%	ja
"	48 h trocken	383186	14278	248115	3,73%	64,75%	"
"	96 h trocken	378852	13400	275937	3,54%	72,83%	"
"	14 d trocken	394275	23873	347040	6,06%	88,02%	"
<b>Arnika</b>	14 d praepart.	419704	14296	380906	3,41%	90,76%	ja
"	7 d praepart.	440237	124284	185433	28,23%	42,12%	"
"	Kalbung	461776	178510	147026	38,66%	31,84%	"
<b>Ariee</b>	8 h trocken	458702	45100	321823	9,83%	70,16%	nein
"	24 h trocken	349047	23170	246394	6,64%	70,59%	"
"	108 h trocken	438893	23097	385913	5,26%	87,93%	"
<b>Atlantis</b>	24 h trocken	461776	88756	218808	19,22%	47,38%	nein
<b>Salamina</b>	48 h trocken	461776	170360	210383	36,89%	45,56%	nein
<b>Tia</b>	96 h trocken	461776	199337	216171	43,17%	46,81%	nein
<b>Titanic</b>	14 d trocken	461776	47580	327311	10,30%	70,88%	nein

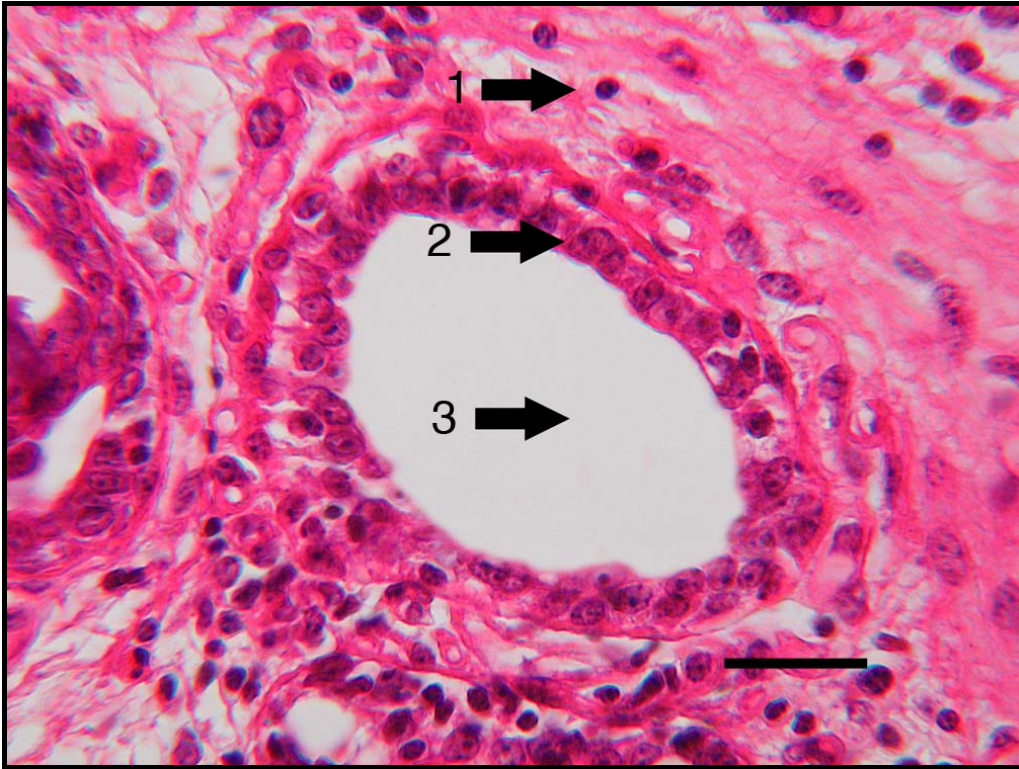


Abb.1: H.E. Färbung, Mamma (Rind), 14d trocken, trächtig, SB=25µm

- 1 subepitheliales Bindegewebe
- 2 Milchdrüsenepithel einer Alveole
- 3 Alveolarlumen

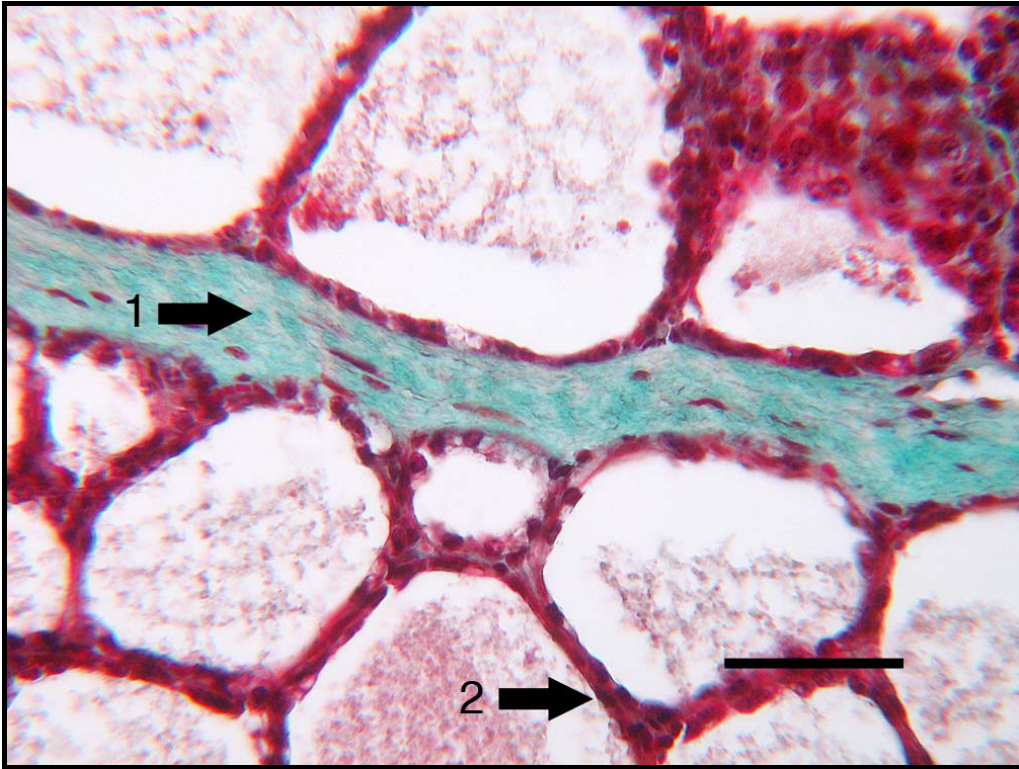


Abb.2: Goldner Färbung, Mamma (Rind), 48h trocken, nicht trächtig, SB=50µm

- 1 Bindegewebe (grün)
- 2 Alveolarepithel (rot)

## 4.2 Immunhistochemie

### 4.2.1 Immunhistochemischer Nachweis des Östrogenrezeptors (ER $\alpha$ )

Beim immunhistochemischen Nachweis des ER $\alpha$  lässt sich bei einem Teil der Epithelzellen eine deutlich positive Reaktion in den Kernen erkennen. Das Alveolarepithel weist ein ähnliches ER $\alpha$ -Expressionsmuster auf wie das Milchgangsepithel. ER $\alpha$ -positive Epithelzellen verteilen sich gleichmässig auf die Drüsenläppchen. Einzelne Alveoli und Ductuli zeigen keine ER $\alpha$ -Reaktivität. Stromale Zellen weisen in allen untersuchten Stadien eine sehr geringe Immunoreaktivität auf. Sehr vereinzelt auftretende immunopositive stromale Zellen sind in der Regel im dichten subepithelialen Stroma lokalisiert. Die Expression des ER $\alpha$  ist in den ersten Tagen der Involution am geringsten. Die meisten Zellen, die ER $\alpha$  exprimieren, lassen sich im Milchdrüsenepithel der nicht trächtigen Kuh 24 Stunden nach dem Trockenstellen anfärben. Nach zwei Wochen exprimieren im Durchschnitt 7,9% der Epithelzellen der nicht graviden Kuh den ER $\alpha$ . In der Hochträchtigkeit bis zur Kalbung lässt sich der ER $\alpha$  nicht nachweisen. In der frühen Phase der Trockenstehperiode zeigt sich im Epithel der graviden Kuh eine maximale Expressionsrate von 3,2% der Epithelzellen vierzehn Tage nach dem Trockenstellen. Die Endothelzellen der Gefäße und Adipozyten verhielten sich beim immunhistochemischen Nachweis von ER $\alpha$  negativ.



**Tabelle 4: Immunhistochemischer Nachweis des Östrogenrezeptors**

<b>Tiername</b>	<b>Stadium</b>	<b>pos. Epithelzellkerne</b>	<b>trächtig</b>
<b>Toulouse</b>	24 h trocken	2,0%	ja
"	48 h trocken	2,8%	"
"	96 h trocken	0,0%	"
"	14 d trocken	3,2%	"
<b>Arnika</b>	14 d praepart.	0,0%	ja
"	7 d praepart.	0,0%	"
"	Kalbung	0,0%	"
<b>Ariea</b>	8 h trocken	5,6%	nein
"	24 h trocken	7,2%	"
"	108 h trocken	6,0%	"
<b>Atlantis</b>	24 h trocken	7,2%	nein
"	"	10,4%	"
<b>Salamina</b>	48 h trocken	0,0%	nein
"	"	0,0%	"
<b>Tia</b>	96 h trocken	0,0%	nein
"	"	0,0%	"
<b>Titanic</b>	14 d trocken	8,0%	nein
"	"	7,8%	"

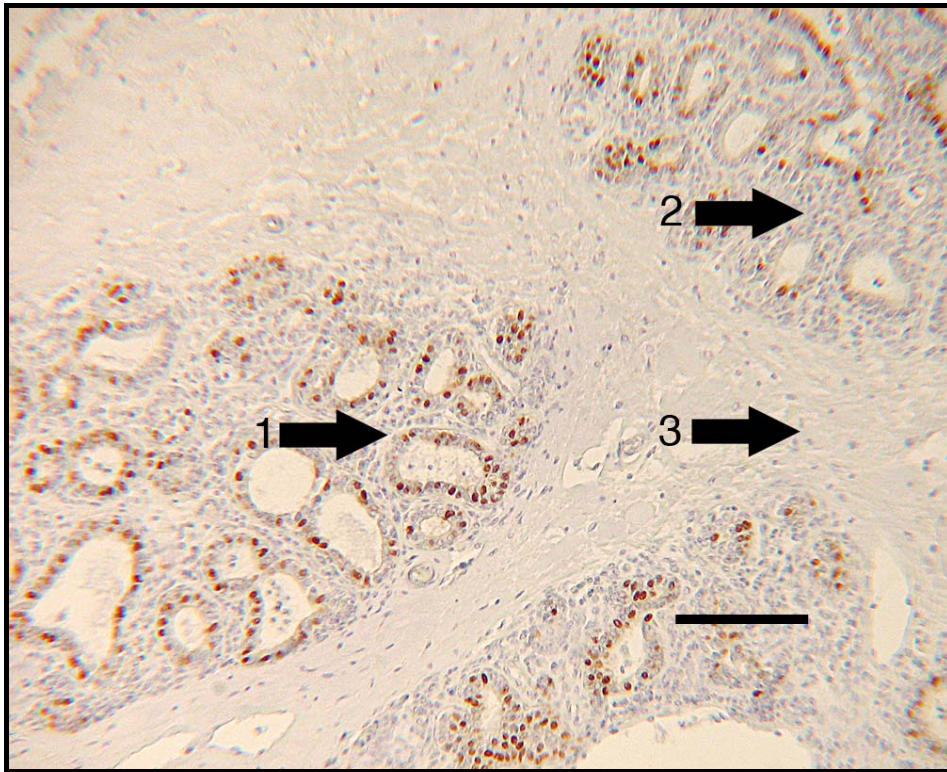


Abb.3: Immunhistochemischer Nachweis des ER $\alpha$ ,Mamma (Rind) 14d trocken, nicht trächtig, SB=100 $\mu$ m

- 1 positive Epithelzellkerne einer Alveole
- 2 dichtes intralobuläres Stroma
- 3 lockeres interlobuläres Stroma

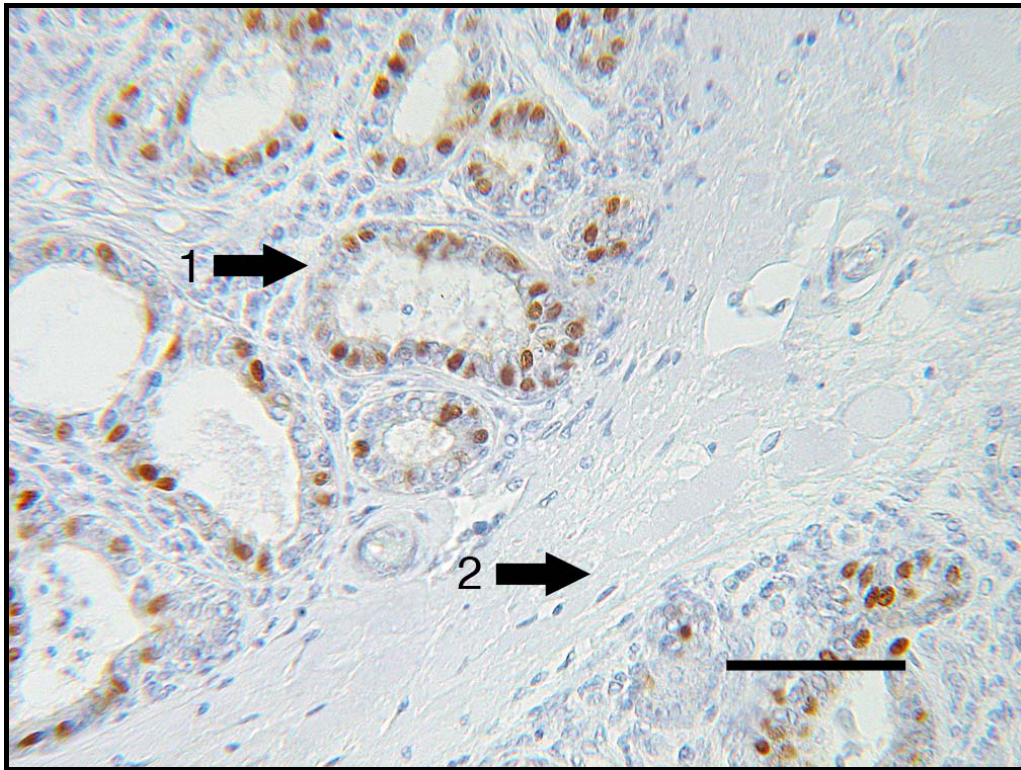


Abb.4: Immunhistochemischer Nachweis des ER $\alpha$ , Mamma (Rind), 14d trocken, nicht trächtig, SB=50 $\mu$ m

- 1 mehrere positive Epithelzellen im Epithel einer Alveole
- 2 lockeres interlobuäres Bindegewebe

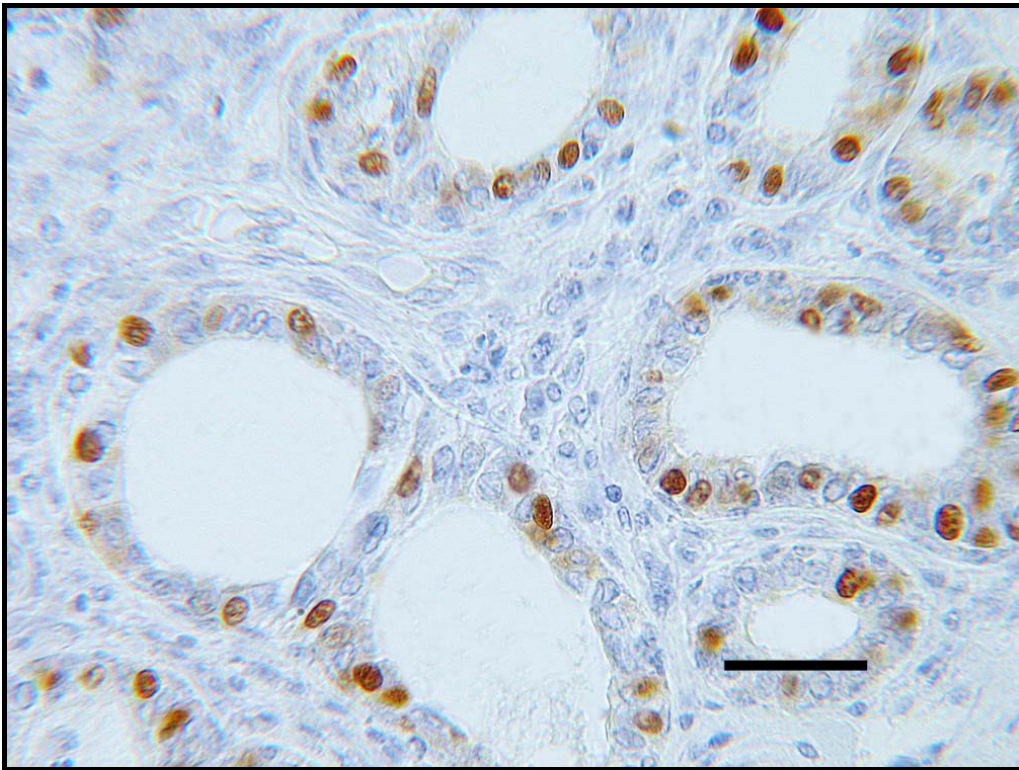


Abb.5: Immunhistochemischer Nachweis des ER $\alpha$ , Mamma (Rind), 14d trocken, nicht trächtig, SB=25 $\mu$ m  
Zahlreiche ER-positive Epithelzellkerne in den Alveoli und Ductuli; das subepitheliale Bindegewebe ist frei von positiven Zellen

#### **4.2.2 Immunhistochemischer Nachweis des Progesteronrezeptors (PR)**

Der PR ist in den Epithelzellkernen der Milchdrüse bei graviden Rindern deutlich nachweisbar. In der frühen Involution der Mamma schwankt die Expressionsrate zwischen ca. 20% und 30% positive Epithelzellen. Bei der quantitativen Auswertung der immunhistochemischen Untersuchung stellt sich heraus, dass die PR-Expression in den ersten 48h nach dem Trockenstellen konstant bleibt. 96h nach dem Trockenstellen nimmt der Prozentsatz PR-positiver Zellen des Epithels der von uns untersuchten Kuh um 10% ab. 14 Tage nach Involutionsbeginn steigt der Anteil immunopositiver Epithelzellen wieder auf 34,8% und nimmt damit einen Wert an, der auch am Anfang der Involution ermittelt wurde. Im praepartalen Zeitraum sinkt die Expressionsrate in den Alveoli und Ductuli bis zur Kalbung kontinuierlich von 12,8% vierzehn Tage praepartum auf 5,6% am Tag der Kalbung.

Der früheste Nachweis des PR im Euter von nicht graviden Kühen gelingt 14 Tage nach dem Trockenstellen mit einer Expressionsrate von ca.15%.

Immunopositive Epithelzellen finden sich dabei sowohl im Epithel der Milchgänge als auch der Alveolen.

PR-positive stromale Zellen sind häufiger im intralobulären als im interlobulären Bindegewebe anzutreffen. Endothelzellen der Arterien und Venen sind in allen Präparaten häufig deutlich PR-positiv gefärbt.



**Tabelle 5: Immunhistochemischer Nachweis des Progesteronrezeptors**

<b>Tiername</b>	<b>Stadium</b>	<b>pos. Epithelzellen</b>	<b>trächtig</b>
<b>Tolouse</b>	24 h trocken	30,8%	ja
"	48 h trocken	28,8%	"
"	96 h trocken	19,2%	"
"	14 d trocken	34,8%	"
<b>Arnika</b>	14 d praepart.	12,8%	ja
"	7 d praepart.	10,4%	"
"	Kalbung	5,6%	"
<b>Ariee</b>	8 h trocken	0,0%	nein
"	24 h trocken	0,0%	"
"	108 h trocken	0,0%	"
<b>Atlantis</b>	24 h trocken	0,0%	nein
"	"	0,0%	"
<b>Salamina</b>	48 h trocken	0,0%	nein
"	"	0,0%	"
<b>Tia</b>	96 h trocken	0,0%	nein
"	"	0,0%	"
<b>Titanic</b>	14 d trocken	15,2%	nein
"	"	14,8%	"

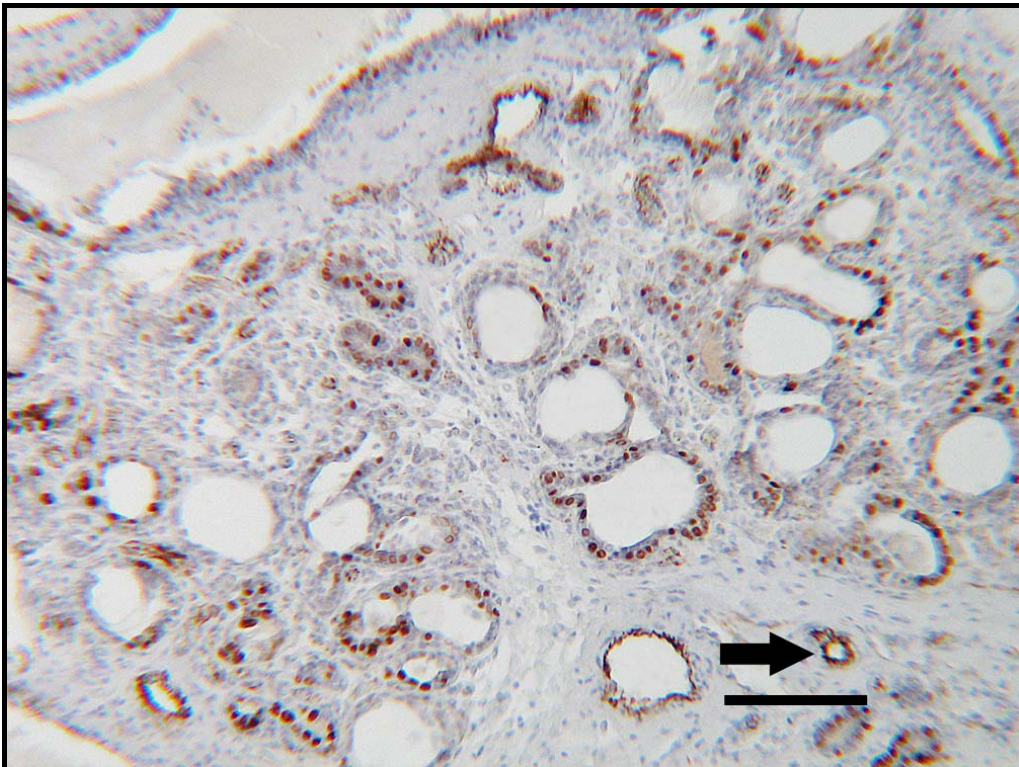


Abb.6: Immunhistochemischer Nachweis des PR, Mamma (Rind) 14d trocken, trächtig, SB=100µm  
Häufung von positiven Epithelzellkernen in den Alveolen  
Pfeil: positive Reaktionen der Endothelzellen einer Arterie

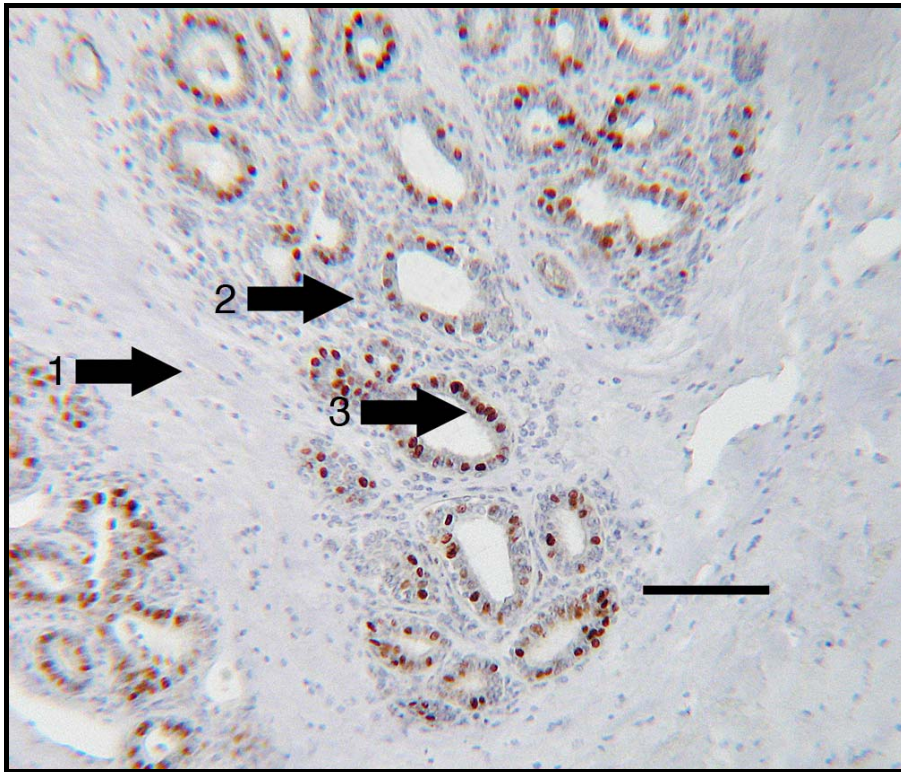


Abb.7: Immunhistochemischer Nachweis des PR, Mamma (Rind), 14d trocken, nicht trächtig, SB=100µm

