

Untersuchungen zu endogenen antimikrobiellen Peptiden in der bovinen Milchdrüse

von Johanna Krenitz

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

München

Untersuchungen zu endogenen antimikrobiellen Peptiden in der bovinen Milchdrüse

von Johanna Krenitz

aus Gräfelfing

München 2018

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

Lehrstuhl für Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung

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

Mitbetreuung durch: Dr. habil. Wolfram Petzl

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph. D

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Holm Zerbe

Korreferent/en: Prof. Dr. rer. nat Frank Ebel

Tag der Promotion: 10. Februar 2018

Widmung

Hannes, Frieda
und meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	4
1	Die Mastitis des Rindes	4
1.1	Bedeutung	4
1.2	Pathogenese	5
1.3	Therapie	6
2	Abwehrmechanismen der bovinen Milchdrüse.....	9
2.1	Zelluläre Faktoren.....	9
2.2	lösliche Faktoren.....	10
3	Antimikrobielle Peptide (AMP)	12
3.1	Cathelicidine	13
3.2	Indolicidine	15
3.3	Defensine	15
3.4	S100-Proteine	17
3.5	Antimikrobiell wirksame Chemokine.....	20
4	Epigenetische Mechanismen bei der Infektionsabwehr	24
4.1	Das Konzept der Endotoxin-Toleranz	25
4.2	Epigenetische Regulation bei der bovinen Mastitis.....	25
III.	MATERIAL UND METHODEN	27
1	Geräte.....	27
2	Material.....	29

2.1 Verbrauchsmaterial.....	29
2.2 Reagenzien.....	32
2.3 Versuchstiere	34
2.4 Kulturmedien, Puffer und Lösungen	34
2.5 Modellpathogene	40
2.6 Reagenzien für die molekularbiologischen Untersuchungen	40
2.7 Primer	41
3 Methoden	42
3.1 Kultivierung einer immortalisierten Milchdrüsenepithelzelllinie (MAC-T) <i>in vitro</i>	42
3.2 Stimulation einer immortalisierten Milchdrüsenepithelzelllinie (MAC-T) <i>in vitro</i>	43
3.3 Gewinnung von venösem Blut.....	44
3.4 Bestimmung der chemotaktischen Wirkung von Zellkulturüberständen der MAC-T in der Transmigrationskammer	45
3.5 Funktionelle Untersuchungen zur antimikrobiellen Aktivität von Zellkulturüberständen	48
3.6 Kultivierung und Präparation der Modellpathogene <i>in vitro</i>	49
3.7 Methoden zur Ermittlung antimikrobieller Aktivität.....	52
3.8 Mastitis-Infektionsversuch	56
3.9 Real Time quantitative Polymerase Kettenreaktion (RT-qPCR).....	57
3.10 Statistische Auswertung.....	63
IV. ERGEBNISSE	65

1	Methodische Vorarbeiten	65
1.1	Untersuchungen zum Wachstum von <i>E. coli</i> ₁₃₀₃ , <i>S. aureus</i> ₁₀₂₇ und <i>Sc. uberis</i> _{O140J} <i>in vitro</i>	65
1.2	Vorarbeiten zur Verwendung einer immortalisierten Milchdrüsenepithelzelle (MAC-T) zur Untersuchung einer Pathogen-vermittelten Induktion von Chemokinen.....	69
1.3	Vorarbeiten zur Verwendung einer immortalisierten Milchdrüsenepithelzelle (MAC-T) als Syntheseort endogener antimikrobieller Peptide	71
1.4	Etablierung einer durchflusszytometrischen Methode zur Bestimmung lebender und