- 1 lockeres interlobuläres Bindegewebe
- 2 dichtes intralobuläres Bindegewebe des mittleren Lobulus
- 3 positive Epithelzellkerne einer Alveole



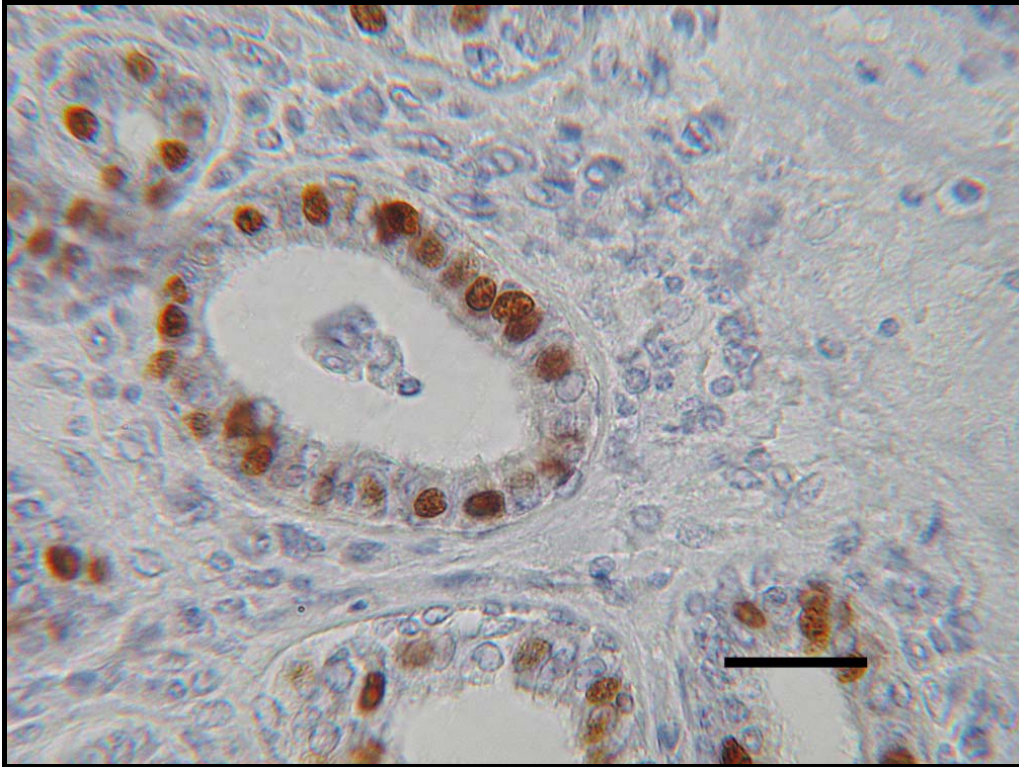


Abb.8: Immunhistochemischer Nachweis des PR, Mamma (Rind), 14d trocken, nicht trächtig, SB=25µm  
Positive Epithelzellkerne einer Alveole; im Lumen sind abgeschilferte Epithelzellen zu sehen

### 4.2.3 Immunhistochemischer Nachweis von Vimentin

Die meisten Zellen sind in allen Präparaten deutlich Vimentin-positiv. Hierbei handelt es sich um Fibroblasten, die bevorzugt im subepithelialen, intralobulären Bindegewebe liegen.

Erst 14 Tage nach dem Trockenstellen zeigt sich in den Epithelzellen der nicht trächtigen Kuh eine deutlich positive, zytoplasmatische Färbung. Die angefärbten Strukturen befinden sich supranukleär in den Epithelzellen der Alveolen und Milchgänge.

**Tabelle 6: Immunhistochemischer Nachweis von Vimentin**

Tiername	Stadium	pos. Epithelzellen	trächtig
<b>Toulouse</b>	24 h trocken	0,0%	ja
"	48 h trocken	0,0%	"
"	96 h trocken	0,0%	"
"	14 d trocken	0,0%	"
<b>Arnika</b>	14 d praepart.	0,0%	ja
"	7 d praepart.	0,0%	"
"	Kalbung	0,0%	"
<b>Ariee</b>	8 h trocken	0,0%	nein
"	24 h trocken	0,0%	"
"	108 h trocken	0,0%	"
<b>Atlantis</b>	24 h trocken	0,0%	nein
"	"	0,0%	"
<b>Salamina</b>	48 h trocken	0,4%	nein
"	"	0,0%	"
<b>Tia</b>	96 h trocken	0,0%	nein
"	"	0,0%	"
<b>Titanic</b>	14 d trocken	18,0%	nein
"	"	18,8%	"

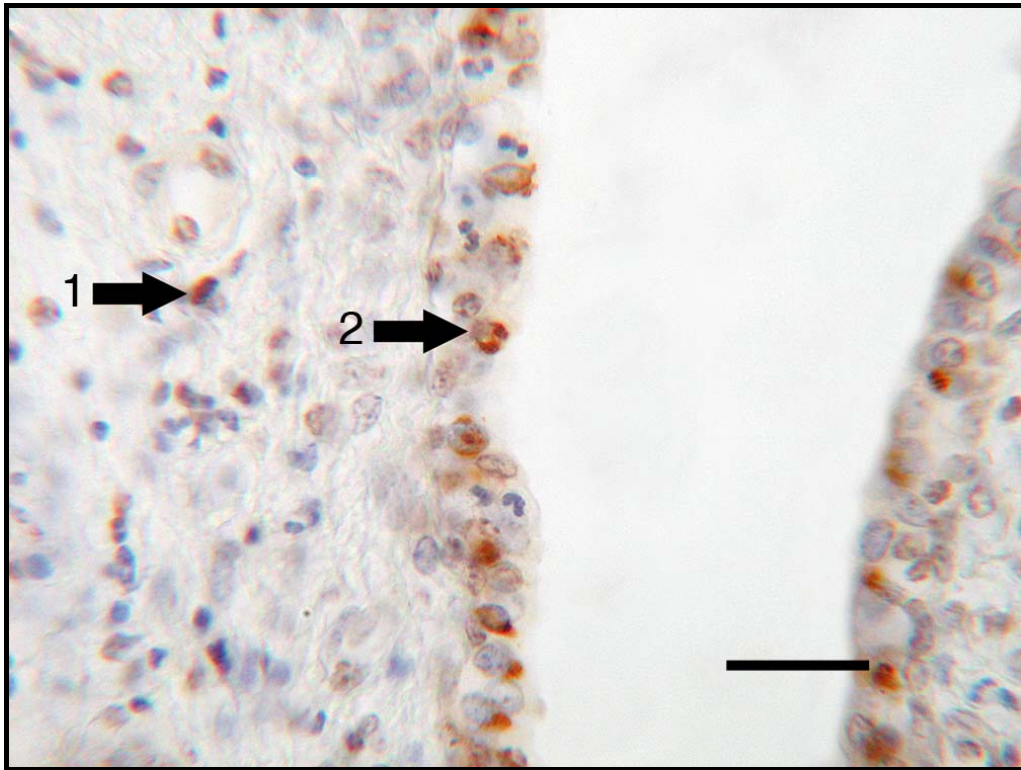


Abb.9: Immunhistochemischer Nachweis von Vimentin, Mamma (Rind), 14d trocken, nicht trächtig, SB=25 $\mu$ m

- 1 subepitheliales Bindegewebe mit vereinzelt positiven Fibroblasten
- 2 supranukleär gelegene Vimentin-positive Strukturen in der Epithelzelle eines Milchgangs

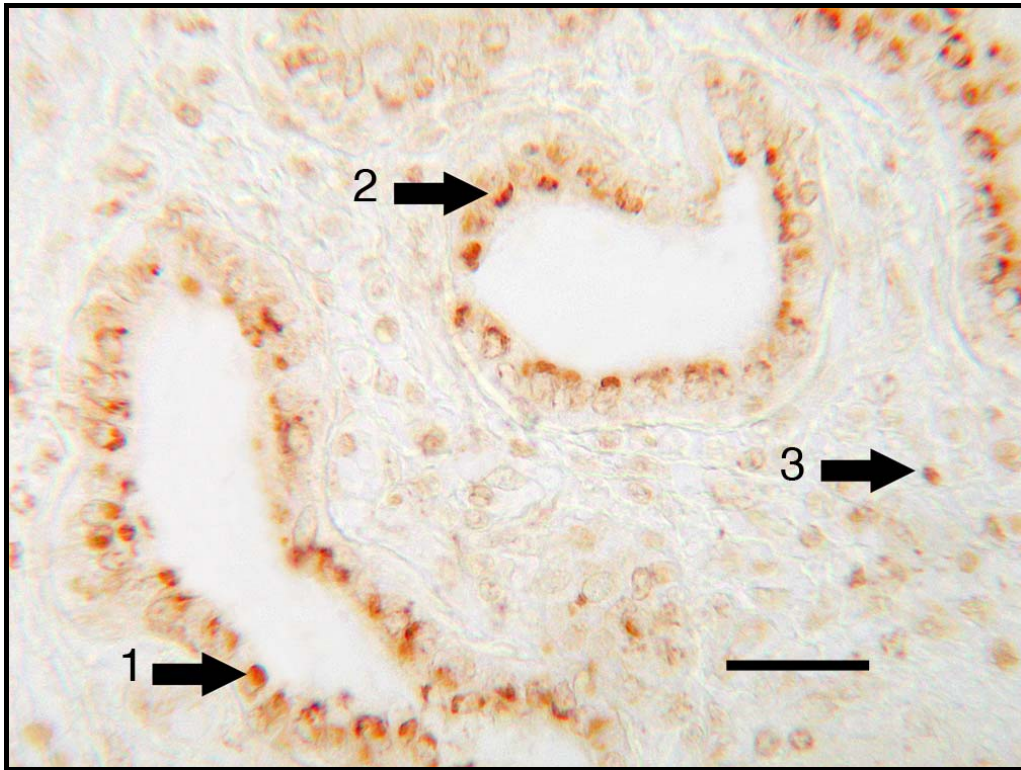


Abb.10: Immunhistochemischer Nachweis von Vimentin, Mamma (Rind), 14d trocken, nicht trächtig, SB=25µm

- 1 supranukleär gelegene Vimentin-positive Strukturen in Epithelzellen eines Milchgangs
- 2 supranukleär gelegene Vimentin-positive Strukturen in Epithelzellen einer Alveole
- 3 intralobuläres Bindegewebe mit vereinzelt positiven Fibroblasten

#### 4.2.4 Immunhistochemischer Nachweis von Caspase-3

In den untersuchten Proben ist eine deutlich positive Reaktion auf Caspase-3 nur in den ersten 14 Tagen nach Beginn der Involution zu registrieren. Bei Trächtigkeit war im Epithel der Alveolen und Milchgänge nach 24 Stunden noch keine einzige Zelle Caspase-3-positiv. 48h nach Beginn des Trockenstellens sind 8,4% der Epithelzellen markiert. Nach 96 Stunden war in dem von mir untersuchten Material keine positive Reaktion festzustellen, doch am 14. Tag des Trockenstehens stieg der Anteil positiver Epithelzellen erneut auf 5,2%. In den nicht graviden Kühen sind nach 24h durchschnittlich nur 1,4% der Epithelzellen der Alveolen positiv. Im weiteren Verlauf der frühen Phase der Trockenstehperiode lässt sich Caspase-3 immunzytochemisch nicht mehr nachweisen.

Die Endothelzellen der Blut und Lymphgefäße, Bindegewebszellen und die freien Zellen verhielten sich immer negativ.

**Tabelle 7: Immunhistochemischer Nachweis von Caspase-3**

Tiername	Stadium	Apoptoserate	trächtig
<b>Toulouse</b>	24 h trocken	0,0%	ja
"	48 h trocken	8,4%	"
"	96 h trocken	0,0%	"
"	14 d trocken	5,2%	"
<b>Arnika</b>	14 d praepart.	0,0%	ja
"	7 d praepart.	0,0%	"
"	Kalbung	0,0%	"
<b>Ariee</b>	8 h trocken	0,0%	nein
"	24 h trocken	0,8%	"
"	108 h trocken	0,0%	"
<b>Atlantis</b>	24 h trocken	2,0%	nein
"	"	0,8%	"
<b>Salamina</b>	48 h trocken	0,0%	nein
"	"	0,0%	"
<b>Tia</b>	96 h trocken	0,0%	nein
"	"	0,0%	"
<b>Titanic</b>	14 d trocken	0,0%	nein
"	"	0,0%	"



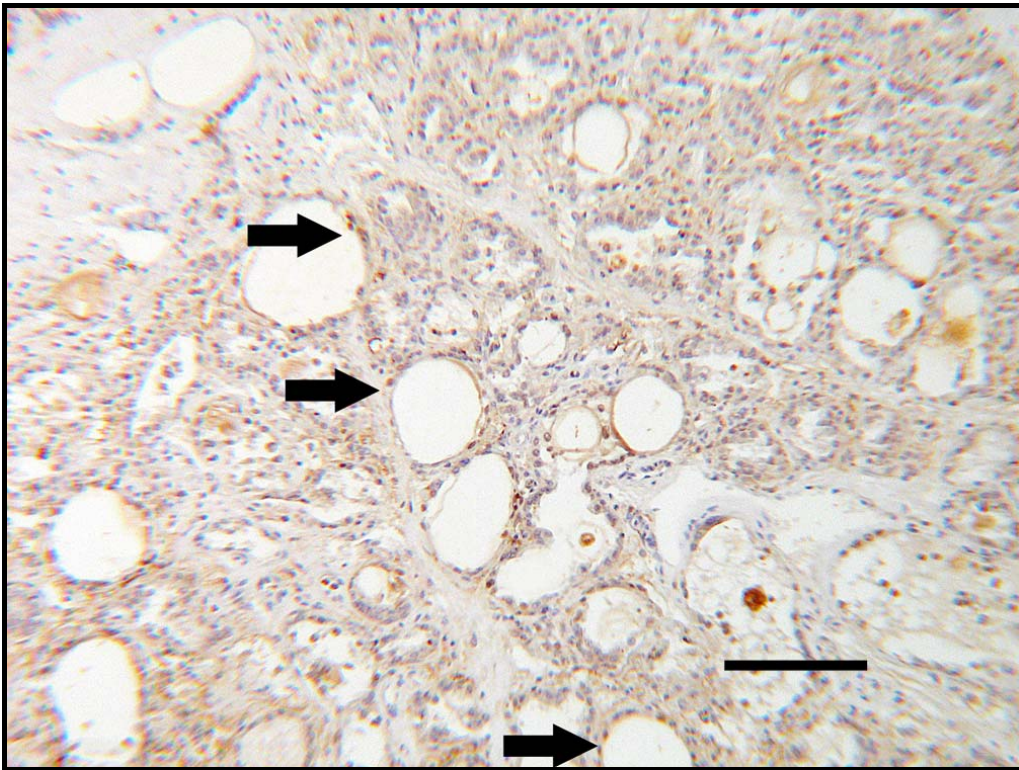


Abb.11: Immunhistochemischer Nachweis von Caspase, Mamma (Rind), 48h trocken, trächtig, SB=100µm  
Pfeile deuten auf positive Epithelzellen in mehreren Alveolen; Im Stroma war dagegen kaum eine positive Reaktion nachweisbar

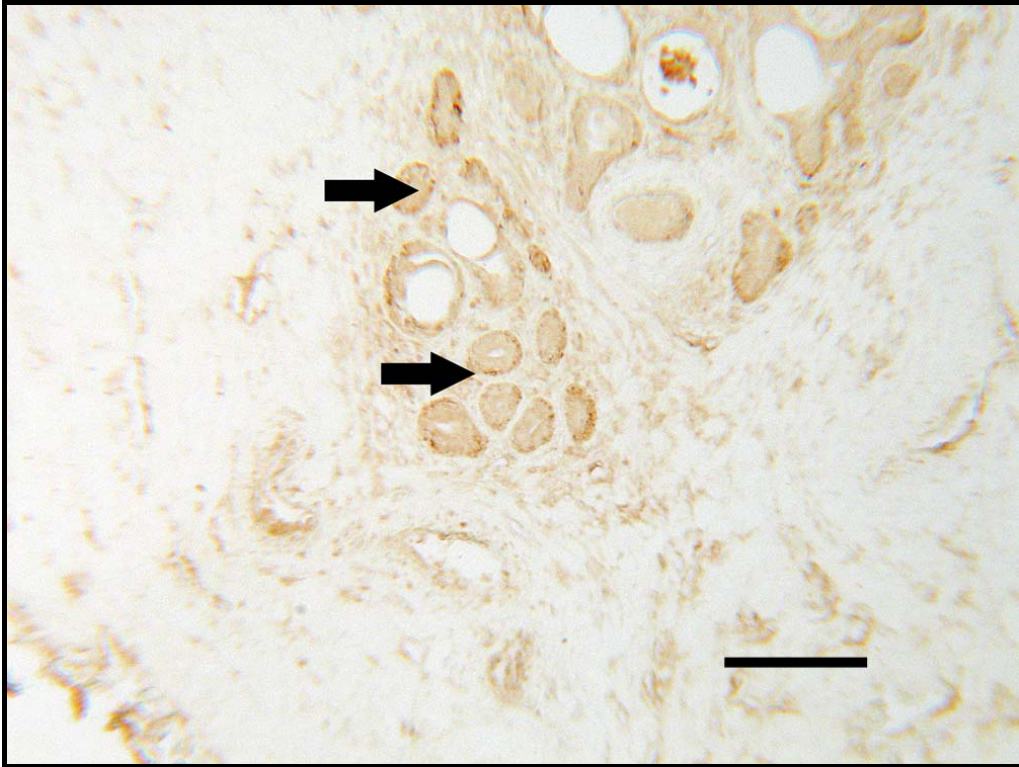


Abb.12: Immunhistochemischer Nachweis von Caspase, Mamma (Rind), 48h trocken, trächtig, SB=100µm  
Pfeile deuten auf positive Epithelzellkerne in verschiedenen Alveolen

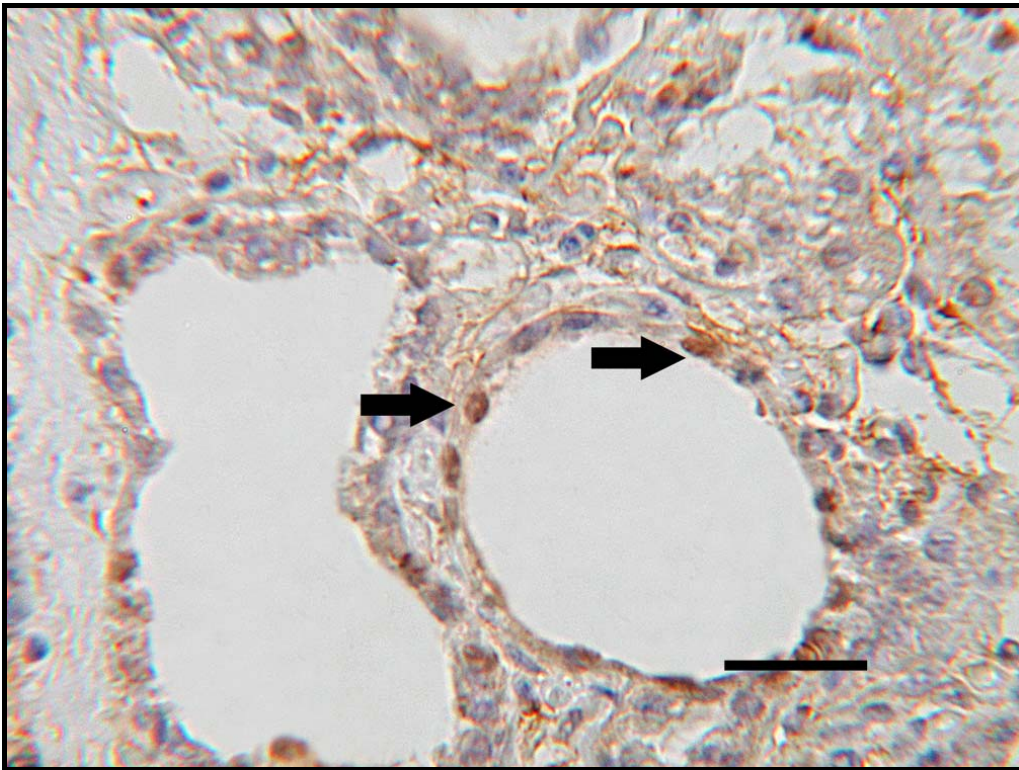


Abb.13: Immunhistochemischer Nachweis von Caspase, Mamma (Rind), 48h trocken, trächtig, SB=25 $\mu$ m  
Pfeile zeigen auf deutlich positive Epithelzellkerne des Milchdrüsenepithels einer Alveole



#### **4.2.5 Immunhistochemischer Nachweis von Ki-67**

Der mitotische Index, d.h. der prozentuale Anteil der positiven Kerne im Verhältnis zur Gesamtzahl der Kerne, wurde im Epithel der Alveolen und Milchgänge der Milchdrüse ermittelt.

14 Tage praepartum beträgt der Mitose-Index 8,8%. Die Teilungsrate sinkt bis zum Tag der Kalbung auf 2%. In der Gruppe der trockengestellten Kühe wird bei der trächtigen Kuh eine deutlich höhere Proliferationstätigkeit als bei den nicht trächtigen Kühen festgestellt. 24h nach dem letzten Melken ist der mitotische Index bei beiden Gruppen etwa gleich. 48h nach dem Trockenstellen sind bei der trächtigen Kuh 17,2% der Epithelzellen Ki-67-positiv. Nach 96h sinkt der Anteil Ki-67-positiver Zellen zwar auf 2,4%, aber 14d nach dem Trockenstellen steigt der mitotische Index wieder auf 11,6% an. Wenn keine Trächtigkeit vorliegt, sinkt der Anteil Ki-67-positiver Zellen kontinuierlich auf 0,2% am 14. Tag nach dem letzten Melken. Die basal gelegenen Zellen, zum grössten Teil Myoepithelzellen, sind in gleichem Maße immunopositiv wie die luminal gelegenen Epithelzellen. Es fällt ebenfalls eine Konzentration der Ki-67 positiven Zellen in bestimmten Gruppierungen benachbarter Alveolen auf.

Im subepithelialen Bindegewebe kann eine schwache Zunahme der mitotischen Aktivität der Fibroblasten ab 48h bis 14 Tage nach dem Trockenstellen bei den nicht trächtigen Kühen festgestellt werden.

**Tabelle 8: Immunhistochemischer Nachweis von Ki-67**

<b>Tiername</b>	<b>Stadium</b>	<b>Mitose-Index</b>	<b>trächtig</b>
<b>Toulouse</b>	24 h trocken	7,6%	ja
"	48 h trocken	17,2%	"
"	96 h trocken	2,4%	"
"	14 d trocken	11,6%	"
<b>Arnika</b>	14 d praepart.	8,8%	ja
"	7 d praepart.	6,8%	"
"	Kalbung	2,0%	"
<b>Ariee</b>	8 h trocken	2,8%	nein
"	24 h trocken	5,2%	"
"	108 h trocken	3,6%	"
<b>Atlantis</b>	24 h trocken	6,0%	nein
"	"	5,6%	"
<b>Salamina</b>	48 h trocken	1,6%	nein
"	"	1,6%	"
<b>Tia</b>	96 h trocken	0,8%	nein
"	"	0,8%	"
<b>Titanic</b>	14 d trocken	0,2%	nein
"	"	0,2%	"

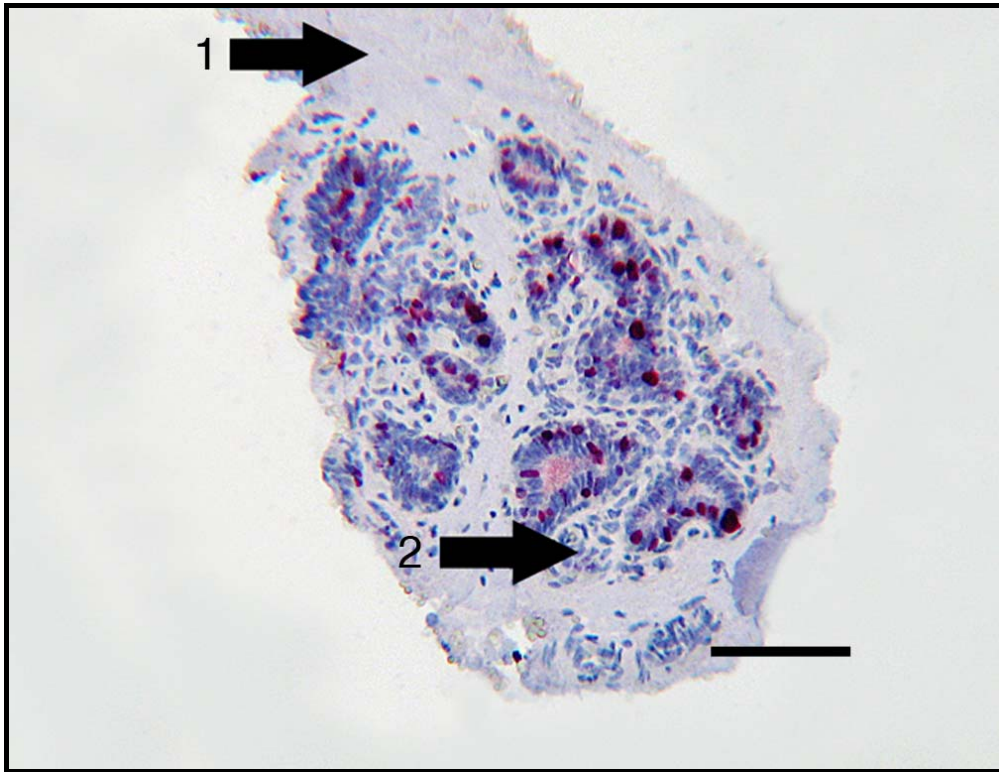


Abb.14: Immunhistochemischer Nachweis von Ki-67, Mamma (Rind), 48h trocken, trächtig, SB=100µm

1 lockeres interlobuläres Bindegewebe

2 dichtes intralobuläres Bindegewebe

Dazwischen befindet sich eine grosse Anzahl Ki-67 positiver Epithelzellkerne in mehreren Alveolen

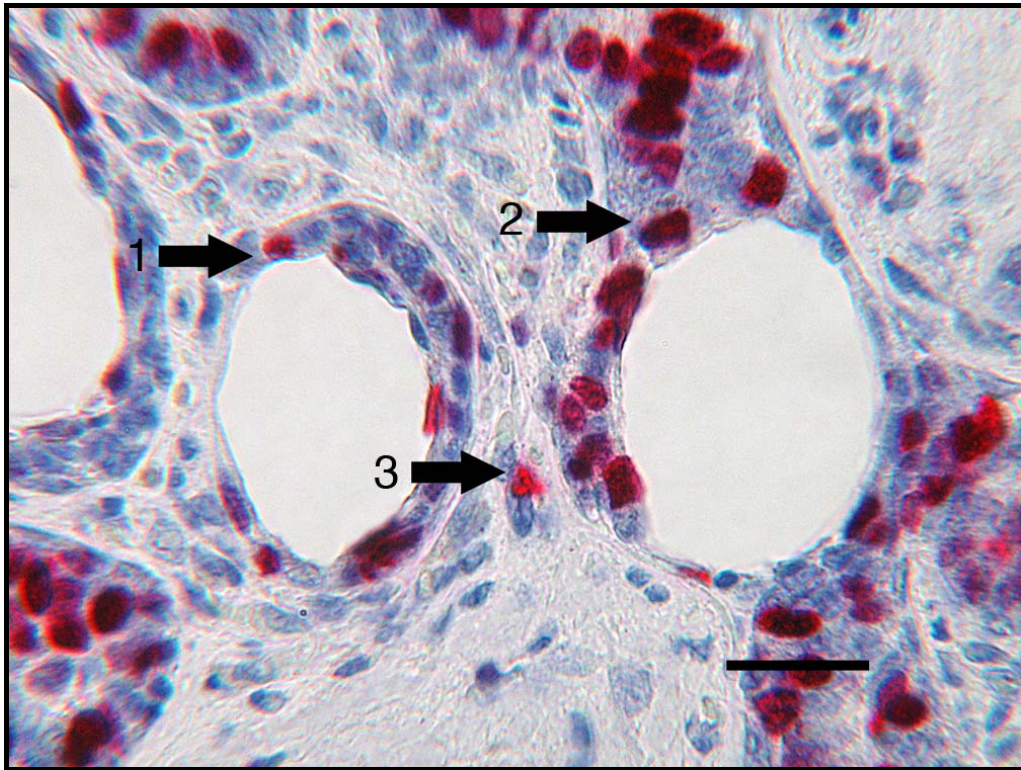


Abb.15: Immunhistochemischer Nachweis von Ki-67, Mamma (Rind), 48h trocken, trächtig, SB=25µm

- 1/2 positive Kerne von Epithelzellen zweier benachbarter Alveolen
- 3 positiver Fibrozyt zentral zwischen den Alveolen im subepithelialen Bindegewebe

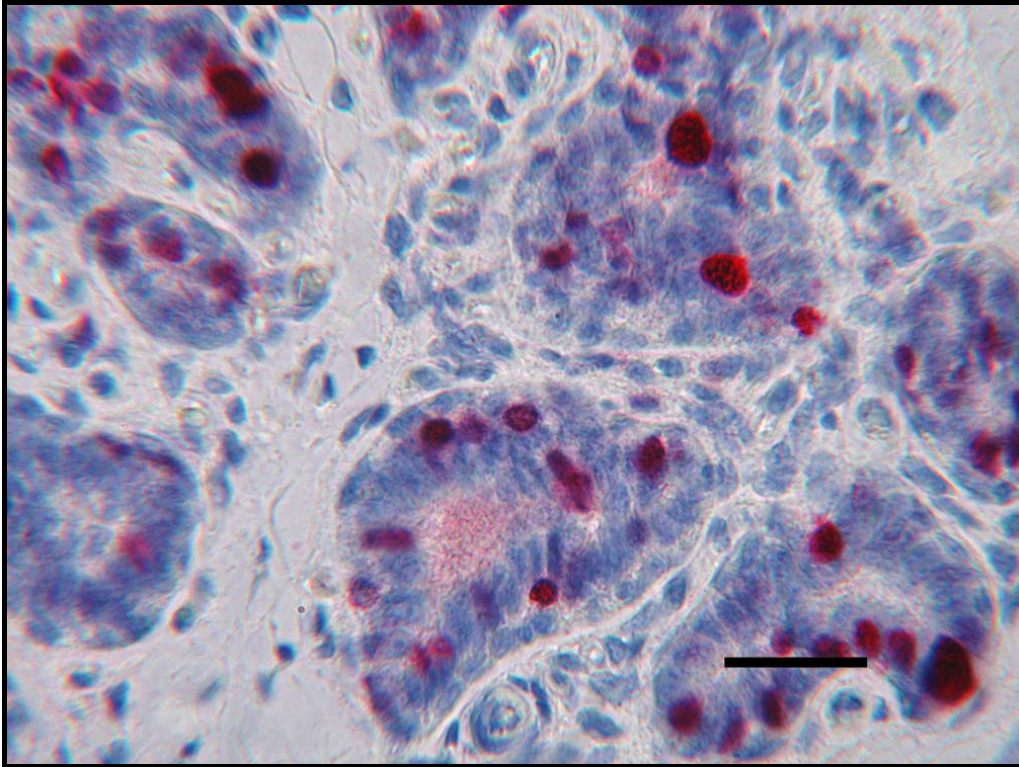


Abb.16: Immunhistochemischer Nachweis von Ki-67, Mamma (Rind), 48h trocken, trächtig, SB=25µm  
Starke Häufung positiver Epithelzellkerne in mehreren Alveolen; Stroma ist negativ

#### 4.2.6 Immunhistochemischer Nachweis von macrophage migration inhibitory factor (MIF)

Beim immunhistochemischen Nachweis von MIF wird 24h nach dem Trockenstellen bei einer von zwei nicht trächtigen Kühen eine starke Anfärbbarkeit von 3,4% der Epithelzellkerne von Alveolen und Milchgängen registriert. Die Färbung bezieht die zirkumnukleäre Region des Zytoplasmas mit ein. Nach weiteren 24h sind lediglich 0,4% der Epithelzellen immunopositiv. In der trächtigen Kuh sind zwei "peaks" vorhanden. 24h nach dem Trockenstellen sind 4,4% und nach 96h sind 5,6% der Epithelzellen der Milchgänge und Alveolen durch den Antikörper markiert. In dem Zeitraum vor der Kalbung konnte MIF nicht nachgewiesen werden.

Die Gefäßintima der Blut- und Lymphgefäße sowie alle freien Zellen sind alle negativ für MIF. Das Stroma ist ebenfalls immunonegativ.

**Tabelle 9: Immunhistochemischer Nachweis von „macrophage migration Inhibitory factor (MIF)“**

Tiername	Stadium	pos. Epithelzellen	trächtig
<b>Toulouse</b>	24 h trocken	4,4%	ja
"	48 h trocken	0,0%	"
"	96 h trocken	5,6%	"
"	14 d trocken	0,0%	"
<b>Arnika</b>	14 d praepart.	0,0%	ja
"	7 d praepart.	0,0%	"
"	Kalbung	0,0%	"
<b>Ariee</b>	8 h trocken	0,0%	nein
"	24 h trocken	0,0%	"
"	108 h trocken	0,0%	"
<b>Atlantis</b>	24 h trocken	3,6%	nein
"	"	3,2%	"
<b>Salamina</b>	48 h trocken	0,4%	nein
"	"	0,0%	"
<b>Tia</b>	96 h trocken	0,0%	nein
"	"	0,0%	"
<b>Titanic</b>	14 d trocken	0,0%	nein
"	"	0,0%	"



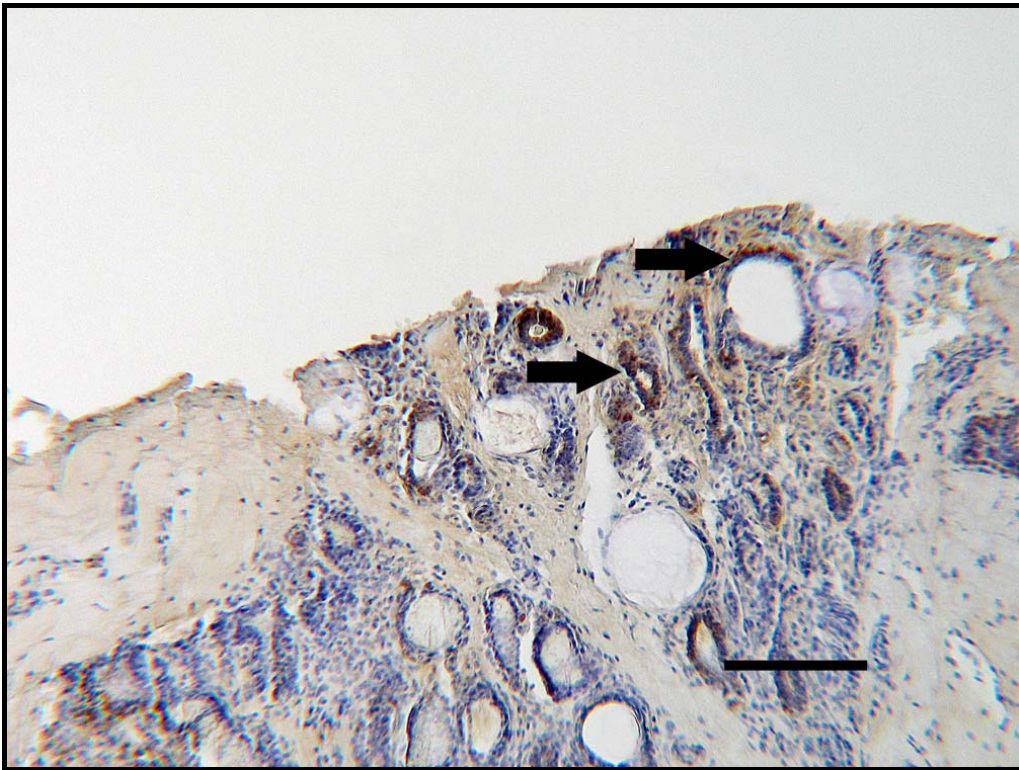


Abb.17: Immunhistochemischer Nachweis von MIF, Mamma (Rind), 96h trocken, trächtig, SB=100µm  
Pfeile deuten auf Alveolen mit deutlich positiven Reaktionen

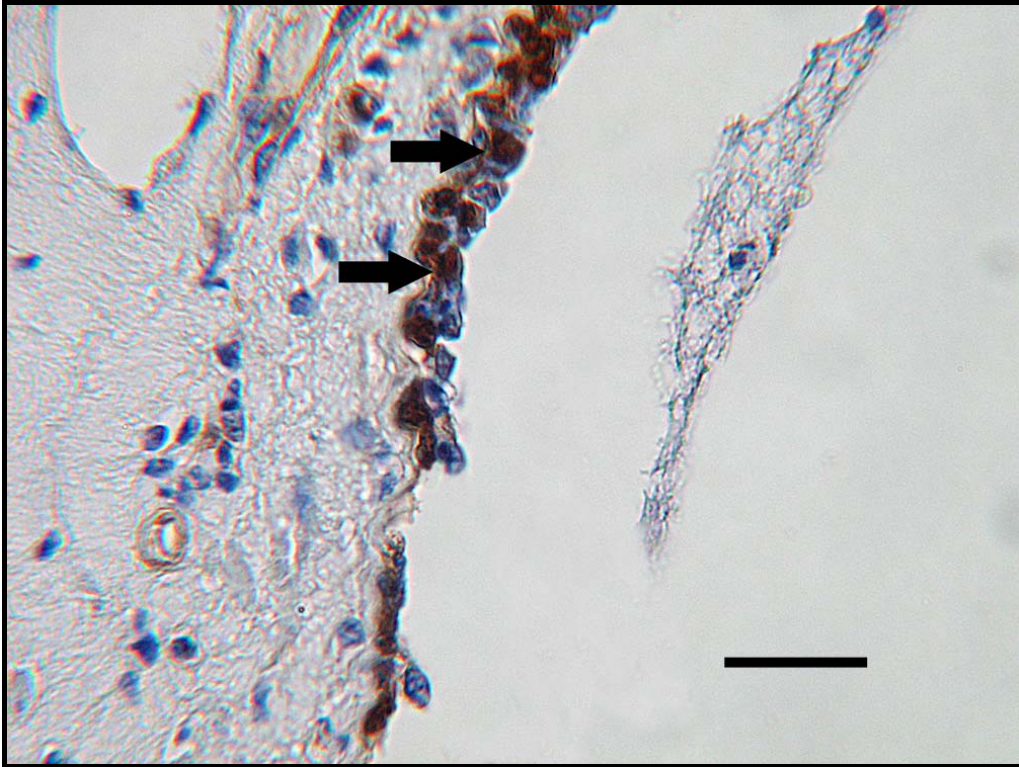


Abb.18: Immunhistochemischer Nachweis von MIF, Mamma (Rind), 24h trocken, nicht trächtig, SB=25 $\mu$ m  
Pfeile deuten auf Epithelzellen eines Milchgangs mit positiver nukleärer und infranukleärer Reaktion



#### 4.2.7 Immunhistochemischer Nachweis von Gal-3

Immunpositive Epithelzellen der Alveolen und Milchgänge sind durch eine infranukleäre Anfärbung gekennzeichnet. Im Epithel der trächtigen Kuh sind 24h nach dem Trockenstellen 3,2% der Epithelzellen positiv. Nach 48h nimmt die Anzahl immunreaktiver Zellen geringfügig ab. Nach 96h sind keine Epithelzellen durch den Antikörper markiert. 14 Tage nach dem Trockenstellen sind sowohl bei der trächtigen, als auch bei nicht trächtigen Rindern die Epithelzellen positiv für Gal-3, wobei während der Trächtigkeit die Anzahl der positiven Zellen 3,5 fach höher ist als bei nicht trächtigen Tieren.

In allen Stadien sind deutlich positive freie Zellen zu beobachten. Bei diesen Zellen handelt es sich um Makrophagen und Lymphozyten, die sich im subepithelialen Bindegewebe und zwischen den Epithelzellen der Alveolen befinden.

14 Tage nach dem Trockenstellen ist bei trächtigen Rindern eine stark positive Reaktion des intralobulären Interstitiums beobachten. Zu diesem Zeitpunkt hat auch die Expressionsrate in den Epithelzellen ihren Höhepunkt.

Die vaskulären Endothelzellen der Lymph- und Blutgefäße zeigen keine positive Immunreaktion.

Ab dem Zeitpunkt 24h bis 14 Tage nach dem Trockenstellen gab es bei den nicht tragenden Kühen vereinzelt Fibrozyten der Mamma eine positive Reaktion.

**Tabelle 10: Immunhistochemischer Nachweis von Gal-3**

Tiername	Stadium	pos. Epithelzellen	trächtig
<b>Toulouse</b>	24 h trocken	3,2%	ja
"	48 h trocken	2,4%	"
"	96 h trocken	0,0%	"
"	14 d trocken	4,0%	"
<b>Arnika</b>	14 d praepart.	0,0%	ja
"	7 d praepart.	0,0%	"
"	Kalbung	0,0%	"
<b>Ariee</b>	8 h trocken	0,0%	nein
"	24 h trocken	0,0%	"
"	108 h trocken	0,0%	"
<b>Atlantis</b>	24 h trocken	0,0%	nein
"	"	0,0%	"
<b>Salamina</b>	48 h trocken	0,0%	nein
"	"	0,0%	"
<b>Tia</b>	96 h trocken	0,0%	nein
"	"	0,0%	"
<b>Titanic</b>	14 d trocken	1,2%	nein
"	"	1,2%	"

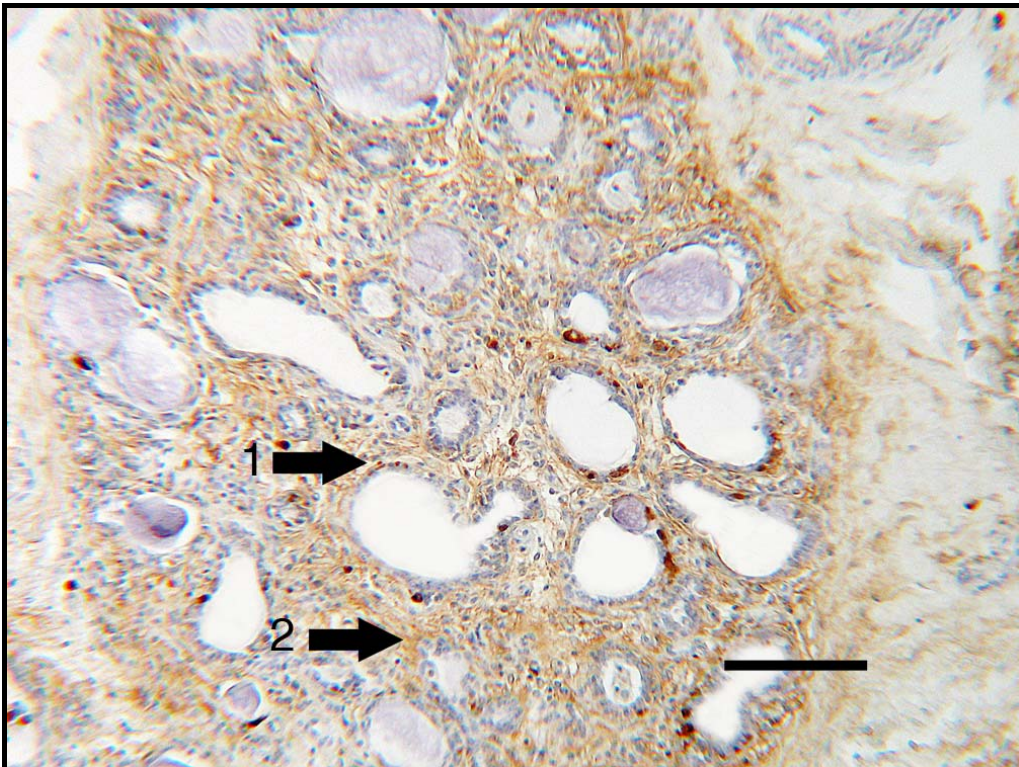


Abb.19: Immunhistochemischer Nachweis von Gal-3, Mamma (Rind), 14d trocken, trächtig, SB=100µm

- 1 positive Reaktionen im Epithel einer Alveole
- 2 deutlich positive Reaktion des Interstitiums

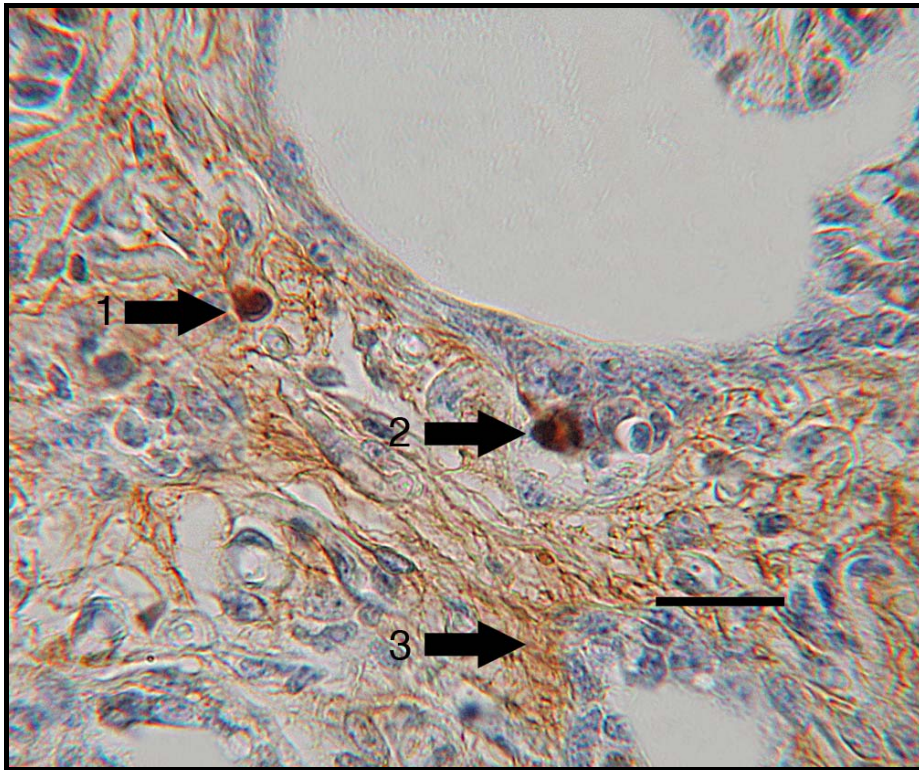


Abb.20: Immunhistochemischer Nachweis von Gal-3, Mamma (Rind), 14d trocken, trächtig, SB=25µm

1/2 deutlich positive mobile freie Zellen (Lymphozyten/  
Makrophagen) im Interstitium

3 stark positive Reaktion des Interstitiums



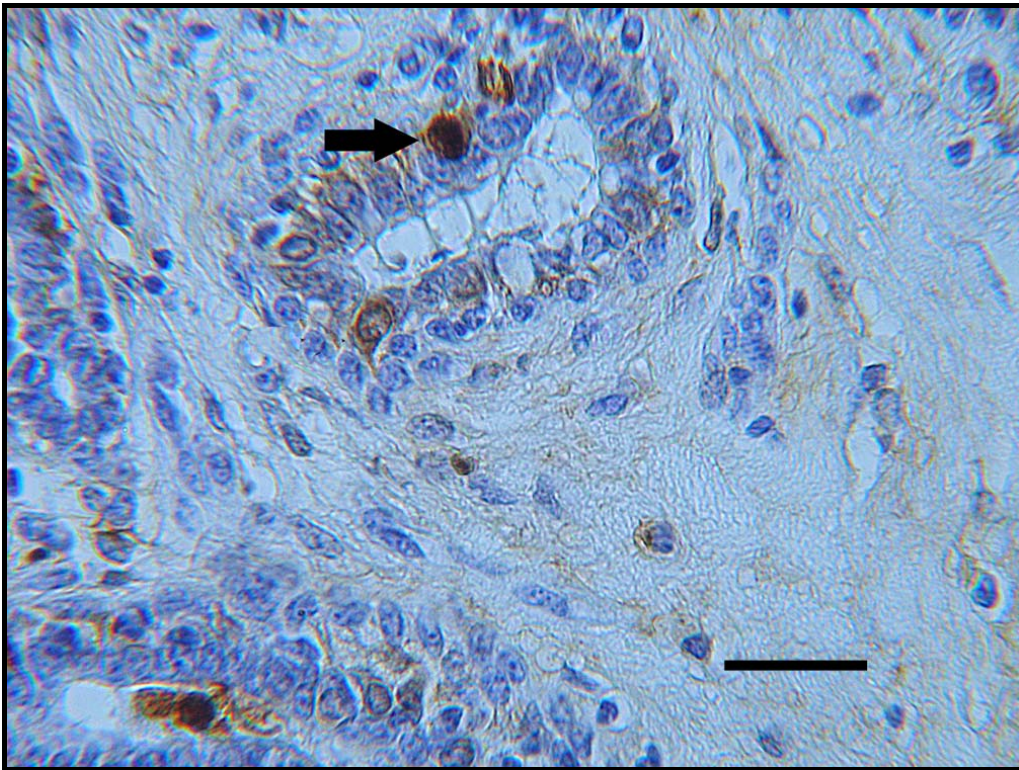


Abb.21: Immunhistochemischer Nachweis von Gal-3, Mamma (Rind), 24h trocken, trächtig, SB=25 $\mu$ m  
Pfeil deutet auf eingewanderten, deutlich positiven Makrophagen zwischen den Epithelzellen einer Alveole

#### 4.2.8 Immunhistochemischer Nachweis von Bax

Bei den trächtigen Kühen kann Bax in den Epithelzellen der Alveolen und Milchgängen zu keinem Zeitpunkt nachgewiesen werden.

Während der Involution gelingt der Nachweis in den Epithelzellkernen bei nicht graviden Kühen nach 24h und 48h. Später in der Involution ist Bax nicht mehr nachweisbar.

Nach 24h und 48h der Involution sind häufig stark positive freie Zellen nachweisbar. Überwiegend handelt es sich hierbei um Lymphozyten, die sich im subepithelialen Bindegewebe befinden. In kleinerer Zahl lassen sich eingewanderte Makrophagen darstellen.

Die Gefässendothelzellen der Blut- und Lymphgefäße sind beim immunzytochemischen Nachweis von Bax negativ.

**Tabelle 11: Immunhistochemischer Nachweis von Bax**

Tiername	Stadium	pos. Epithel	trächtig
<b>Toulouse</b>	24 h trocken	0,0%	ja
"	48 h trocken	0,0%	"
"	96 h trocken	0,0%	"
"	14 d trocken	0,0%	"
<b>Arnika</b>	14 d praepart.	0,0%	ja
"	7 d praepart.	0,0%	"
"	Kalbung	0,0%	"
<b>Ariee</b>	8 h trocken	0,0%	nein
"	24 h trocken	0,0%	"
"	108 h trocken	0,0%	"
<b>Atlantis</b>	24 h trocken	2,8%	nein
"	"	2,4%	"
<b>Salamina</b>	48 h trocken	2,8%	nein
"	"	2,0%	"
<b>Tia</b>	96 h trocken	0,0%	nein
"	"	0,0%	"
<b>Titanic</b>	14 d trocken	0,0%	nein
"	"	0,0%	"

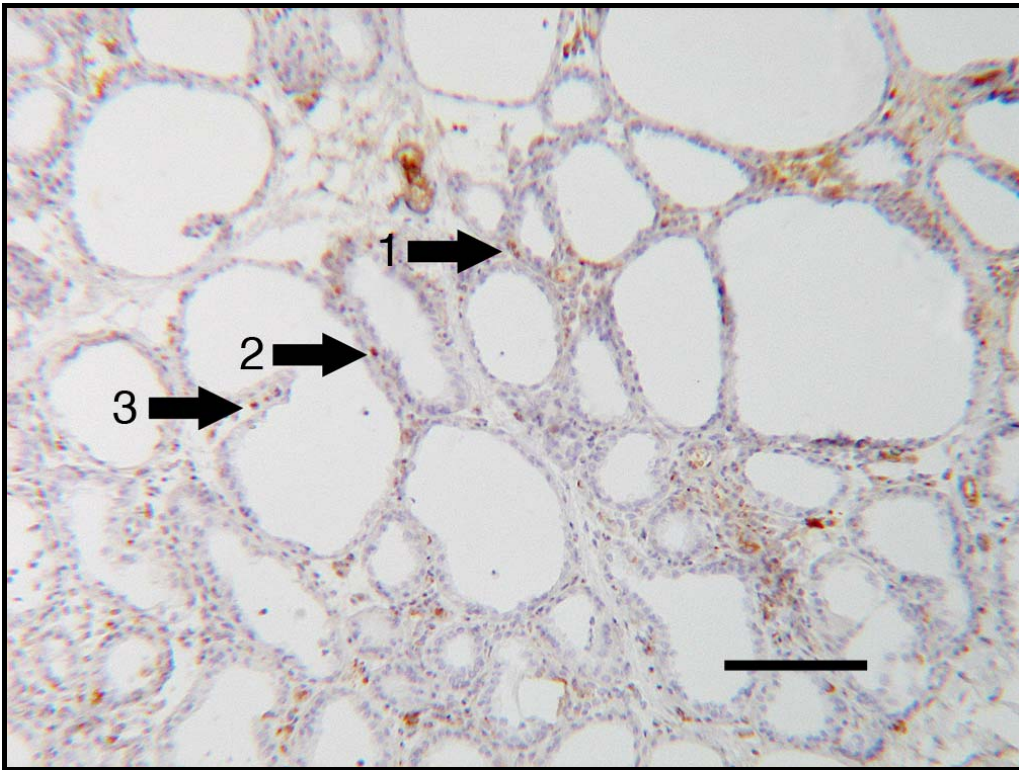


Abb.22: Immunhistochemischer Nachweis von Bax, Mamma (Rind), 24h trocken, nicht trächtig, SB=100µm

- 1 positive Epithelzellen einer Alveole
- 2/3 im subepithelialen Bindegewebe befindliche freie Zellen (Lymphozyten/Makrophagen) mit stark positiver Reaktion

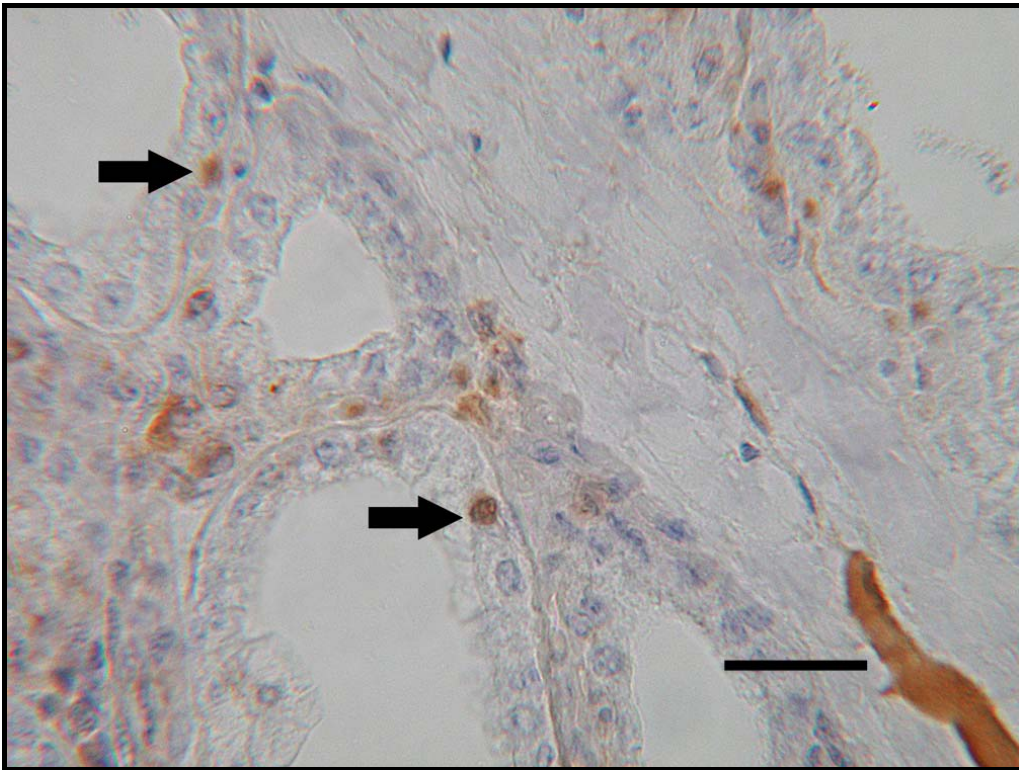


Abb.23: Immunhistochemischer Nachweis von Bax, Mamma (Rind), 14d trocken, nicht trächtig, SB=25µm  
Pfeile deuten auf positive Epithelzellen in verschiedenen Alveolen; Im Interstitium dazwischen liegen positive Lymphozyten



#### 4.2.9 Immunhistochemischer Nachweis von Bcl-2

Bcl-2 ist in den Epithelzellen der Milchgänge und Alveolen nicht nachweisbar.

Vereinzelt treten in allen Stadien freie Zellen im subepithelialen Bindegewebe mit deutlich positiver Färbung auf.

**Tabelle 12: Immunhistochemischer Nachweis von Bcl-2**

Tiername	Stadium	pos. Lymphozyten/Makrophagen	trächtig
<b>Toulouse</b>	24 h trocken	1,4%	ja
"	48 h trocken	1,2%	"
"	96 h trocken	1,7%	"
"	14 d trocken	1,4%	"
<b>Arnika</b>	14 d praepart.	1,8%	ja
"	7 d praepart.	1,4%	"
"	Kalbung	2,0%	"
<b>Ariea</b>	8 h trocken	1,5%	nein
"	24 h trocken	1,8%	"
"	108 h trocken	1,4%	"
<b>Atlantis</b>	24 h trocken	0,8%	nein
"	"	1,3%	"
<b>Salamina</b>	48 h trocken	1,7%	nein
"	"	1,4%	"
<b>Tia</b>	96 h trocken	1,5%	nein
"	"	1,4%	"
<b>Titanic</b>	14 d trocken	1,5%	nein
"	"	1,6%	"

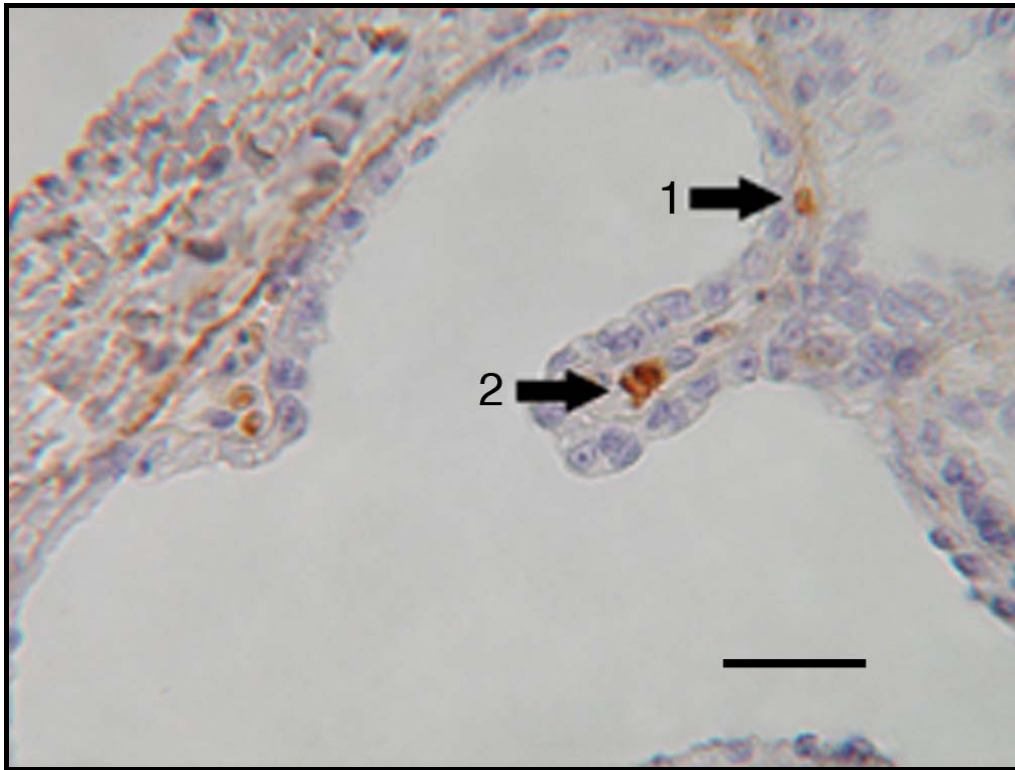


Abb.24: Immunhistochemischer Nachweis von Bcl2, Mamma (Rind), 14d trocken, nicht trächtig, SB=25µm

- 1 subepithelial gelegener Lymphozyt
- 2 subepithelial gelegener Makrophage

#### 4.2.10 Immunhistochemischer Nachweis von CD4 / CD8

Der Anteil der positiven Zellen wird im Verhältnis zu 100 Epithelzellen gesetzt. Die Zellen befinden sich überwiegend im intralobulären Bindegewebe. Im lockeren, interlobulären Bindegewebe sind weniger T-Zellen vorhanden. Vereinzelt werden T-Zellen im Alveolarlumen beobachtet.

**Tabelle 13: Immunhistochemischer Nachweis von CD4**

Tiername	Stadium	pos. Zellen	trächtig
<b>Toulouse</b>	24 h trocken	2,8%	ja
"	48 h trocken	3,6%	"
"	96 h trocken	2,4%	"
"	14 d trocken	4,8%	"
<b>Arnika</b>	14 d praepart.	2,0%	ja
"	7 d praepart.	1,6%	"
"	Kalbung	1,2%	"
<b>Ariee</b>	8 h trocken	1,2%	nein
"	24 h trocken	1,4%	"
"	108 h trocken	5,2%	"
<b>Atlantis</b>	24 h trocken	1,6%	nein
"	"	1,6%	"
<b>Salamina</b>	48 h trocken	6,0%	nein
"	"	5,6%	"
<b>Tia</b>	96 h trocken	6,4%	nein
"	"	6,6%	"
<b>Titanic</b>	14 d trocken	6,6%	nein
"	"	6,8%	"

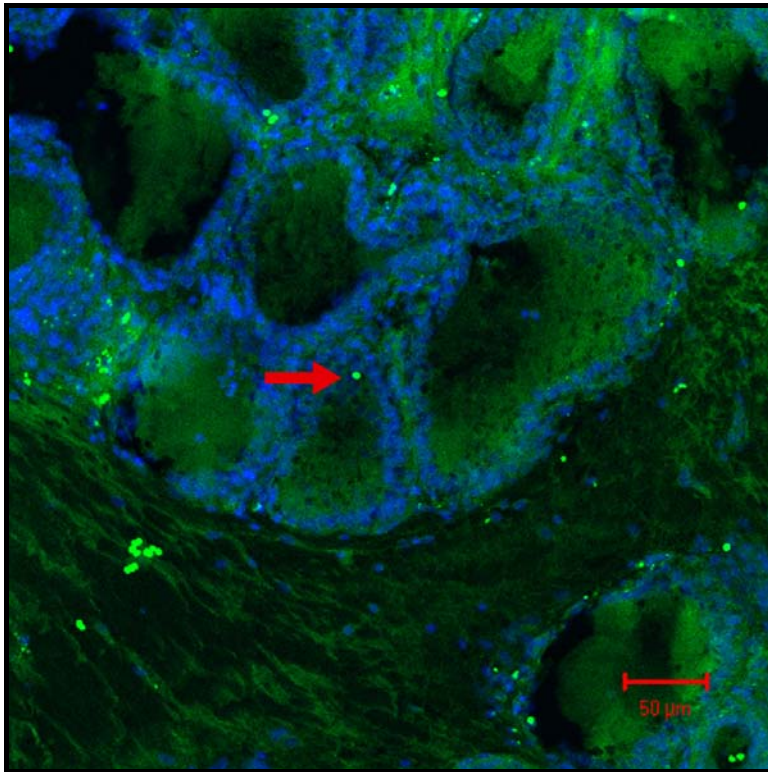


Abb.25: Immunhistochemischer Nachweis von CD4, Gegenfärbung mit DAPI, Mamma (Rind), 7d praepartum, SB=50μm  
Die Epithelzellkerne sind blau gefärbt; im inter- und intralobulären Bindegewebe liegen positive T-Lymphozyten (hellgrün)  
Pfeil deutet auf einen in die Alveole eingewanderten Lymphozyten

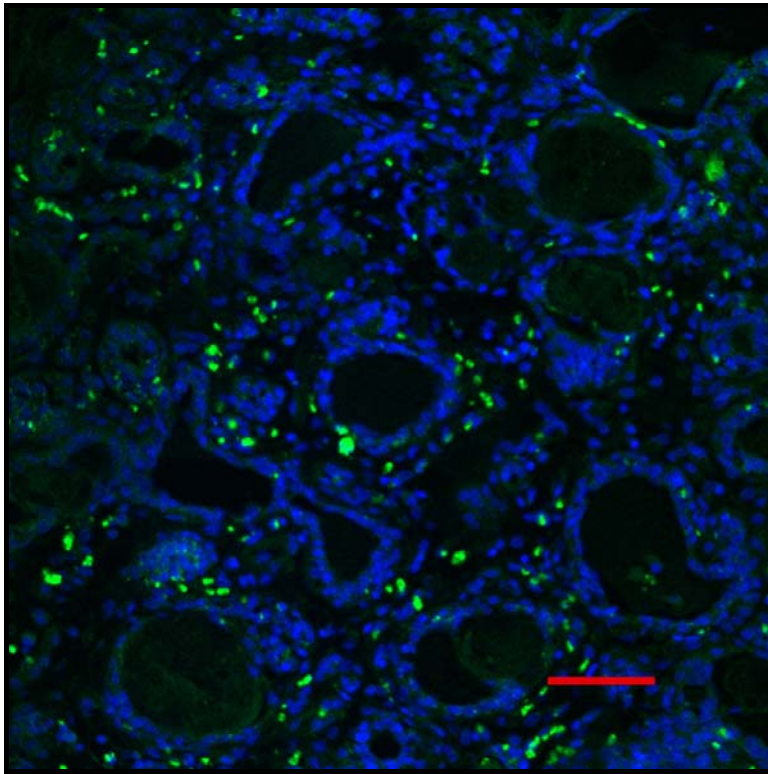


Abb.26: Immunhistochemischer Nachweis von CD4, Gegenfärbung mit DAPI, Mamma (Rind), 48h trocken, nicht trächtig, SB=50µm  
Häufung der immunopositiven T-Zellen im intralobulären Bindegewebe (hellgrün); Epithelzellkerne blau gefärbt

Beim immunhistochemischen Nachweis von CD8 wird der Anteil an positiven Zellen ebenfalls ins Verhältnis zu 100 Epithelzellen gesetzt. Die Zellen befinden sich überwiegend im intralobulären Bindegewebe. Im lockeren, interlobulären Bindegewebe sind wenige T-Zellen vorhanden. Vereinzelt werden T-Zellen im Alveolarlumen beobachtet.

**Tabelle 14: Immunhistochemischer Nachweis von CD8**

Tiername	Stadium	pos. Zellen	trächtig
<b>Toulouse</b>	24 h trocken	2,2%	ja
"	48 h trocken	4,2%	"
"	96 h trocken	6,0%	"
"	14 d trocken	10,4%	"
<b>Arnika</b>	14 d praepart.	2,0%	ja
"	7 d praepart.	2,0%	"
"	Kalbung	1,2%	"
<b>Arie</b>	8 h trocken	2,8%	nein
"	24 h trocken	2,0%	"
"	108 h trocken	2,0%	"
<b>Atlantis</b>	24 h trocken	1,8%	nein
"	"	2,0%	"
<b>Salamina</b>	48 h trocken	8,0%	nein
"	"	7,8%	"
<b>Tia</b>	96 h trocken	1,6%	nein
"	"	2,0%	"
<b>Titanic</b>	14 d trocken	1,2%	nein
"	"	1,2%	"

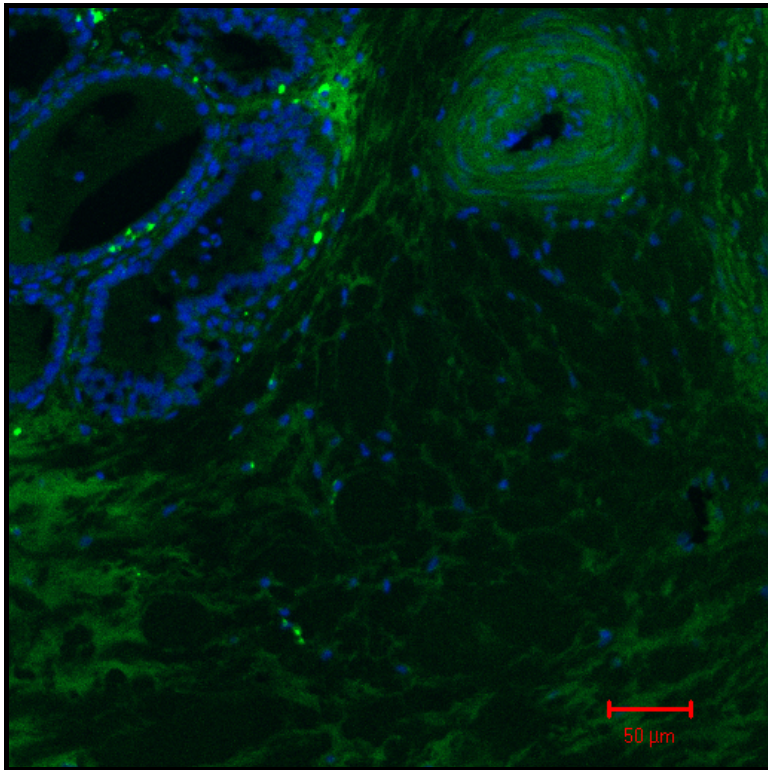


Abb.27: Immunhistochemischer Nachweis von CD8, Gegenfärbung mit DAPI, Mamma (Rind), 7d praepartum, SB=50μm  
Epithelzellkerne blau gefärbt; Häufung der CD8 positiven T-Zellen (hellgrün) im intralobulären Bindegewebe

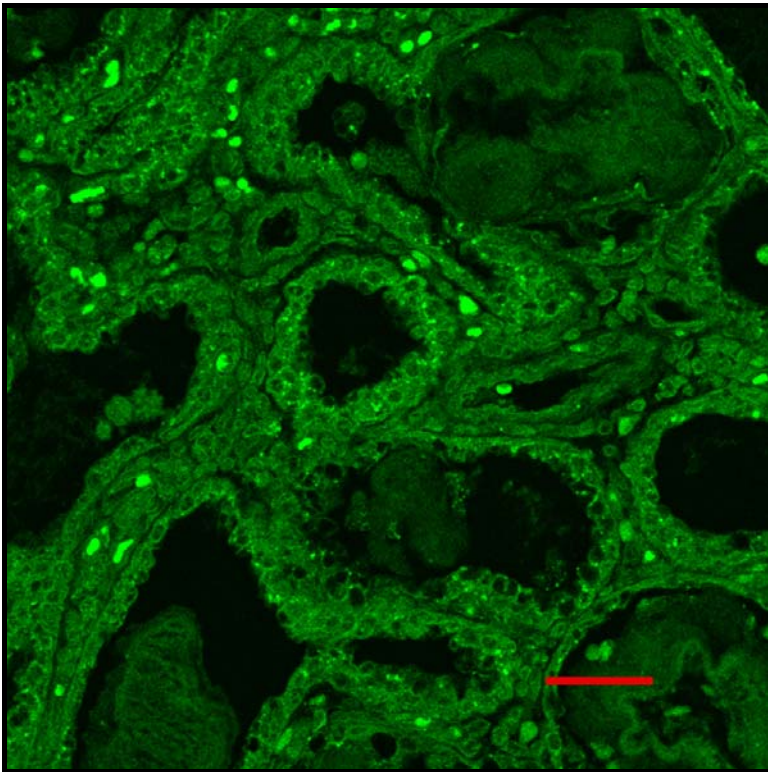


Abb.28: Immunhistochemischer Nachweis von CD8, FITC, Mamma (Rind), 24h trocken, nicht trächtig, SB=50µm  
Häufung CD8 positiver T-Zellen im intralobulären Bindegewebe (hellgrün)



#### 4.2.11 Terminal deoxynucleotide transferase-mediated deoxyuridine nick end labelling (TUNEL)

Die TUNEL-positiven Epithelzellen sind in der Milchdrüse der trächtigen Kuh 48h und 14 Tage nach dem Trockenstellen sehr zahlreich. Im Milchdrüsenepithel der nicht graviden Kühe nimmt die Zahl der TUNEL-positiven Zellen ab 24h nach Beginn der Trockenstehzeit mit zunehmender Dauer der Trockenstehperiode ab. Zu dem sehr frühen Zeitpunkt nach 8h der Involution lassen sich keine apoptotischen Zellen nachweisen. Am Tag der Kalbung lassen sich ebenfalls keine TUNEL-positiven Zellen darstellen. Die positiven Epithelzellen sind gleichmässig auf die Milchgänge und Alveolen verteilt. In den Drüsenläppchen mit einer Häufung TUNEL-positiver Zellen lassen sich gelegentlich im Alveolarlumen positive Zellen darstellen. Am häufigsten kommen TUNEL-positive Zellen im Alveolarlumen 48h und 14d nach Beginn der Involution in der Milchdrüse der trächtigen Kuh vor.

Die Zellen in den Randbereichen der Präparate, die aufgrund mechanischer Belastung TUNEL-positiv erscheinen, werden in der Auswertung nicht berücksichtigt.

**Tabelle 15: TUNEL**

Tiername	Stadium	Apoptoserate	trächtig
<b>Toulouse</b>	24 h trocken	1,4%	ja
"	48 h trocken	5,2%	"
"	96 h trocken	1,7%	"
"	14 d trocken	3,6%	"
<b>Arnika</b>	14 d praepart.	1,2%	ja
"	7 d praepart.	2,4%	"
"	Kalbung	0,0%	"
<b>Ariee</b>	8 h trocken	0,0%	nein
"	24 h trocken	0,8%	"
"	108 h trocken	0,4%	"
<b>Atlantis</b>	24 h trocken	1,2%	nein
"	"	0,8%	"
<b>Salamina</b>	48 h trocken	0,4%	nein
"	"	0,5%	"
<b>Tia</b>	96 h trocken	0,4%	nein
"	"	0,5%	"
<b>Titanic</b>	14 d trocken	0,4%	nein
"	"	0,4%	"

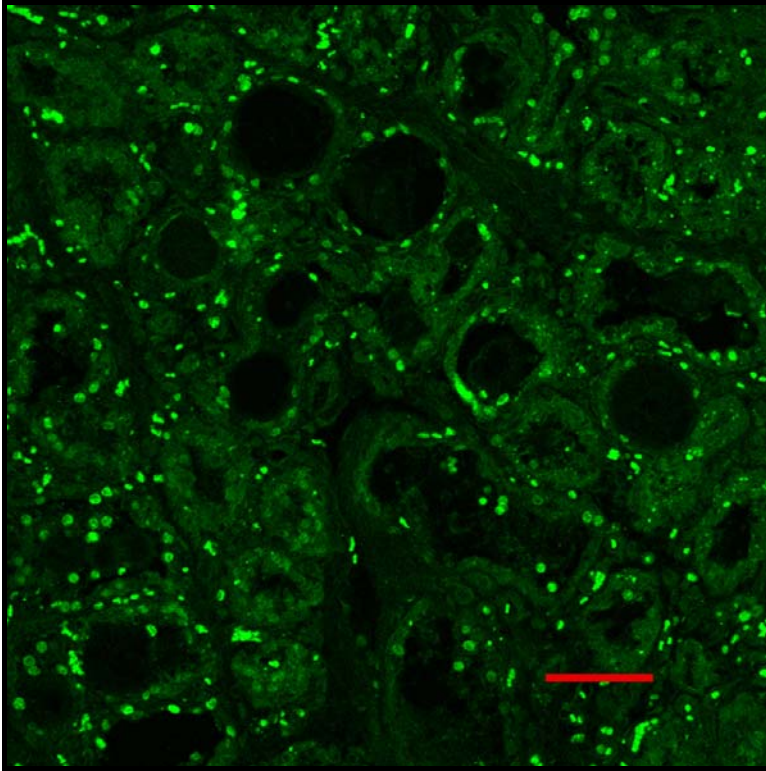


Abb.29: TUNEL, FITC, Mamma (Rind), 48h trocken, trächtig, SB=50 $\mu$ m  
Häufung TUNEL-positiver Epithelzellen in den Alveolen, Ductuli und im  
intralobulären Bindegewebe (hellgrün)

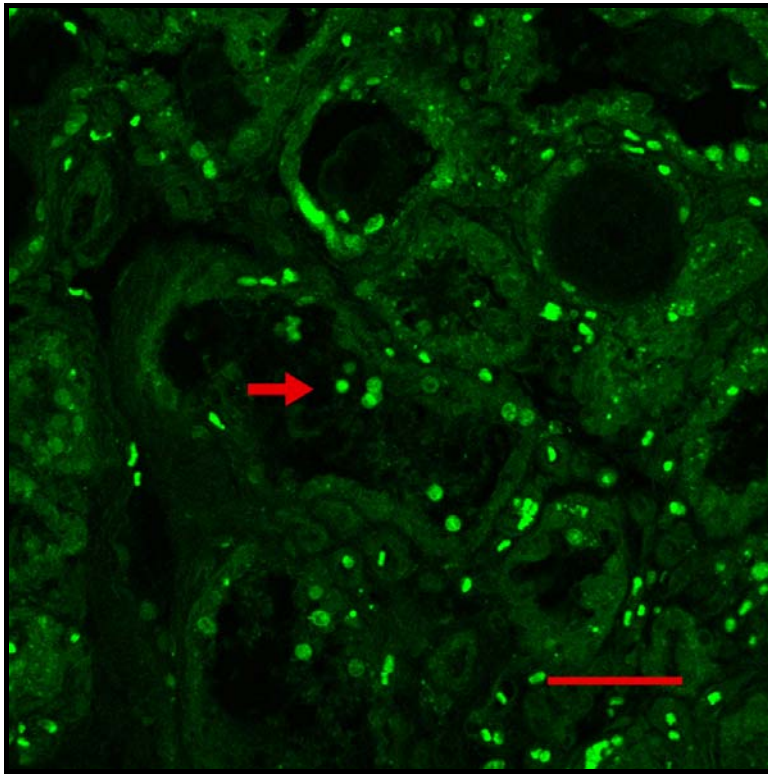


Abb.30: TUNEL, FITC, Mamma (Rind), 48h trocken, trächtig, SB=35 $\mu$ m  
Pfeil deutet auf ins Alveolarlumen abgeschobene TUNEL-positive Epithelzellen

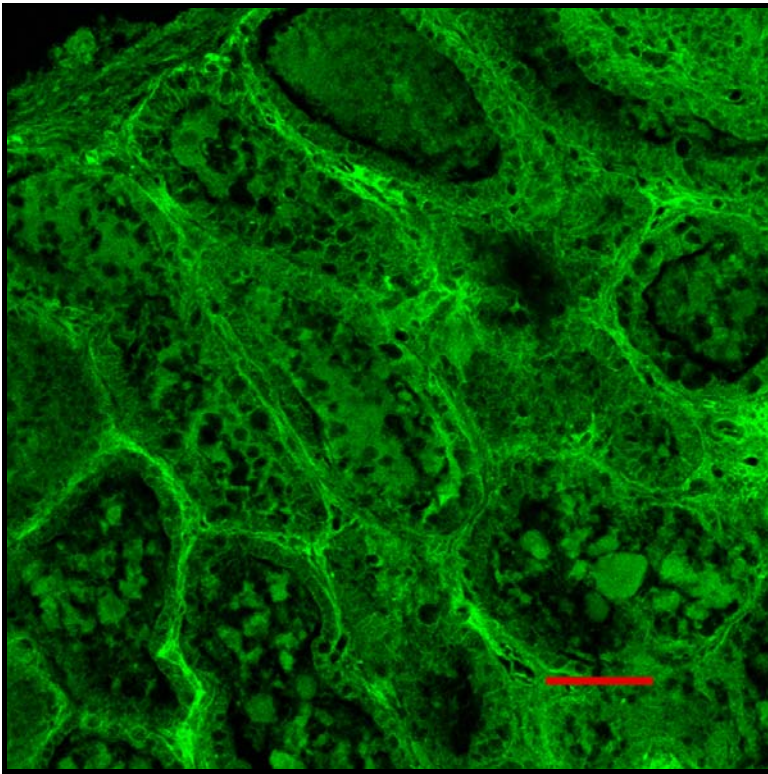


Abb.31: TUNEL, FITC, Mamma (Rind), Tag der Kalbung, SB=50µm  
Milchdrüsengewebe ohne TUNEL-positive Zellen

## 5. Diskussion

Das Milchdrüsengewebe des Rindes behält, im Gegensatz zur Milchdrüse von Versuchstieren, wie Mäusen und Ratten, während der Involution seine alveoläre Struktur weitgehend bei (Capuco und Akers, 1999). Die Epithelzellpopulation wird ohne wesentliche Abstoßung ins Alveolarlumen erneuert und auf die folgende Laktation vorbereitet. Das Milchdrüsengewebe des Rindes ist in der Lage nach 12 Tagen des Trockenstellens bei Wiederaufnahme der Laktation die Ausgangsmenge zu produzieren (Hamann und Reichmuth, 1990). Im Vergleich dazu erholt sich die Milchsyntheseleistung der Maus bereits 72 Stunden nach dem Abstillen nicht mehr (Sorensen und Knight, 1997). Die Involution der Rindermilchdrüse nimmt also einen deutlich anderen Verlauf als bei Maus und Ratte. Sie weist eine erhöhte Toleranz gegenüber Milchstau auf. Mäuse oder andere Wiederkäuer, wie z.B. Ziegen, benötigen kein Trockenstehintervall zwischen den Laktationsperioden, um die in der ersten Laktation produzierte Milchmenge auch in der folgenden Laktation zu liefern (Knight und Wilde, 1988). Eine Trockenstehperiode von sechs bis acht Wochen vor dem errechneten Kalbetermin gilt für Milchkühe als obligatorisch, um die Laktationsleistung der vorhergehenden Laktationsperiode zu erreichen. Ein kürzeres Intervall wirkt sich negativ auf die Milchproduktion in der anschliessenden Laktation aus (Coppock et al., 1976; Dias und Allaire, 1982).

Während Involution und Laktation kommt es zu Veränderungen in der Zusammensetzung der T-Lymphozyten Populationen im Eutersekret. Im Verlauf einer Laktationsperiode verändert sich das Verhältnis von CD4<sup>+</sup> (Helferzellen) zu CD8<sup>+</sup> (Suppressorzellen) Zellen. Während der Laktationsperiode ist der Anteil der CD8<sup>+</sup> Zellen im Eutersekret viel grösser als der der CD4<sup>+</sup> Zellen (Park et al., 1992). In der frühen Laktation finden sich doppelt so viele CD8<sup>+</sup> Zellen im Eutersekret wie CD4<sup>+</sup> Zellen. Im Verlauf der Laktation nimmt die Fraktion der CD4<sup>+</sup> Zellen zu und am Ende der Laktation beträgt der Wert des CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> Verhältnisses nur noch 0,8 (Asai et al., 1998). Taylor et al. (1994) vermuten, dass die Akkumulation der CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der unmittelbaren Umgebung des Epithels zur Erhaltung der Struktur der Milchdrüse durch die Beseitigung beschädigter oder infizierter Zellen beiträgt. Mit Beginn der Involutionsphase steigt das Verhältnis CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> sprunghaft an. Am Anfang der Trockenstehperiode beträgt der Wert 1.2. Am Ende der Trockenstehperiode liegt das Verhältnis CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> bei 3.7 (Asai et al., 1998). Die

Mechanismen, welche die selektive Zunahme der CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der Trockenstehperiode, sowie die Zunahme der CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Laktationsperiode bewirken, sind unbekannt. Während der Hochträchtigkeit waren in den von uns untersuchten Geweben nur vereinzelt T-Lymphozyten im Milchdrüsengewebe präsent. In den ersten zwei Wochen der Involution stieg die Anzahl der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> positiven Zellen im Vergleich zum praepartalen Zeitraum in sehr hohem Maße. Die CD8<sup>+</sup> Zellen waren in der Mehrzahl aller untersuchten Stadien der Trockenstehperiode zahlreicher vorhanden als die CD4<sup>+</sup> Zellen und kamen im Euter der trächtigen Kuh bei gleichem Verhältnis zueinander in grösster Anzahl vor. Diese Beobachtung lässt sich möglicherweise mit dem höheren Zellumsatz in der Milchdrüse der trächtigen Kuh, in der eine grössere Menge apoptotischer Zellen anfällt, die nicht ins Lumen abgeschoben werden, erklären. Denkbar ist ausserdem, dass die CD4<sup>+</sup> Zellen selektiv in grösserer Anzahl als die CD8<sup>+</sup> Zellen in die Alveolarlumina einwandern und deswegen im Eutersekret die dominierende T-Lymphozyten Population darstellen, obwohl im Eutergewebe andere Verhältnisse vorliegen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen zudem eine rasche Reaktion der Epithelzellen der Alveolen auf das Trockenstellen. Bei Tieren, die zum Zeitpunkt des Trockenstellens trächtig sind, laufen Proliferation und Apoptose in grösserem Ausmass ab, als bei nicht trächtigen Tieren. In Kühen, deren Reproduktionsstatus nicht angegeben war, stellten Wilde et al. (1997) vom 217. bis zum 252. Tag der Laktation einen apoptotischen Index von durchschnittlich 2,4% fest. Dieser Wert übersteigt den von Capuco et al. (2001) ermittelten apoptotischen Index um das 35fache. In dieser Studie von Capuco et al. (2001) wurden jedoch ausschliesslich Kühe untersucht, die nicht trächtig waren. Ihren früheren, unveröffentlichten Untersuchungen zufolge, erhöht sich im Falle einer Trächtigkeit die Apoptose- und die Proliferationsrate der Mammapithelzellen signifikant. Wilde et al. (1997) stellten im Milchdrüsenepithel von Kühen eine Woche nach dem Trockenstellen einen Anteil apoptotischer Zellen von 4,8% fest. Im laktierenden Gewebe betrug die Apoptoserate durchschnittlich 2,4%. Für diese Kühe liegen keine Angaben bezüglich des Trächtigkeitsstatus vor. Nach meinen Ergebnissen nimmt die Proliferationsrate im Epithel der Milchdrüse nicht tragender Kühe mit fortdauernder Involution kontinuierlich ab. In der Trächtigkeit sind nach 14 Tagen das 50fache an Epithelzellen im Vergleich zu nicht tragenden Kühen in Teilung. Zu den Zeitpunkten,

an denen die höchste Mitoserate festgestellt wird, ist auch die Apoptoserate am höchsten. Die Mitoserate, die durch den immunzytochemischen Nachweis von Ki-67 ermittelt wurde, ist stets höher als die Apoptoserate, die durch die Caspase-3/TUNEL positiven Zellen ermittelt wurde. Eine Zunahme der Zahl der Drüsenepithelzellen während der Involution wurde durch Capuco et al. (1997) festgestellt. Wird nicht durchgehend gemolken, sondern eine Trockenstehperiode eingehalten, ist eine Woche vor der Kalbung der Anteil der Epithelzellen an der Gesamtzellzahl der Mammarzellen um 9% höher. Holst et al. (1987) verglichen histologisch und ultrastrukturell den Involutionsverlauf in der Milchdrüse trächtiger und nicht trächtiger Kühe. Sie kommen zu dem Schluss, dass in beiden Fällen der Epithelzellverlust gering ist und die Epithelzellen den Kontakt zur Basalmembran behalten. Im Unterschied dazu ist die Involution des murinen Milchdrüsengewebes durch Verlust der alveolären Struktur und durch Abstossung der Alveolarzellen ins Lumen gekennzeichnet (Strange et al., 1992). Der überwiegende Anteil des involutierenden bovinen Milchdrüsengewebes ist histologisch nicht von laktierendem Gewebe zu unterscheiden (Wilde et al., 1997). Die Autoren entdeckten in denjenigen Gewebeteilen weniger TUNEL-positive Zellen, als in Gewebeteilen, die durch geringgradigen Epithelzellverlust gekennzeichnet waren. Während der Involution der Milchdrüse kommen apoptotische Zellen in umschriebenen Bereichen des Drüsenparenchyms vor. Während der Laktation finden sich vereinzelt apoptotische Zellen im gesamten Drüsengewebe verteilt (Quarrie et al., 1995; Wilde et al., 1997). Eine Konzentration proliferativer und apoptotischer Vorgänge auf einzelne Drüsenläppchen während der Involutionsphase konnte ich lichtmikroskopisch in meiner Studie bestätigen.

Die Caspase-3 ist das letzte exekutorisch wirksame Enzym der Caspase-Kaskade (Thornberry und Lazebnik, 1998). Kolek et al. (2003) wiesen in Zellkulturen nach, dass Transforming-growth-factor  $\beta 1$  (TGF- $\beta 1$ ) die Apoptose von bovinen Epithelzellen einleitet. Ihrer Studie zufolge findet die Caspase-3 Expression 12h nach Einwirken von TGF- $\beta 1$  ihren Höhepunkt. In dieser Studie wurde jedoch keine Probe untersucht, die später als 24h nach Beginn der Involution genommen wurde. Nach Behandlung mit TGF- $\beta 1$  erfolgte ein rascher Ablauf der Caspase-Kaskade. Eines der Caspase-spezifischen Spaltprodukte, das 89kDa PARP Fragment, wurde im Zytoplasma und in der Kernregion gefunden. TGF- $\beta 1$  ist nur einer von vielen Faktoren, welche die Apoptose der Epithelzellen regulieren. Die Abnahme der

Sekretion der laktogenen Hormone Prolaktin, GH, IGF-1 (Travers et al., 1996; Marti et al., 1999) und die Interaktionen der lokalen, intramären Faktoren TGF- $\beta$ 1 (Motyl et al., 1998), IGFBP-5 (Tonner et al., 1999), IGFBP-3 (Baumrucker und Eröndu, 2000) sind an der Induktion der Apoptose der Mammaepithelzellen beteiligt. Dieser komplexe Prozeß der Induktion der Apoptose in der Involutionsphase bedingt in vivo möglicherweise eine verzögerte Caspase-3 Aktivierung. Die Expression von TGF- $\beta$ 1 nimmt während der Involution der Milchdrüse der Kuh stetig zu (Plath et al., 1997). Eine hohe Immunreaktivität von Caspase-3 zeigte sich in meiner Arbeit nur bei zwei Proben, die 48h bzw. 14d nach Beginn der Involution entnommen wurden. Dies spricht für eine Regulierung durch lokale Faktoren, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten die Apoptose einleiten. Beim Schwein steigt die Caspase-3 Expression vom Tag 4 nach dem Absetzen der Ferkel bis zum sechsten Tag der Involution kontinuierlich (Motyl et al., 2001). Die Zahl der apoptotischen Zellen in der Milchdrüse der Sau, die durch TUNEL-Methode ermittelt wurde, erhöhte sich im Beobachtungszeitraum von 2,7% auf 3,8%. Laut dieser Studie steigt ebenfalls das Verhältnis von Bax zu Bcl-2 mit zunehmender Absetzdauer von 2,3 auf 5,6 an. Interessant ist, dass bei meinen immunzytochemischen Untersuchungen das antiapoptotisch wirksame MIF im Euter der trächtigen Kuh nie gleichzeitig mit Caspase-3 nachgewiesen werden konnte. Im Euter der nicht trächtigen Kühe sind dagegen MIF und Caspase-3 auch zum gleichen Zeitpunkt der Involution nachweisbar. MIF verhindert die Caspase-3-Aktivierung durch Unterbinden der Proteolyse aus der aktive proapoptotische Bcl-2 Proteine hervorgehen (Baumann et al., 2003). Diese Proteine, Bid und Bax, bedingen die Freisetzung Caspase-3-aktivierender Substanzen aus dem intermembranösen Raum der Mitochondrien (Li et al., 1997). Unseren Ergebnissen zufolge greift dieser Mechanismus unter dem hormonellen Einfluss der Trächtigkeit. Es bleibt zu klären ob andere Bcl-2 Proteine, deren Aktivierung durch MIF nicht verhindert werden kann, bei nicht trächtigen Kühen zum Kollaps der Integrität der Mitochondrienmembran führen. Das proapoptotisch wirksame Bax und Caspase-3 sind in unseren Versuchen gleichzeitig nur im Euter der nicht trächtigen Kuh nachweisbar. Eine Zunahme der Bax-Immunfluoreszenz in boviner Mammaepithelzellkultur wurde nach Induktion der Apoptose mittels TGF- $\beta$  beobachtet (Kolek et al., 2003). Diese Zunahme ging mit einem gleichzeitigen Anstieg der Zahl apoptotischer Zellen einher. Colitti et al. (2003) untersuchten bei Euterbiopsien laktierender Kühe 45, 53 und 60 Tage post partum den Bax und Bcl-2



mRNA-Gehalt. Der Nachweis von Bcl-2 mRNA gelang in allen Proben. Bax mRNA konnte nur 45 Tage post partum detektiert werden. Am Mäusemodell ergeben sich weitere Hinweise für eine sehr komplexe Kontrolle der Apoptose in vivo. In der Phase, in der die Apoptoserate am höchsten war, wurde die Bak mRNA-Expression hochreguliert, während keine signifikante Änderung der Bax mRNA-Expression zu verzeichnen war (Metcalf et al., 1999). Zhang et al. (1998) registrierten eine Bax-Akkumulation auf den Membranen verschiedener Zellorganellen vor der Caspase-3-Aktivierung. Die Expression von Caspase-3 und Bax im Milchdrüsengewebe der Ziege war in der Hochlaktation am niedrigsten, erhöhte sich aber signifikant am Ende der Laktationsperiode und blieb die Trockenstehperiode über erhöht (Wareski et al., 2001). Die Autoren registrierten unerwartet das gleiche Expressionsmuster für Bcl-2, wenn auch die Expressionsrate insgesamt niedriger war als die von Bax.

Eine weitere Möglichkeit zur Verhinderung der Caspase-3-Aktivierung besteht durch Galektin-3. Galektine sind tierische Lektine, die an  $\beta$ -Galaktoside binden (Cooper und Barondes, 1999). Die biologischen Effekte dieser Proteine schliessen Zellproliferation, Zelltod, Zelladhäsion und Zellmigration ein und erstrecken sich auf fast alle Zelltypen (Barondes et al., 1994; Gabius, 1997; Cooper und Barondes, 1999; Gabius, 2000). Von vierzehn bekannten Galektinen ist Gal-3 das einzige mit antiapoptotischen und antianoikischen Eigenschaften (Kim et al., 1999; Yang und Liu, 2003). Gal-3 reichert sich im intermembranösen Raum der Mitochondrien an und stabilisiert die Mitochondrienmembran (Yu et al., 2002). Apoptosemediatoren wie Zytochrom c und Procaspase-3 gelangen so nicht ins Zytosol und die Aktivierung von Caspase-3 unterbleibt (Li et al., 1997). Die Involution der Milchdrüse vollzieht sich bei Nagern in zwei getrennten Phasen. Die erste Phase ist reversibel und wird durch lokale Faktoren reguliert. Die Alveolarepithelzellen gehen zwar durch Apoptose zugrunde, die lobuloalveoläre Struktur der Milchdrüse bleibt aber erhalten (Li et al., 1997). Bei Kühen bleiben jedoch die Alveolen während der Involution erhalten (Capuco und Akers, 1999). In der zweiten Phase, die bei Nagern nach etwa vier Tagen einsetzt, unterliegen Komponenten der Basalmembran und die extrazelluläre Matrix der Proteolyse. Als Folge geht die lobulo-alveoläre Struktur verloren (Lund et al., 1996). Die Gesamtdauer des Involutionsprozesses beträgt bei der Ratte 10-15 Tage (Lascelles und Lee, 1978). Mengwasser et al. (2002) konnten während der Laktation bei der Ratte keine positive Immunreaktion für Gal-3 beobachten. Innerhalb von zwei Tagen nach Beendigung der Laktation wird die Expression von Gal-3 stark

hochreguliert und Gal-3 bleibt während des gesamten Involutionsprozesses in Mammaryepithelzellen nachweisbar. Darüberhinaus beobachteten sie, dass die Expression von Gal-3 fast ausschliesslich auf nicht-apoptotische Zellen beschränkt ist. Beim histologischen Vergleich des Involutionsverlaufs in Galectin-3 Knockout-Mäusen mit dem bei gesunden Tieren, konnten keine morphologischen Unterschiede festgestellt werden. Die Autoren vermuten in diesem Zusammenhang eine Kompensierung des Gal-3 Knockout durch andere Mitglieder der Galektin-Familie. Die Galectin-3 Expression kann durch Dexamethason unterdrückt werden (Mengwasser et al., 2002). Die Autoren folgern daraus, dass systemische Glukokortikoide die Gal-3 Expression am Anfang der Involution verhindern. Sheikholeslam-Zadeh et al. (2001) untersuchten in menschlichen Cholesteatomen das Verhältnis von Gal-3 Expression zu der Apoptoserate. In diesen aus Granulations- und Bindegewebe bestehenden, durch zwiebelschalenartig verhornendes Plattenepithel gekennzeichneten benignen Tumoren wurde die mit der TUNEL-Methode festgestellte Apoptoserate mit der immunhistochemischen Gal-3 Färbung verglichen. Es ergab sich im Epithelgewebe eine positive Korrelation zwischen Gal-3 Expression und Apoptoserate. Die Gal-3 Expression verhält sich in menschlichen Cholesteatomen ähnlich der MIF Expression (Choufani et al., 2001). Beide Proteine besitzen antiapoptotische Eigenschaften und in dieser Studie ergibt sich keine Korrelation der MIF Immunopositivität mit der anderer Galektine, für die keine antiapoptotische Wirkung nachgewiesen ist. Nach unseren Ergebnissen wird Gal-3 in den ersten 24h der Involutionsphase nur in der Milchdrüse der trächtigen Kuh exprimiert. Zu dieser Zeit ist keine Caspase-3-Aktivität registrierbar. Die Anzahl der Gal-3 positiven Epithelzellen nimmt in den folgenden 24h ab. Zeitgleich sind die meisten Epithelzellen Caspase-3 positiv. Mit ansteigender Zahl Gal-3 positiver Zellen 14 Tage nach dem Trockenstellen ist zwar auch Caspase-3-Aktivität nachweisbar, jedoch nicht in dem Maße wie zuvor. In den Gewebeproben der trockengestellten Kühe mit hoher Proliferations- und Apoptoseraterate wurde auch hohe Gal-3 Immunoreaktivität registriert. In dem Zeitraum 14 Tage vor der Kalbung ist zwar ebenfalls mitotische Aktivität zu verzeichnen, Gal-3 Immunreaktion ist jedoch negativ. Die Involution geht hier fliessend in die Laktogenese über. Dieses bestätigt Untersuchungen von Mengwasser et al. (2002), die in der Laktationsperiode bei Ratten ebenfalls kein Gal-3 in der Milchdrüse nachweisen konnten. Ein Hinweis auf die Regulierung der Apoptose des Milchdrüsenepithels durch das Zytokin MIF und

das Lektin Gal-3, die beide antiapoptotisch wirken (Yu et al., 2002; Baumann et al., 2003), erhält man den Ergebnissen zufolge zumindest im Epithel der trächtigen Kühe.

Der immunhistochemische Nachweis des Proteins Bcl-2 verlief in den von mir untersuchten Eutergeweben trockenstehender Kühe negativ. Dies steht im Einklang mit Untersuchungen von Metcalfe et al. (1996), die in murinen Alveolarepithelzellen der Milchdrüse kein Bcl-2 nachweisen konnten. Andere immunhistochemische Studien zeigten, dass Bcl-2 hauptsächlich in der frühen Laktation exprimiert wird (Veis et al., 1993) und eine Schutzfunktion für hochproliferative Zellen ausübt (Lu et al., 1996). Die unterschiedlichen Proteine der Bcl-2 Familie können homo- und heterodimerisieren (Green und Reed, 1998). Es bestehen viele Kombinationsmöglichkeiten mit pro- und antiapoptotischen Homo- und Heterodimeren. Die Interaktionen der einzelnen Proteine sind jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt und verstanden (Motyl et al., 2001).

In Übereinstimmung mit anderen Autoren (Shyamala und Haslam, 1980; Schams et al., 2003) wurde von mir eine ausschliesslich nukleäre Lokalisation des ER $\alpha$  und des PR im Milchdrüsenepithel nachgewiesen. In der Milchdrüse der Nager verteilt sich der ER $\alpha$  auf epitheliales und stromales Gewebe (Haslam, 1989). Auch andere Studien zeigten, dass bei den Wiederkäuern die ER $\alpha$  Expression auf das Milchdrüsenepithel beschränkt ist (Capuco et al., 2002). In unseren Proben waren stromale Zellen, freie Zellen und Gefässendothelzellen stets immunonegativ für ER $\alpha$ . Es besteht die Möglichkeit, dass Epithelzellen erst nach ihrer Ausdifferenzierung ER $\alpha$  exprimieren (Berry et al., 2003). Proliferierende Epithelzellen im Euter sind ER $\alpha$  negativ (Capuco et al., 2002). In Kalbinnen, die im Alter von einem bis drei Monaten ovariectomiert wurden, ist die Proliferationsrate des Milchdrüsenepithels nach sechs Monaten gegenüber der in Kalbinnen mit intakten Eierstöcken stark erniedrigt. Der Anteil ER $\alpha$  positiver Zellen ist bei den ovariectomierten Kalbinnen signifikant höher, als bei der Kontrollgruppe (Berry et al., 2003). Die hormonale Regulation der ER $\alpha$  Expression in Zusammenhang mit Epithelzellproliferation in der bovinen Milchdrüse ist noch nicht vollständig geklärt. Eine Kurzzeitbehandlung mit GH bedingt eine deutliche Erhöhung der Proliferation des Milchdrüsenepithels (Berry et al., 2001). Der Wachstumshormonrezeptor und GH mRNA sind im Euter nachweisbar (Sinowatz et al., 2000) und somit möglicherweise direkt in die Mammogenese involviert. An der

komplexen Steuerung der Proliferation des Milchdrüsenepithels ist auch IGF-1 beteiligt. Die Proliferation der Drüsenepithelzellen in der Mamma wird wahrscheinlich direkt durch GH und indirekt durch IGF-1 vermittelt (Akers et al., 2000). GH und Prolaktin verhindern die Apoptose in der Milchdrüse. GH stimuliert die lokale IGF-1 Produktion und Prolaktin unterbindet die lokale Produktion von IGFBP-5, welches die Verfügbarkeit von IGF-1 einschränkt (Flint et al., 2001). In unseren Schnitten ist der Anteil ER $\alpha$  positiver Zellen im stark proliferativen Euterepithel geringer als im Euterepithel, das eine niedrige Teilungsrage aufweist. Der Anstieg an ER $\alpha$  positiven Zellen im Euter der nicht trächtigen Kuh 14 Tage nach dem Trockenstellen könnte die Hypothese unterstützen, dass die Drüsenepithelzellen in der Mamma mit zunehmender Differenzierung ER $\alpha$  positiv werden (Berry et al., 2003). Da Proliferations- und Apoptoserate bei den nicht trächtigen Kühen viel geringer ist, ist auch der Anteil ausdifferenzierter Epithelzellen grösser.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen die höchste Expression von ER $\alpha$  24h nach Involutionsbeginn im Epithel der Mamma bei nicht trächtigen Kühen. In der frühen Involution ist die ER $\alpha$ -Expression deutlich geringer bzw. konnten nach 48h und 96h keine ER $\alpha$  positiven Zellen im Drüsenparenchym registriert werden. Das Expressionsmuster für ER $\alpha$  ist im Falle der trächtigen Kuh anders: Hier wird bei deutlich weniger positiven Zellen der Expressionshöhepunkt nach 14 Tagen der Involution erreicht, wenn auch die Proliferationsrate des Drüsenepithels in der Milchdrüse wieder ansteigt.

Der immunhistochemische Nachweis des PR fällt am stärksten in den Epithelzellen der Alveolen der trächtigen Tiere aus. Der Anteil PR-positiver Zellen sinkt in der Hochträchtigkeit von 12,8% bis zum Kalbetermin auf 5,6%. Im gleichen Maße reduziert sich im Epithel die Proliferationsrate, die von 8,8% auf 2% sinkt. Die höchste Expressionsrate für PR lässt sich im Euter trächtiger Rinder feststellen, deren Gewebe eine grosse Proliferationsbereitschaft aufweist. Bei den nicht trächtigen Kühen lassen sich PR-positive Epithelzellen in den Alveolen der Milchdrüse nur 14 Tage nach dem Trockenstellen beobachten.

Östrogen und Progesteron sind essentiell für die Proliferation und Differenzierung des Epithels von Drüsenalveolen und Gängen in der Milchdrüse (Cowie et al., 1980; Topper und Freeman, 1980). Östrogen stimuliert das Wachstum der Milchgänge. Progesteron und Östrogen fördern die Entwicklung des Alveolargewebes. Exogenes GH und Östrogen stimulieren beide die Proliferation der Mammapithelzellen in prä-

und postpuberalen Kalbinnen (Woodward et al., 1993; Berry et al., 2001; Capuco et al., 2002). Im menschlichen Zervikalepithel ist die grösste Zahl Ki-67-positiver Zellkerne in der progesterondominierten Lutealphase nachzuweisen (Konishi et al., 1991). Untersuchungen am Milchdrüsenepithel der Ratte zeigten eine negative Korrelation von Mitoseaktivität und ER $\alpha$ -Expression. Eine ähnliche Beziehung fand ich in der Milchdrüse des Rindes im Zeitraum der Hochträchtigkeit. Eine parakrine Vermittlung der mitotischen Aktivität wird vermutet (Sivaraman et al., 2001). Russo et al. (1999) untersuchten mittels immunhistochemischer Doppelfärbung das Verteilungsmuster immunoreaktiver ER $\alpha$  und PR Zellen im Verhältnis zu proliferierenden Zellen in der Milchdrüse von Menschen und Ratten. Das menschliche Brustdrüsenepithel stammte von geschlechtsreifen Frauen mit regelmässigem Zyklus. Die Ratten waren ebenfalls geschlechtsreif und zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme nicht trächtig. Proliferierende Zellen befanden sich fast ausschliesslich im Epithel der Milchgänge und Alveolen. Nur vereinzelt wurden Ki-67 positive Myoepithelzellen und Stromazellen beobachtet. Der prozentuale Anteil an Zellen die ER $\alpha$  und/oder PR exprimierten entsprachen dem Anteil an Ki-67 positiven Zellen ähnlich. Diejenigen Zellen, die Ki-67 positiv waren, erwiesen sich zum überwiegenden Teil als ER $\alpha$  und PR negativ. Weniger als 0,5% der Zellen waren ER $\alpha$  und gleichzeitig Ki-67 positiv. Proliferierende, Ki-67 positive Zellen, die PR exprimieren kamen noch seltener vor. Die Autoren vermuten, dass Östrogen in ER $\alpha$  positiven Zellen die Produktion eines Wachstumsfaktors bedingt, der wiederum in der Population ER $\alpha$  negativer Zellen, die Zellteilung stimuliert. Die Expressierung von Zytokeratinen steht ebenfalls im Zusammenhang mit der Proliferation in der Milchdrüse. In der frühen Phase der Laktation sind die Epithelzellen noch nicht differenziert und proliferieren. Zu diesem Zeitpunkt werden Zytokeratine von der Mehrzahl der Epithelzellen exprimiert (Knight und Peaker, 1984). Im Gegensatz dazu exprimieren die endgültig differenzierten Epithelzellen am Ende der Laktationsperiode keine Zytokeratine, obwohl das Gewebe noch zur Proliferation befähigt ist (Wilde et al., 1987). Mit dem murinen Vimentin-Antikörper werden die Myoepithelzellen in allen Milchgängen und Alveolen des Ziegenweibchens markiert. Alle übrigen Epithelzellen binden den Vimentin-Antikörper nicht (Li et al., 1999). In einer permanenten Epithelzelllinie, die der bovinen Milchdrüse entstammten, wurde die Expressierung verschiedener intermediärer Filamente untersucht. Die Zellen, deren Kulturmedium hohe Konzentrationen an Hydrokortison, Insulin und Prolaktin enthielt,

produzierten keine Vimentin-Filamente. Epithelzellen, die der gleichen Primärkultur entstammten und ohne Hormonzugabe wuchsen, enthielten Vimentin-Filamente (Schmid et al., 1982). Diese Versuchsreihe zeigt, dass bestimmte Hormone Einfluss auf die Expression intermediärer Filamente hat. Die Vimentin-Filamente in den Epithelzellen scheinen auf periphere Bereiche des Zytoplasmas beschränkt zu sein und formieren sich hier zu 'buschähnlichen' Strukturen (Schmid et al., 1982). Diese Beobachtung bestätigt sich in unserer Studie, wobei dieses Verteilungsmuster jedoch nur in Epithelzellen der Milchdrüse nicht trächtiger Rinder beobachtet werden konnte. Die positive Immunreaktivität war ebenfalls auf einen fortgeschrittenen Involutionszeitpunkt beschränkt. Erst vierzehn Tage nach dem Trockenstellen können diese 'buschähnlichen' Strukturen am luminalen Pol der Epithelzellen dargestellt werden. Eine Beziehung der Vimentin-Expression zu den zellulären Prozessen der Proliferation und Apoptose lässt sich nicht erkennen. Beim Vergleich der Anzahl Caspase-3 positiver Zellen mit jener TUNEL positiver Zellen ergeben sich unterschiedliche Apoptoseraten. CAD (caspase-activated deoxyribonuclease) wird durch Caspase-3 vom Komplex mit I<sup>CAD</sup> (inhibitor of the caspase-activated deoxyribonuclease) abgespalten. Freies CAD gelangt vom Zytosol in den Kern und leitet die DNA-Fragmentation ein (Liu et al., 1997; Enari et al., 1998). Die anfallenden DNA-Stücke werden an ihren 3-OH Enden durch die TUNEL Methode sichtbar gemacht. TUNEL ist nicht spezifisch für apoptotische Zellen. Man weist lediglich die DNA-Brüche nach, die in apoptotischen Zellen vorhanden sind. Eine grosse Anzahl an freien 3-OH Enden bei der DNA kommt ebenfalls bei Nekrose, Autolyse und DNA-Reparatur vor. Durch entsprechende Vorbehandlung des Gewebes wird dieser relativ geringen Spezifität von TUNEL entgegengewirkt (Suurmeijer et al., 1999). In Mammarkomplexen laktierender Mäuse, deren Strichkanäle am 5. Tag post partum chirurgisch verschlossen wurden, wird eine DNA-Fragmentation zwei und drei Tage nach Verschluss deutlich. In den Komplexen, an denen die Mäusejungen weiter saugen konnten, lässt sich keine DNA-Fragmentation im Milchdrüsenepithel nachweisen (Marti et al., 1997). Quarrie et al. (1995) beschreiben DNA-Fragmentation in der murinen Milchdrüse innerhalb von 48 Stunden nach Entfernen des Wurfs. Die Menge fragmentierter DNA in Epithelzellen nimmt in dieser Studie bis zum 4. Tag nach dem Absetzen zu. Die Apoptoserate steigt hier von 1,7% am zweiten Tag der Involution auf 4,5% am vierten Tag. Die Apoptose wird in der Involutionsphase der Milchdrüse besonders deutlich.

Programmierter Zelltod und Proliferation des Milchdrüsengewebes beschränken sich jedoch keinesfalls auf diesen Entwicklungsabschnitt. Eine Woche nach dem Trockenstellen waren 5% der Epithelzellen TUNEL-positiv. Im laktierenden Gewebe fanden sich immerhin 2% TUNEL-positive Zellen (Wilde et al., 1997). Im Ziegeneuter waren eine Woche nach dem Trockenstellen ebenfalls 5% der Epithelzellen apoptotisch, während laktierendes Eutergewebe eine Apoptoserate von nur 1% aufweist (Li et al., 1999). Die DNA-Fragmentation, die mit der TUNEL Methode sichtbar gemacht wird, stellt nur einen Teilabschnitt des apoptotischen Geschehens dar. Jede Apoptose ist verglichen mit der Laktationsdauer ein sehr kurzlebiges Ereignis (Pullan et al., 1996). Somit stellt auch eine niedrige Rate TUNEL positiver Zellen einen quantitativ bedeutsamen Prozess dar. Gegen Ende der Laktation ist ein Nettoverlust sekretorisch aktiver Zellen zu verzeichnen (Stefanon et al., 2002). Dies spricht dafür, dass, nach Überschreitung der Hochlaktation, der geringen Apoptoserate eine noch geringere Proliferationsrate entgegensteht. In unseren Präparaten sind zeitgleich die meisten Caspase-3 positiven Zellen zusammen mit TUNEL positiven Zellen zu beobachten. Im präpartalen Zeitraum von vierzehn Tagen bis zur Kalbung sind keine Caspase-3 positiven Zellen, jedoch TUNEL positive Zellen zu sehen. Dies könnte durch verstärkt auftretende DNA-Synthese und DNA-Reparatur in Vorbereitung auf die Laktation erklärt werden, oder einer Caspase-unabhängigen Aktivierung von Desoxyribonukleasen. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Proliferation und Apoptose des Milchdrüsenepithels zeitgleich ihre höchste Ausprägung erfahren. Liegt eine Trächtigkeit vor, reagiert das Epithel auf das Trockenstellen nach nur 48h mit programmiertem Zelltod und verstärkter Zellteilung. Die Proliferations- und Apoptoserate im Milchdrüsengewebe nicht trächtiger Kühe sind zu den untersuchten Zeitpunkten viel geringer.

## **Histologische und immunhistochemische Untersuchungen zur Involution der Milchdrüse des Rindes (*Bos taurus*)**

### **6. Zusammenfassung**

Ziel der Untersuchung war es, morphologische Veränderungen sowie das Ausmaß von Proliferation und Apoptose in der bovinen Milchdrüse während der Trockenstehperiode mit Hilfe histologischer und immunhistochemischer Methoden zu untersuchen.

Als Untersuchungsmaterial dienten zehn Biopsieproben der Milchdrüse von drei Brown Swiss Kühen, die zu verschiedenen Zeiten der Trockenstehperiode (acht Stunden nach dem Trockenstellen bis zum Tag der Kalbung) entnommen wurden. Zusätzlich zu den Biopsien wurden acht Gewebeproben von vier DFV Kühen untersucht. Zur Vorbereitung der Gewebeproben wurde das Euter unmittelbar nach der Schlachtung vom Schlachtkörper abgetrennt. Aus den vier Vierteln des Euters wurden jeweils zwei Proben herausgeschnitten und zur weiteren Bearbeitung vorbereitet.

Die Biopsieproben und die Gewebeproben wurden, in Bouin-Lösung oder Methanol-Eisessig (2:1) fixiert, in Paraplast eingebettet und dann zu histologischen Schnitten weiterverarbeitet.

Neben konventionellen lichtmikroskopischen Färbungen (H.E., Resorcinfuchsin-Kernechtrot, PAS, Goldner) wurden immunhistochemische Methoden eingesetzt. Zur Anwendung kamen elf verschiedene Antikörper (Antikörper gegen: ER, PR, Vimentin, Caspase-3, Ki-67, MIF, Gal-3, Bax, Bcl-2, CD4, CD8). Weiter erfolgte der Nachweis apoptose-spezifischer DNA-Fragmente mit der TUNEL-Methode.

Die Ergebnisse zeigten, dass die Proliferationsrate und die Apoptoserate im Milchdrüsenepithel 48 Stunden nach dem Trockenstellen bei der trächtigen Kuh, bzw. 24 Stunden nach dem Trockenstellen bei den nicht trächtigen Kühen am höchsten sind. Im Milchdrüsenepithel der untersuchten trächtigen Kühe ist sowohl die Proliferations- als auch die Apoptoserate dabei signifikant höher als die bei den nicht trächtigen Kühen. Proliferative und apoptotische Vorgänge konzentrieren sich während der Involution auf bestimmte Drüsenläppchen. Die Mitoserate, die durch den immunzytochemischen Nachweis von Ki-67 ermittelt wurde, war unter den



gewählten Versuchsbedingungen stets höher als die Apoptoserate, die durch den Anteil der Caspase-3 /TUNEL positiven Epithelzellen bestimmt wurde.

Der immunhistochemische Nachweis des antiapoptotisch wirkenden Proteins Bcl-2 verlief im Milchdrüsenepithel negativ.

Das Expressionsmuster für ER $\alpha$  im Drüsenparenchym der trächtigen Kuh unterschied sich deutlich von dem der nicht trächtigen Kühe. Vierundzwanzig Stunden nach Involutionsbeginn zeigte sich die höchste Expression von ER $\alpha$  im Epithel der Mamma bei nicht trächtigen Kühen. Lag eine Trächtigkeit vor, wird das Maximum der Expression nach vierzehn Tagen Involution erreicht.

Die maximale PR-Expression im Drüsenepithel der Mamma wurde bei den trächtigen Rindern nach vierzehn Tagen Involution festgestellt. Bei den nicht trächtigen Kühen, die untersucht wurden, ließen sich PR-positive Epithelzellen in den Alveolen ausschliesslich vierzehn Tage nach dem Trockenstellen beobachten.

Beim Vergleich der unterschiedlichen Populationen von T-Lymphozyten fiel auf, dass die CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten nach vierzehn Tagen Involution im Mammargewebe der trächtigen Kuh zahlreicher vorhanden waren als bei der nicht trächtigen Kuh. Die Zahl der CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten wies zu den untersuchten Zeitpunkten der Involution keine nennenswerte Schwankung auf.

Es konnten ausserdem das Zytokin MIF und das Lektin Gal-3, die beide antiapoptotisch wirken, im Milchdrüsenepithel während der Involution nachgewiesen werden.

Die Auswertung der morphologischen Parameter von Alveolarlumenfläche und Bindegewebsanteil ergab kein einheitliches Bild. Es liess sich allerdings zeigen, dass vierzehn Tage vor der Kalbung bis zum Geburtstermin das Lumen der Alveoli kontinuierlich zunimmt, während der Bindegewebsanteil abnimmt.

## **Histological and immunohistochemical studies of the involution in the mammary gland of cattle (*bos taurus*).**

### **7. Summary**

The purpose of this study was to examine the morphological changes and the extent of proliferation and apoptosis in the bovine mammary gland during the dry period using histological, immunohistochemical and morphometric techniques.

The material comprised ten biopsies obtained from three Brown Swiss cows at different stages in the dry period, ranging from eight hours after commencement of the dry period until the day of calving. In addition to the biopsies, eight tissue specimens of four DFV cows were examined. To obtain tissue samples the udders were completely separated immediately after slaughter. Samples were taken from all four quarters of the mammary gland and prepared for further treatment. The biopsy samples from the live animals were treated in the same manner as the tissue samples.

Fixation was carried out using Bouin fluid or methanol/glacial acetic acid (2:1). The specimens were embedded in Paraplast, then cut into 5µm thick sections.

Conventional light microscopy staining (H.E., Resorcinfuchsin-Kernechtrot, PAS, Goldner) and immunohistochemical studies (ER, PR, Vimentin, Caspase-3, Ki-67, MIF, Gal-3, Bax, Bcl-2, CD4, CD8) were carried out. The detection of apoptosis-specific DNA fragments was achieved by means of the TUNEL-method.

Results obtained showed that proliferation and apoptosis rate in the mammary epithelium peak simultaneously 48 hours after drying off in the pregnant cow and 24 hours after drying off in the non-pregnant cows. In the mammary gland tissue of pregnant cows both proliferation rate and apoptosis rate were higher than in the tissue from non-pregnant cows. During involution proliferative and apoptotic processes are concentrated on certain glandular lobules. According to our results, the mitotic index, which was determined by immunohistochemical detection of the proliferation marker Ki-67, in the chosen stages of involution was consistently higher than the apoptotic index, which was determined by evaluation of the fraction of caspase-3/TUNEL positive epithelial cells.

Immunohistochemical detection of the antiapoptotic protein bcl-2 was negative in the mammary glandular epithelium during all stages of involution.

The pattern of ER $\alpha$ -expression in the glandular epithelium of pregnant cows was significantly different from that in the non-pregnant cows. Twenty-four hours following the onset of involution the highest expression of ER $\alpha$  was found in the mammary epithelium of the non-gravid cows we examined. In the udder of the pregnant cow, the maximum expression of ER $\alpha$  was reached fourteen days after the onset of involution. At this time, however, there was a significantly greater number of positive cells present in the glandular epithelium of the non-pregnant cows we examined.

The strongest expression of PR in the mammary glandular epithelium was found in the pregnant cows fourteen days after the onset of involution. In the non-pregnant cows PR-positive epithelial cells in the alveoles could only be observed fourteen days after drying off.

The comparison of the different T-lymphocyte subpopulations showed that the CD8<sup>+</sup> T-lymphocytes were much more numerous in the mammary tissue of pregnant cows than in that of the non-pregnant animals during involution. CD4<sup>+</sup> T-lymphocytes showed no variation in population size during the studied stages of involution. Moreover, it could be shown that the cytokine MIF and the lectin gal-3, of which both have an antiapoptotic effect, are present in the mammary gland tissue during involution.

No clear conclusions could be drawn from an evaluation of the morphological parameters of the area of alveolar lumina and the amount of connective tissue. Only during the latter period of gestation did any regularity emerge. During the fourteen days before calving until the day of calving, the area of alveolar lumina increases continuously whilst the amount of connective tissue continuously decreases.

## **8. Verzeichnisse**

### **8.1 Literaturverzeichnis**

**Adams JM, Cory S (1998)**

The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival

Science **281**:1322-1326

**Akers RM, Beal WE, McFadden TB, Capuco AV (1990)**

Morphometric analysis of involuting bovine mammary tissue after 21 or 42 days on non-suckling

J Anim Sci **68**:3604-3613

**Akers RM, McFadden TB, Purup S, Vestergaard M, Sejrsen K, Capuco AV (2000)**

Local IGF-1-axis in peripubertal ruminant mammary development

J Mamm Gland Biol Neopl **5**:43-51

**Allen E, Doisy EA (1983)**

An ovarian hormone: preliminary report on its localization, extraction and partial purification, and action in test animals

JAMA **250**(19):2681-2683

**Aoki N, Ishii T, Ohira S, Yamaguchi Y, Negi M, Adachi T, Nakamura R, Matsuda T (1997)**

Stage specific expression of milk fat globule membrane glycoproteins in mouse mammary gland: Comparison of MFG-E8, butyrophilin, and CD36 with a major milk protein, beta-casein

Biochem Biophys Acta **1334**:182-190

**Asai K, Kai K, Rikiishi H, Sugawara S, Maruyama Y, Yamaguchi T, Ohta M, Kumagai K (1998)**

Variation in CD4<sup>+</sup> T and CD8<sup>+</sup> T lymphocyte subpopulations in bovine mammary gland secretions during lactating and non-lactating periods

Vet Immunol Immunopathol **65**:51-61

**Ashkenazi A, Dixit VM** (1998)

Death receptors: Signaling and modulation

Science **281**:1305-1308

**Atwood CS, Ikeda M, Vonderhaar BK** (1995)

Involution of mouse mammary glands in whole organ culture: A model for studying programmed cell death

Biochem Biophys Res Commun **207**:860-867

**Bäuerle PA, Baltimore D** (1996)

NF-kappa B: Ten years after

Cell **87**:13-20

**Barondes SH, Cooper DN, Gitt MA, Leffler H** (1994)

Galectins: structure and function of a large family of animal lectins

J Biol Chem **269**:20807-20810

**Baugh JA, Bucala R** (2002)

Macrophage migration inhibitory factor

Crit Care Med **30**:S27-S35

**Baumrucker CR, Erondy NE** (2000)

Insulin-like growth factor (IGF) system in the bovine mammary gland and milk

J Mamm Gland Biol Neopl **5**:53-64

**Beardmore JM, Richards RC** (1983)

Concentrations of epidermal growth factor in mouse milk throughout lactation

J Endocrinol **96**:287-292

**Beg AA, Sha WC, Bronson RT, Ghosh S, Baltimore D** (1995)

Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF-kappa-B

Nature **376**:167-170

**Berglund L, Peterson TE, Rasmussen JT (1996)**

Structural characterization of bovine CD36 from the milk fat globule membrane  
Biochem Biophys Acta **1309**:63-68

**Berry SD, McFadden TB, Pearson RE, Akers RM (2001)**

A local increase in the mammary IGF-1:IGFBP-3 ratio mediates the mammary effects of estrogen and growth hormone  
Domest Anim Endocrinol **21**:39-53

**Berry SD, Jobst PM, Ellis SE, Howard RD, Capuco AV, Akers RM (2003)**

Mammary epithelial proliferation and estrogen receptor  $\alpha$  expression in prepubertal heifers: effects of ovariectomy and growth hormone  
J Dairy Sci **86**:2098-2105

**Bloom BR, Bennett B (1966)**

Mechanism of a reaction in vitro associated with delayed-type hypersensitivity  
Science **153**:80-82

**Boise LH, Gonzalez-Garcia M, Postema CE, Ding L, Lindsten T, Turka LA, Mao X, Nunez G, Thompson CB (1993)**

Bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death  
Cell **74**:597-608

**Brown DC, Gatter KC (1990)**

Monoclonal antibody Ki-67:its use in histopathology  
Histopathology **17**:489-503

**Capuco AV, Akers R (1999)**

Mammary involution in dairy animals  
J Mamm Gland Biol Neopl **4**:137-144

**Capuco AV, Akers R, Smith J (1997)**

Mammary growth in Holstein cows during the dry period: Quantification of nucleic acids and histology

J Dairy Sci, **80**:477-487

**Capuco AV, Wood D, Baldwin R, Mcleod K, Paape MJ (2001)**

Mammary cell number, proliferation, and apoptosis during a bovine lactation: relation to milk production and effect of bST

J Dairy Sci **84**:2177-2187

**Capuco AV, Ellis S, Wood DL, Akers RM, Garrett W (2002)**

Postnatal mammary ductal growth: three-dimensional imaging of cell proliferation, effects of estrogen treatment, and expression of steroid receptors in prepubertal calves

Tissue Cell **34**:9-20

**Carpenter G (1980)**

Epidermal growth factor is a major growth promoting agent in human milk

Science **210**:198-199

**Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B (1975)**

An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors

Proc Natl Acad Sci USA **72**:3666-3670

**Cattoretti G, Becker MH, Key G, Duchrow M, Schluter C, Galle J, Gerdes J**

(1992)

Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections

J Pathol **168**:357-363

**Chapman RS, Lourenco PC, Tonner E, Flint DJ, Selbert S, Takeda K, Akira S, Clarke AR, Watson CJ (1999)**

Suppression of epithelial apoptosis and delayed mammary gland involution in mice with a conditional knockout of Stat3

Genes and Development **13**:2604-2616

**Cheng E H-Y, Kirsch DG, Clem JR, Ravi R, Kastan MB, Bedi A, Keno K, Hardwick JM (1997)**

Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases

Science **278**:1966-1968

**Chittenden T, Harrington EA, O'Connor R, Flemington C, Lutz RJ, Evan GI, Guild BC (1995)**

Induction of apoptosis by the Bcl-2 homologue Bak

Nature **374**:733-736

**Choufani G, Ghanooni R, Decaestecker C, Delbrouck K, Simon P, Schüring MP, Zick Y, Hassid S, Gabius HJ, Kiss R (2001)**

Detection of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in human cholesteatomas and functional implications of correlations to recurrence status and to expression of matrix metalloproteinases-3/9, retinoic acid receptor- $\beta$ , and antiapoptotic galectin-3

Laryngoscope **111**:1656-1662

**Clarkson R, Watson CJ (1999)**

NF- $\kappa$ B and apoptosis in mammary epithelial cells

J Mamm Gland Biol Neopl **4**:165-175

**Colitti M, Stefanon B, Wilde CJ (1999)**

Apoptotic cell death, bax and bcl-2 expression during sheep mammary gland involution

Anat Histol Embryol **28**:257-264



**Colitti M, Venturini E, Gabai G, Stradaoli G, Stefanon B (2003)**

Apoptosis and expression of related proteins in mammary gland of heifers during early lactation

Vet Res Commun **27**:225-227

**Collier RJ (1985)**

Nutritional, metabolic, and environmental aspects of lactation

Larson BL (ed) Lactation. Academic Press, New York:80-128

**Collins I (1993)**

Biology of disease: endothelial nuclear factor-kappa-b and the initiation of the atherosclerotic lesion

Lab Invest, **68**:499-508

**Conneely OM, Lydon JP, De Mayo F, O'Malley BW (2000)**

Reproductive functions of the progesterone receptor

J Soc Gyn Inv **7**:S25-S32

**Cooper DNW, Barondes SH (1999)**

God must love galectins; He made so many of them

Glycobiology **9**:979-984

**Coppock CE, Everett RW, Natzke RP, Ainsle HR (1974)**

Effect of dry period length on Holstein milk production and selected disorders at parturition

J Dairy Sci **57**:712-718

**Couse JF, Lindzey J, Grandien K, Gustafsson J, Korach KS (1997)**

Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) and estrogen receptor  $\beta$  (ER $\beta$ ) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ER $\alpha$ -knockout mice

Endocrinology **138**:4613-4621

**Cowie A, Forsyth I, Hart I (1980)**

Hormonal control of lactation

Larson BL (ed) Lactation. Academic Press, New York:40-52

**David JR (1966)**

Delayed hypersensitivity in vitro: its mediation by cell-free substances formed by lymphoid cell-antigen interaction

Proc Natl Acad Sci USA **56**:72-77

**Dechering K, Boersma C, Mosselman S (2000)**

Estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$ : two receptors of a kind?

Curr Med Chem **7**:561-576

**Desagher S, Osen-Sand A, Nichols A, Eskes R, Montessuit S, Lauper S, Maundrell K, Antonsson B, Martinou JC (1999)**

Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis

J Cell Biol **144**: 891-901

**Devitt A, Moffatt OD, Raykundalia C, Capra JD, Simmons DL, Gregory CD (1998)**

Human CD14 mediates recognition and phagocytosis of apoptotic cells

Nature **392**:505-509

**Dias FM, Allaire FR (1982)**

Dry period to maximise milk production over two consecutive lactations

J Dairy Sci **65**:136-145

**Dulbecco R, Henahan M, Armstrong B (1982)**

Cell types and morphogenesis in the mammary gland

Proc Natl Acad Sci USA **79**:7346-7350

**Dulbecco R, Unger M, Armstrong B, Bowman M, Syka P (1983)**

Epithelial cell types and their evolution in the rat mammary gland determined by immunological markers

Proc Natl Acad Sci USA **80**:1033-1037

**Duvall E, Wyllie AH, Morris RG (1985)**

Macrophage recognition of cells undergoing programmed cell death (apoptosis)

Immunology **56**:351-358

**El Hagri MAAM (1945)**

Study of the arterial and lymphatic system in the udder of the cow

Vet J **101**:27-33, 51-63, 75-88

**Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S (1998)**

A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor  $\gamma$ CAD

Nature **391**:43-50

**Evans RM (1988)**

The steroid and thyroid hormone receptor superfamily

Science **240** (4854):889-895

**Fadok VA (1999)**

Clearance: The last and often forgotten stage of apoptosis

J Mamm Gland Biol Neopl **4**:203-211

**Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM (1992)**

Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages

J Immunol **148**:2207-2216

**Fadok VA, Henson PM (1998)**

Apoptosis: Getting rid of the bodies

Curr Biol **8**:R693-R695

**Flint DJ, Tonner E, Knight CH, Whitelaw CBA, Webster J, Barber M, Allan G**  
(2001)

Control of mammary involution by insulin-like growth factor binding proteins: role of prolactin  
Livestock Prod Sci **70**:115-120

**Frisch SM, Francis H** (1994)

Disruption of epithelial cell matrix interactions induces apoptosis  
J Cell Biol **124**:619-626

**Gabius HJ** (1997)

Animal lectins  
Eur J Biochem **243**:543-576

**Gabius HJ** (2000)

Biological information transfer beyond the genetic code: the sugar code  
Naturwissenschaften **87**:108-121

**Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H** (1984)

Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67  
J Immunol **133**:1710-1715

**Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H** (1983)

Production of a mouse antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation  
Int J Cancer **31**:13-20

**Giangrande PH, McDonnell DP** (1999)

The A and B isoforms of the human progesterone receptor: two functionally different transcription factors encoded by a single gene  
Recent Proc Horm Res **54**:291-314

**Glättli H (1924)**

Anatomie des Venensystems des Kuheuters

Inaug.-Diss. med. vet. Zürich

**Gomez RS, Pelka M, Johannessen AC, Hornstein OP, von den Driesch P (1997)**

CD36 (OKM5) antigen expression on human mucosal epithelia is associated with keratinization type

J Dermatol **24**:435-440

**Goodman R, Schanbacher F (1991)**

Bovine lactoferrin mRNA: sequence, analysis, and expression in the mammary gland

Biochem Biophys Res Commun **180**:75-84

**Grahame R, Bertalanffy F (1972)**

Cell division in normal and neoplastic mammary gland tissue in the rat

Anat Rec **174**:1-7

**Green DR, Reed JC (1998)**

Mitochondria and apoptosis

Science **281**:1309-1312

**Greene GL, Gilna P, Waterfield M, Baker A, Hort Y, Shine J (1986)**

Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA

Science **231**:1150-1154

**Grimm S, Bauer MKA, Bäuerle PA, Schulze-Osthoff K (1996)**

Bcl-2 down-regulates the activity of transcription factor NF-kappa B induced upon apoptosis

J Cell Biol **134**:13-23

**Guenette RS, Tenniswood M (1995)**

The role of insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs) in regulating active cell death in regressing rat prostate and mammary gland

J Cell Biochem **19B**:280

**Hadsell DL, Greenberg NM, Fligger JM, Baumrucker CR, Rosen JM (1988)**  
Targeted expression of des (1-3) human insulin-like growth factor 1 in transgenic mice influences mammary gland development and IGF-binding protein expression  
Endocrinology **137**:321-330

**Hainaut P, Mann K (2001)**  
Zinc binding and redox control of p53 structure and function  
Antioxid Redox Signal **3**:611

**Hamann J, Reichmuth J (1990)**  
Compensatory milk production within the bovine udder: effects of short-term non-milking of single quarters  
J Dairy Res **57**:17-22

**Haslam SZ (1989)**  
The ontogeny of mouse mammary gland responsiveness to ovarian steroid hormones  
Endocrinology **125**:2766-2772

**Hawkins MB, Thornton JW, Crews D, Skipper JK, Dotte A, Thomas P (2000)**  
Identification of a third distinct estrogen receptor and reclassification of estrogen receptors in teleosts  
Proc Natl Acad Sci **97**:10751-10756

**Heermeier K, Benedict M, Li Minglin, Furth P, Nunez G, Hennighausen L (1996)**  
Bax and Bcl-x<sub>s</sub> are induced at the onset of apoptosis in involuting mammary epithelial cells  
Mech Dev **56**:197-207

**Heinz M (1988)**  
Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen der Milchdrüse des Rindes im Verlauf der Trockenstehperiode unter besonderer Berücksichtigung der Involutionsprozesse  
Diss. med. vet. Universität Leipzig

**Holst B, Hurley W, Nelson D (1987)**

Involution of the bovine mammary gland: Histological and ultrastructural changes  
J Dairy Science **70**:935-944

**Howard A, Pelc SR (1951)**

Nuclear incorporation of P<sup>32</sup> as demonstrated by autoradiographs  
Exp Cell Res **2**:178-187

**Howie SEM, Sommerfield AJ, Gray E, Harrison DJ (1994)**

Peripheral T lymphocyte depletion by apoptosis after CD4 ligation in vivo: Selective loss of CD44- and 'activating' memory T cells  
Clin Exp Immunol **95**:195-200

**Hudson JD, Shoaibi MA, Maestro R, Carnero A, Hannon GJ, Beach DH (1999)**

A proinflammatory cytokine inhibits p53 tumor suppressor activity  
J Exp Med **190**:1375

**Humphreys R (1999)**

Programmed cell death in the terminal endbud  
J Mammary Gland Biol and Neoplasia **4**:213-220

**Hurley WL (1989)**

Mammary gland function during involution  
J Dairy Sci **72**:1637

**Ihle JN (1996)**

STATs: Signal transducers and activators of transcription  
Cell **84**:331-334

**Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR (1972)**

Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics  
Brit J Cancer **26**:239-257

**Kiefer MC, Brauer MJ, Powers VC, Wu JJ, Umansky SR, Tomei LD, Barr PJ** (1995)

Modulation of apoptosis by the widely distributed Bcl-2 homologue Bak  
Nature **374**:736-739

**Kim HRC, Lin HM, Biliran H, Raz A** (1999)

Cell cycle arrest and inhibition of anoikis by galectin-3 in human breast epithelial cells  
Cancer Res **59**:4148-4154

**Kim TH, Zhao Y, Barber MJ, Kuharsky DK, Yin XM** (2000)

Bid-induced cytochrome c release is mediated by a pathway independent of mitochondrial permeability transition pore and Bax  
J Biol Chem **275**:39474-39481

**Kleinberg DL** (1997)

Early mammary development: growth hormone and IGF-1  
J Mamm Gland Biol Neopl **2**:49-57

**Kleemann R, Kapurniotu A, Frank RW, Gessner A, Mischke R, Flieger O, Jüttner S, Brunner H, Bernhagen J** (1998)

Disulfide analysis reveals a role for macrophage migration inhibitory factor (MIF) as a thiol-protein oxidoreductase  
J Mol Biol **280**:85

**Klug A, Schwabe JW** (1995)

Protein motifs 5. Zinc fingers  
FASEB J **9**:597-604

**Knight C, Peaker M** (1982)

Development of the mammary gland  
J Reprod Fert **65**:521-536



**Knight C, Peaker M (1984)**

Mammary development and regression during lactation in goats in relation to milk secretion

Quar J Exp Physiol **69**:331-338

**Knight C, Wilde CJ (1988)**

Milk production in concurrently pregnant and lactating goats mated out of season

J Dairy Res **55**:487-493

**Koch T (1956)**

Die Milchdrüse (Glandula lactifera, Mamma) des Rindes

Monatshefte Vet.-Med. **11**:527-532

**Kolek O, Gajkowska B, Godlewski MM, Motyl T (2003)**

Antiproliferative and apoptotic effect of TGF- $\beta$ 1 in bovine mammary epithelial BME-UV1 cells

Comp Biochem Physiol (C) Toxi Pharma **134**:417-430

**Konishi I, Fujii S, Nonogaki H, Nanbu Y, Iwai T, Mori T (1991)**

Immunohistochemical analysis of estrogen receptors, progesterone receptors, Ki-67 antigen, and human papillomavirus DNA in normal and neoplastic epithelium of the uterine cervix

Cancer **68**:1240-1250

**Kothakota S, Azuma T, Reinhard C, Klippel A, Tang J, Chu K, McGarry TJ, Kirschner MW, Koths K, Kwiatkowski DJ, Williams CT (1997)**

Caspase-3-generated fragment of gelsolin: Effector of morphological change in apoptosis

Science **278**:294-298

**Kuiper GG, Enmark E, Pelto-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA (1996)**

Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary

Proc Natl Acad Sci **93**:5925-5930

**Kunsch C, Ruben SM, Rosen CA (1992)**

Selection of optimal kappa-B/Rel DNA-binding motifs – interaction of both subunits of NF-kappa-B with DNA is required for transcriptional activation  
Mol Cell Biol **12**:4412-4421

**Lascelles A, Lee C (1978)**

Involution of the mammary gland  
Lactation: a comprehensive treatise. Academic Press, New York **4**:115-177

**Le Roux JMW, Wilkens H (1959)**

Beitrag zur Blutgefäßversorgung des Euters der Kuh  
Dtsch Tierärztl Wschr **66**:429-435

**Li ML, Hu J, Heermeier K, Hennighausen L, Furth PA (1996)**

Apoptosis and remodeling of mammary gland tissue during involution proceeds through p53-independent pathways  
Cell Growth Differ **7**:13-20

**Li ML, Liu XW, Robinson G, Bar-Peled U, Wagner KU, Young WS, Hennighausen L, Furth PA (1997)**

Mammary-derived signals activate programmed cell death during the first stage of mammary gland involution  
Proc Natl Acad Sci USA **94**:3425-3430

**Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X (1997)**

Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase 9 complex initiates an apoptotic protease cascade  
Cell **91**:479-489

**Li P, Rudland PS, Fernig DG, Finch LMB, Wilde CJ (1999)**

Modulation of mammary development and programmed cell death by the frequency of milk removal in lactating goats  
J Physiol **519**:885-900

**Li P, Wilde CJ, Finch LMB, Fernig DG, Rudland PS (1999)**

Identification of cell types in the developing goat mammary gland  
J Histochem **31**:379-393

**Lithgow T, van Driel R, Bertram JF, Strasser A (1994)**

The protein product of the oncogene bcl-2 is a component of the nuclear envelope, the endoplasmic reticulum and the outer mitochondrial membrane  
Cell Growth Differ **5**:411-417

**Liu FT (2001)**

Galectins: a new family of regulators of inflammation  
Clin Immunol **97**:79-88

**Liu XW, Robinson G, Hennighausen L (1996)**

Activation of STAT-5a and STAT-5b by tyrosine phosphorylation is tightly linked to mammary gland differentiation  
Mol Endocrinol **10**:1496-1506

**Liu XW, Robinson G, Wagner KU, Garrett L, WynshawBoris A, Hennighausen L (1997)**

STAT-5a is mandatory for adult mammary gland development and lactogenesis  
Genes and Development **11**:179-186

**Liu X, Zou H, Slaughter C, Wang X (1997)**

DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA Fragmentation during apoptosis  
Cell **89**:175-184

**Lotthammer KH (1999)**

Umweltbedingte Fruchtbarkeitsstörungen. In: Fertilitätsstörungen beim weiblichen Rind. Grunert E, Berchtold M, Hrsg.  
Verlag Paul Parey, Berlin. 307-335

**Lu QL, Abel P, Foster CS, Lalani EN (1996)**

Bcl-2: role in epithelial differentiation and oncogenesis

Hum Pathol **27**:102-110

**Luciani MF, Chimini G (1996)**

The ATP binding cassette transporter ABC1, is required for the engulfment of corpses generated by apoptotic cell death

EMBO J **15**:226-235

**Lund LR, Romer J, Thomasset N, Solberg H, Pyke C, Bissell MJ, Dano K, Werb Z (1996)**

Two distinct phases of apoptosis in mammary gland involution: proteinase-independent and –dependent pathways

Development **122**:181-193

**Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schütz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans RM (1995)**

The nuclear receptor superfamily: the second decade

Cell **83**:835-839

**Mansfeld R, De Kruif A, Hoedemaker M, Heuwieser W (1999)**

Fruchtbarkeitsüberwachung auf Herdenbasis. In: Fertilitätsstörungen beim weiblichen Rind. Grunert E, Berchtold M, Hrsg.

Verlag Paul Parey, Berlin. 337-350

**Marti A, Feng Z, Altermatt HJ, Jaggi R (1997)**

Milk accumulation triggers apoptosis of mammary epithelial cells

Eur J Cell Biol **73**:158-165

**Marti A, Jaggi R, Vallan C (1999)**

Physiological apoptosis in hormone-dependent tissues: involvement of caspases

Cell Death Differ **6**:1190-1200

**Meissner R** (1964)

Beiträge über den anatomischen Bau des elastisch-muskulösen Systems der Rinderzitze

Diss. med. vet. Berlin (Ost)

**Mengwasser J, Liu FT, Sleeman JP** (2002)

Galectin-3 is strongly up-regulated in nonapoptosing mammary epithelial cells during rat mammary gland involution

Glycobiology **12**:129-134

**Metcalfe AD, Hickman JA, Streuli CH** (1996)

Programmed cell death and the mammary gland – The involvement of the Bcl-2 family members in the control of epithelial apoptosis

Biochem Soc Trans **24**:347S

**Metcalfe AD, Gilmore A, Klinowska T, Oliver J, Valentijn AJ, Brown R, Ross A, MacGregor G, Hickman JA, Streuli CH** (1999)

Developmental regulation of bcl-2 family protein expression in the involuting mammary gland

J Cell Sci **112**:1771-1783

**Mielke H** (1986)

Physiologie der Laktation. In: Euterkrankheiten. Wendt K, Mielke H, Fuchs H, Hrsg. Verlag Fischer, Jena. 46-120

**Minami M, Inoue M, Wei S, Takeda K, Matsumoto M, Kishimoto T, Akira S** (1996)

STAT-3 activation is a critical step in gp-mediated terminal differentiation and growth arrest of a myeloid cell line

Proc Natl Acad Sci USA **93**:3963-3966

**Miyashita T, Reed JC** (1995)

Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene

Cell **80**:293-299

**Mol JA, Selman PJ, Sprang EP, van Neck JW, Oosterlaken-Dijksterhuis** (1997)

The role of progestins, insulin-like growth factor (IGF) and IGF-binding proteins in the normal and neoplastic mammary gland of the bitch: A review

J Reprod Fertil Suppl **51**:339-344

**Mosimann W** (1949)

Zur Anatomie der Rindermilchdrüse und über die Morphologie ihrer sezernierenden Teile

Acta anat **8**:347-378

**Mosimann W, Kohler T** (1990)

Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie der Haussäugetiere

Paul Parey Verlag, Hamburg, Berlin:78-97

**Mosselman S, Polman J, Dijkema R** (1996)

ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor

FEBS Lett **392**:49-53

**Motyl T, Grzelkowska K, Zimowska W** (1998)

Expression of bcl-2 and bax in TGF- $\beta$ 1 induced apoptosis of L1210 leukemic cells

Eur J Cell Biol **75**:367-374

**Motyl T, Gajkowska B, Wojewodzka U, Wareski P, Rekiel A, Ploszaj T** (2001)

Expression of apoptosis-related proteins in involuting mammary gland of sow

Comp Biochem Physiol (B) Biochem Mol Biol **128**:635-646

**Nass SJ, Li M, Amundadottir LT, Furth PA, Dickson RB** (1996)

Role for Bcl-x<sub>L</sub> in the regulation of apoptosis by EGF and TGF $\beta$ 1 in c-myc overexpressing mammary epithelial cells

Biochem Biophys Res Commun **227**:248-256

**Newman SL, Henson JE, Henson PM** (1982)

Phagocytosis of senescent neutrophils by human monocyte-derived macrophages and rabbit inflammatory macrophages

J Exp Med **156**:430-442

**Nguyen MT, Lue H, Kleemann R, Thiele M, Tolle G, Finkelmeier D, Wagner E, Braun A, Bernhagen J** (2003)

The cytokine macrophage migration inhibitory factor reduces pro-oxidative stress-induced apoptosis

J Immunol **170**:3337-3347

**Nicholson DW, Thornberry NA** (1997)

Caspases: Killer proteases

Trends Biochem Sci **22**:299-306

**Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ** (1993)

Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death

Cell **74**:609-619

**Orth K, Chinnaiyan AM, Garg M, Froelich CJ, Dixit VM** (1996)

The CED-3/ICE-like protease Mch2 is activated during apoptosis and cleaves the death substrate Lamin A

J Biol Chem **271**:16443-16446

**Paape M, Sinha Y** (1971)

Nucleic acid and collagen content of mammary glands between 30 and 80 days of age in normal and ovariectomized rats and during pregnancy

J Dairy Sci **54**:1068-1074

**Park YH, Fox LK, Hamilton MJ, Davis WC** (1992)

Bovine mononuclear leukocyte subpopulations in peripheral blood and mammary gland secretion

J Dairy Sci **75**:998-1006

**Peterson CM** (2000)

Estrogen and progesterone receptors: an overview from the year 2000

J Soc Gyn Inv **7**:S3-S7

**Phillips ID, Becks GP, Logan A, Wang JF, Smith C, Hill DJ** (1994)

Altered expression of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and IGF binding proteins during rat thyroid hyperplasia and involution

Growth Factors **10**:207-222

**Philp JC, Burdon TG, Watson CJ** (1996)

Differential activation of STATs 3 and 5 during mammary gland development

FEBS Lett **396**:77-80

**Plath A** (1996)

Zur Expression von Wachstumsfaktoren in der Rindermilchdrüse

Diss. med. vet. Universität München

**Plath A, Einspanier R, Peters F, Sinowatz F, Schams D** (1997)

Expression of transforming growth factor alpha and beta-1 messenger RNA in the bovine mammary gland during different stages of development and lactation

J Endocrinol **155**:501-511

**Platt N, Suzuki H, Kurihara Y, Kodama T, Gordon S** (1996)

Role for the class A macrophage scavenger reporter in the phagocytosis of apoptotic thymocytes in vitro

Proc Natl Acad Sci USA **93**:12456-12460

**Pullan S, Wilson J, Metcalfe A, Edwards GE, Goberdhan N, Tilly J, Hickman JA, Dive C, Streuli CH** (1996)

Requirement of basement membrane for the suppression of programmed cell death in mammary epithelium

J Cell Sci **109**:631-642



**Quarrie LH, Addey CVP, Wilde CJ (1995)**

Apoptosis in lactating and involuting mouse mammary tissue demonstrated by nick-end DNA labelling

Cell Tissue Res **281**:413-419

**Rainwater R, Parks D, Anderson ME, Tegtmeyer P, Mann K (1995)**

Role of cysteine residues in regulation of p53 function

Mol Cell Biol **15**:3892

**Ren Y, Savill J (1998)**

Apoptosis: The importance of being eaten

Cell Death Differ **5**:563-568

**Romeis B (1989)**

Mikroskopische Technik. Böck P (Hrsg). 3. Auflage

Verlag Urban & Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore

**Rosfjord E, Dickson R (1999)**

Growth Factors, apoptosis, and survival of mammary epithelial cells

J Mammary Gland Biology and Neoplasia, **4**:229-237

**Rubeli O (1913)**

Besonderheiten im Ausführungsgangsystem der Milchdrüsen des Rindes

Mittlg. Nat.forsch. Ges. Bern

**Rubeli O (1914)**

Bau des Kuheuters

Verlag Art. Inst. Orell Füssli, Zürich

**Rudland PS, Hughes CM (1989)**

Immunological identification of cell types in human mammary gland: variations in cellular markers are dependent on glandular topography and differentiation

J Histochem Cytochem **37**:1087-1100

**Russo I, Ireland M, Isenberg W, Russo J (1976)**

Breast tissue cell morphology

Proc Electron Microsc Soc Am **34**:144-147

**Russo J, Ao X, Grill C, Russo IH (1999)**

Pattern of distribution of cells positive for estrogen receptors and progesterone receptor in relation to proliferating cells in the mammary gland

Breast Can Res Treat **53**:217-227

**Ryeom SW, Silverstein RL, Scotto A, Sparrow JR (1996)**

Binding of anionic phospholipids to retinal pigment epithelium may be mediated by the scavenger receptor CD36

J Biol Chem **271**:20536-20539

**Saji S, Sakaguchi H, Andersson S, Warner M, Gustafsson JA (2001)**

Quantitative analysis of estrogen receptor proteins in rat mammary gland

Endocrinology **142**:3177-3186

**Savill J (1997)**

Recognition and phagocytosis of cell undergoing apoptosis

Br Med Bull **53**:491-508

**Savill JS, Wyllie AJ, Henson JE, Walport MJ, Henson PM, Haslett C (1989)**

Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation

J Clin Invest **83**:865-875

**Savill J, Hogg N, Ren Y, Haslett C (1992)**

Thrombospondin cooperates with CD36 and the vitronectin receptor in macrophage recognition of neutrophils undergoing apoptosis

J Clin Invest **90**:1513-1522

**Schams D, Kohlenberg S, Amselgruber W, Berisha B, Pfaffl MW, Sinowatz F**  
(2003)

Expression and localisation of oestrogen and progesterone receptors in the bovine mammary gland during development, function and involution

J Endocrinology **177**:305-317

**Schrader WT, Birnbaumer ME, Hughes MR, Weigel NL, Grody WW, O'Malley BW** (1981)

Studies on the structure and function of the chicken progesterone receptor

Recent Prog Horm Res **37**:583-633

**Schulz J, Beuche W, Bergmann A** (1974)

Zur Sicherung der Eutergesundheit im Trockensteherstadium

Tierzucht, Berlin **28**:30-33

**Seiferle E** (1949)

Neuere Erkenntnisse über Bau und Funktion der Milchdrüse der Kuh

Schriften der Schweiz. Vereinigung für Tierzucht, Euter und Milchleistung. Banteli AG, Bern-Bümplitz

**Selbert S, Bentley DJ, Melton DW, Rannie D, Lourenco P, Watson CJ, Clarke AR**  
(1998)

Efficient BLG-Cre mediated gene deletion in the mammary gland

Transgenic Res **7**:387-396

**Sheffield LG, Kotolski LC** (1992)

Prolactin inhibits programmed cell death during mammary gland involution

FASEB J **6**:A1184

**Sheikholeslam-Zadeh R, Decaestecker C, Delbrouck C, Danguy A, Salmon I, Zick Y, Kaltner H, Hassid S, Gabius HJ, Kiss R, Choufani G** (2001)

The levels of expression of galectin-3, but not of galectin-1 and galectin-8, correlate with apoptosis in human cholesteatomas

Laryngoscope **111**:1042-1047

**Shyamala G, Haslam SZ (1980)**

Estrogen and progesterone receptors in normal mammary gland during different functional states

Perspectives on steroid receptor research, New York, Raven: 193-216

**Silberstein G, Daniel C (1987)**

Reversible inhibition of mammary gland growth by transforming growth factor  $\beta$   
Science **237**:291-293

**Silberstein G, Daniel C (1987)**

Postnatal development of the rodent mammary gland. In: The mammary gland, development, regulation and function. Neville M, Daniel C, Hrsg.

Plenum Press, 3-36

**Simon M, Juhasz I, Herlyn M, Hunyadi J (1996)**

Thrombospondin receptor (CD36) expression of human keratinocytes during wound healing in a SCID mouse/human skin repair model

J Dermatol **23**:305-309

**Sinha Y, Tucker H (1966)**

Mammary gland growth of rats between 10 and 100 days of age

Am J Physiol **210**:601-605

**Sinha Y, Tucker H (1969)**

Mammary development and pituitary prolactin level of heifers from birth through puberty and during the estrous cycle

J Dairy Sci **52**:507-512

**Sinowatz F, Schams D, Kolle S, Plath A, Lincoln D, Waters M (2000)**

Cellular localisation of GH receptor in the bovine mammary gland during mammogenesis, lactation and involution

J Endocrinol **166**:503-510

**Sivaraman L, Hilsenbeck SG, Zhong L, Gay J, Conneely OM, Medina D, O'Malley BW (2001)**

Early exposure of the rat mammary gland to estrogen and progesterone blocks co-localisation of estrogen receptor expression and proliferation

**Smith KL, Todhunter DA (1982)**

The physiology of mammary glands during the dry period and the relationship to infection

Proc Ann Mrg Natl Mast Counc **21**:87-100

**Sordillo L, Nickerson S (1988)**

Morphologic changes in the bovine mammary gland during involution and lactogenesis

Am J Vet Res **49**:1112-1120

**Sorensen A, Knight CH (1997)**

Restoration of lactation in mice after litter removal for various lengths of time

J Reprod Fertil, Abstract series **19**:46

**Stefanon B, Colitti M, Gabai G, Knight CH, Wilde CJ (2002)**

Mammary apoptosis and lactation persistency in dairy animals

J Dairy Res **69**:37-52

**Strange R, Li F, Saurer S, Burkhardt A, Friis R (1992)**

Apoptotic cell death and tissue remodeling during mouse mammary gland involution

Development **115**:49-58

**Strasser A, O'Connor L, Dixit VM (2000)**

Apoptosis signaling

Annu Rev Biochem **69**:217-245

**Streuli CH, Edwards GM, Delcommenne M, Whitelaw CBA, Burdon TG, Schindler C, Watson CJ (1995)**

STAT-5 as a target for regulation by extracellular-matrix  
J Biol Chem **270**:21639-21644

**Sutton H, Suhrbier K (1967)**

The estrous cycle and DNA synthesis in the mammary gland  
Argonne natn Lab US Atomic Energy Commn Annual Rep:157-158

**Suurmeijer AJH, van der Wijk J, van Veldhuisen DJ, Yang F, Cole GM (1999)**

Fractin immunostaining for the detection of apoptotic cells and apoptotic bodies in formalin-fixed and paraffin-embedded tissue  
Lab Invest **79**:27-29

**Taylor BC, Dellinger JD, Cullor JS, Scott JL (1994)**

Bovine milk lymphocytes display the phenotype of memory T cells and are predominantly CD8<sup>+</sup>  
Cell Immunol **156**:245-253

**Teglund S, Mckay C, Schütz E, VanDeursen JM, Stravopodis D, Wang DM, Brown M, Bodner S, Grosveld G, Ihle JN (1998)**

STAT-5a and STAT-5b proteins have essential and nonessential, or redundant, roles in cytokine responses  
Cell **93**:841-850

**Teter KP, Holloway DC, Sandusky GE (1995)**

Assessment of PCNA (19A2) and Ki-67 (MIB-1) cell proliferation markers in formalin fixed tissues  
J Histotechnol **18**:99-104

**Thornberry NA, Lazebnik Y (1998)**

Caspases: Enemies within  
Science **281**:1312-1316

**Toft D, Gorski J (1966)**

A receptor molecule for estrogens: isolation from the rat uterus and preliminary characterization

Proc Natl Acad Sci **55**:1574-1581

**Tonner E, Quarrie L, Travers MT, Barber M, Logan A, Wilde CJ, Flint DJ (1995)**

Does an IGF-binding protein (IGFBP) present in involuting rat mammary gland regulate apoptosis ?

Prog Growth Factor Res **6**:409-414

**Tonner E, Barber MC, Travers MT, Logan A, Flint DJ (1997)**

Hormonal control of insulin-like growth factor binding protein 5 production in the involuting mammary gland of the rat

Endocrinology **138**:5101-5107

**Tonner E, Allan G, Webster J, Withelaw CBA, Flint DJ (1999)**

Insulin-like growth factor binding protein-5 (IGFBP-5) potentially regulates programmed cell death and plasminogen activation in the mammary gland

Proc Int Con Biol Mamm Gland S3.4, 18

**Tora L, Gronemeyer H, Turcotte B, Gaub MP, Chambon P (1988)**

The N-terminal region of the chicken progesterone receptor specifies target gene activation

Nature **333**:185-188

**Travers MT, Barber MC, Tonner E, Quarrie L, Wilde CJ, Flint DJ (1996)**

The role of prolactin and growth hormone in the regulation of casein gene expression and mammary cell survival: Relationships to milk synthesis and secretion

Endocrinology **137**:1530-1539

**Tremblay GB, Tremblay A, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Labrie F, Giguere V (1997)**

Cloning, chromosomal localization, and functional analysis of the murine estrogen receptor beta

Mol Endocrinol **11**:353-365

**VanAntwerp DJ, Martin SJ, Verma IM, Green DR (1998)**

Inhibition of TNF-induced apoptosis by NF-kappa B

Trends Cell Biol **8**:107-111

**Veis DJ, Sorenson CM, Shutter JR, Korsmeyer SJ (1993)**

Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair

Cell **75**:229-240

**Walker NI, Bennett RE, Kerr JR (1989)**

Cell death by apoptosis during involution of the lactating breast in mice and rats

Am J Anat **185**:19-32

**Wang PY, Kitchens RL, Munford RS (1998)**

Phosphatidylinositides bind to plasma membrane CD14 and can prevent monocyte activation by bacterial lipopolysaccharide

J Biol Chem **273**:24309-24313

**Wareski P, Motyl T, Ryniewicz Z, Orzechowski A, Gajkowska B, Wojewodzka U, Ploszaj T (2001)**

Expression of apoptosis-related proteins in mammary gland of goat

Small Rum Res **40**:279-289

**Weaver V, Bissell M (1999)**

Functional culture models to study mechanisms governing apoptosis in normal and malignant mammary epithelial cells

J Mammary Gland Biol and Neoplasia **4**:193-201



**Wen DX, Xu YF, Mais DE, Goldman ME, McDonnell DP (1994)**

The A and B isoforms of the human progesterone receptor operate through distinct signaling pathways within target cells

Mol Cell Biol **14**:8356-8364

**Wilde CJ, Henderson AJ, Knight CH, Blatchford DR, Faulkner A, Vernon RG (1987)**

Effects of long-term thrice-daily milking on mammary enzyme activity, cell population and milk yield in the goat

J Animal Sci **64**:533-539

**Wilde CJ, Addey CVP, Li P, Fernig DG (1997)**

Programmed cell death in bovine mammary tissue during lactation and involution

Exp Physiol **82**:943-953

**Woodward TL, Beal WE, Akers RM (1993)**

Cell interactions in initiation of mammary epithelial proliferation by oestradiol and progesterone in prepubertal heifers

J Endocrinol **136**:149-158

**Wolter KG, Hsu YT, Smith CL, Nechushtan A, Xi XG, Youle RJ (1997)**

Movement of bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis

J Cell Biol **139**:1281-1292

**Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR (1980)**

Cell death: The significance of apoptosis

Int Rev Cytol **68**:251-306

**Xue D, Horvitz HR (1997)**

Caenorhabditis elegans CED-9 protein is a bifunctional cell-death inhibitor

Nature **390**:305-307

**Yang CH, Murti A, Pfeffer LM (1998)**

Stat3 complements defects in an interferon-resistant cell line: Evidence for an essential role for Stat3 in interferon signaling and biological activities

Proc Natl Acad Sci USA **95**:5568-5572

**Yang RY, Liu FT (2003)**

Galectins in cell growth and apoptosis

Cell Mol Life Sci **60**:267-276

**Yu F, Finley RL, Raz A, Kim HRC (2002)**

Galectin-3 translocates to the perinuclear membranes and inhibits cytochrome c release from the mitochondria

J Biol Chem **277**:15819-15827

**Zamoyska R (1998)**

CD4 and CD8: modulators of T cell receptor recognition of antigen and of immune responses?

Curr Opin Immunol **10**:82-86

**Zhang H, Heim J, Meyhack B (1998)**

Redistribution of bax from cytosol to membranes is induced by apoptotic stimuli and is an early step in the apoptotic pathway

Biochem Biophys Res Commun **251**:454-459

**Ziegler H, Mosimann W (1960)**

Anatomie und Physiologie der Rindermilchdrüse

Parey, Berlin, Hamburg

**Zwart SG (1911)**

Beiträge zur Anatomie und Physiologie der Milchdrüse des Rindes

Inaug.-Diss. med. vet. Bern

## 8.2 Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
Aa.	Arteriae
ABC	Avidin-Biotin-Komplex
AIF	apoptosis inducing factor
a.p.	ante partum
APAAP	alkaline phosphatase-anti-alkaline phosphatase
Aqua dest.	Aqua destillata
ATP	Adenosintriphosphat
bFGF	basic fibroblast growth factor
BH	Bcl-2-Homologieregion
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
Ca <sup>2+</sup>	Kalziumionen
CAD	caspase-activated deoxyribonuclease
CARD	caspase recruitment domain
CD	cluster of differentiation
cm	Zentimeter
C-Terminal	carboxy-terminal
d	Tag
DAB	Diaminobenzidin
DAPI	Diamidinphenylindol
DFV	Deutsches Fleckvieh
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGF	epidermal growth factor
ELISA	enzyme-linked immuno sorbent assay
ER	Östrogenrezeptor
et al.	et alii
Fa.	Firma
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Gramm
Gal	Galektin

GH	growth hormone
Gll.	Glandulae
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
G <sub>0</sub> -Phase	gap null-Phase des Zellzyklus
G <sub>1</sub> -Phase	erste gap Phase des Zellzyklus
G <sub>2</sub> -Phase	zweite gap Phase des Zellzyklus
h	Stunde
H <sup>+</sup>	Wasserstoffionen/Protonen
HE	Hämatoxilin-Eosin
Hrsg.	Herausgeber
I <sup>CAD</sup>	inhibitor of caspase-activated deoxyribonuclease
IGF	insulin-like growth factor
IGFBP	insulin-like growth factor binding protein
IgG	Immunglobulin G
I-κB	inhibitor of nuclear factor-kappa-b
IL	Interleukin
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
Ki-67	Kiel 67
l	Liter
Ln.	Lymphonodus
Lnn.	Lymphonodi
M.	Musculus
MHC	major histocompatibility complex
MIF	macrophage migration inhibitory factor
min.	Minute
MJ	Megajoule
mm	Millimeter
ml	Milliliter
M-Phase	Mitosephase des Zellzyklus
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer

N.	Nervus
NF-κB	nuclear factor-kappa-b
NIK	nuclear factor-kappa-b inducing kinase
N-Terminal	amino-terminal
PBS	phosphate buffered saline
pH	potentia hydrogenii
PR	Progesteronrezeptor
PS	Phosphatidylserin
R.	Ramus
Rr.	Rami
RT	Raumtemperatur
sog.	sogenannt
S-Phase	Synthesephase des Zellzyklus
SSL	Scheitel-Steiß-Länge
STAT	signal transducer and activator of transcription
Std.	Stunde
Tab.	Tabelle
TEB	terminal end bud
TGF	transforming growth factor
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TUNEL	terminal deoxynucleotide transferase-mediated deoxyuridine nick end labelling
u.a.	unter anderem
V.	Vena
Vv.	Venae
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

## 9. Anhang

### I. Fixierlösungen für die Lichtmikroskopie

#### **Bouin Lösung**

750 ml Pikrinsäure (gesättigt, filtriert)

250 ml 35%iges Formalin

50 ml Eisessig

#### **Methanol-Eisessig Lösung**

Methanol und Eisessig im Verhältnis 2:1

### II. Lösungen für die Lichtmikroskopie

#### - **Hämalaun-Eosin-Färbung**

##### **Hämalaun**

2 g Hämatoxylin in 2000 ml Aqua dest.

0,4 g Natriumjodat

100 g Kalialaun (chemisch rein)

100 g Chloralhydrat

2 g kristalline Zitronensäure

##### **Eosin**

Stammlösung (1%ig): 2 g Eosin

198 ml Aqua dest.

Einige Tropfen Formol zur Haltbarkeit

Verdünnung: 600 ml Aqua dest.

60 ml Eosin-Stammlösung (1%ig)

8 Tropfen Eisessig

- **Resorcinfuchsin-Kernechtrot-Färbung nach Weigert**

Lösung A:                    2 g Fuchsin  
                                  4 g Resorcin (chemisch rein)  
                                  200 ml Aqua dest.

Lösung B :                    8 g Eisenchlorid  
                                  40 ml Aqua dest.

- **PAS-Reaktion nach McManus (periodic-acid-Schiff reaction)**

Perjodsäure  
Fuchsin-schweflige Säure (Schiff'sches Reagenz)  
Schwefeldioxidwasser  
Hämalaun

- **Trichromfärbung nach Masson und Goldner**

Eisenhämatoxylin nach Weigert  
Azophloxin  
Phosphormolybdänsäure  
Lichtgrün  
Essigsäure (1%ig)

## 10. Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dr. Sinowatz danke ich für die Überlassung des Themas, die wissenschaftliche Betreuung und die Unterstützung bei der Durchführung der Untersuchungen.

Frau Rußmeier danke ich für die Geduld und Hilfe bei der Einführung in die Grundkenntnisse der Anfertigung histologischer Schnitte und Färbungen sowie für die Zusammenarbeit bei der Durchführung der immunhistochemischen Färbungen.

Bei Frau Zahn bedanke ich mich ebenfalls für die Unterstützung bei der Anfertigung histologischer Schnitte.

Ein Dankeschön gilt auch der Frau Boie, deren Hilfe bei der Durchführung des TUNEL unerlässlich war.

Frau Neumüller verdient besonderen Dank für ihre uneingeschränkte Hilfsbereitschaft.

Ebenso möchte ich Frau Vermehren für ihre Hilfe danken.

Bei Herrn Baidl möchte ich mich für die Hilfe bei der Bewältigung IT-verwandter Probleme bedanken.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts sowie den Promotionskolleginnen und -kollegen danke ich für das stets angenehme Arbeitsklima.

Ein sehr herzliches Dankeschön geht an meine Freundin Frau Dr. Leitner, die mich immer zu motivieren wusste.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern, deren Unterstützung mir diese Ausbildung überhaupt ermöglicht hat. Meinen Brüdern Oliver und Jesse danke ich ebenfalls für ihre Unterstützung in allen Dingen.



## **11. Lebenslauf**

### **Persönliche Daten**

Name: Joseph Alexis Meissner  
Geburtsdatum: 12. Juni 1975  
Geburtsort: Liverpool, GB  
Mutter: Jane Meissner, geb. Slater  
Vater: Wolfgang Meissner

### **Schulbildung**

1981-1983 Grundschule West in Fürstenfeldbruck  
1983-1987 Hyderabad-International-School in  
Hyderabad, Indien  
1987-1989 Trifelsgymnasium in Annweiler a. Trifels  
1989-1995 Luitpold-Gymnasium in München

### **Wehrdienst**

1995-1996 Sanitätslehrbatallion 851 in München

### **Universitätsausbildung**

WS 1996/97-SS 1997 Jurastudium, LMU München  
WS 1997/98-WS 2002/03 Studium der Veterinärmedizin, LMU München  
Ab April 2003 Promotionsstudium am Institut für Tieranatomie II

### **Berufsausübung**

Seit August 2005 Assistenzarzt in Arnstorf, Niederbayern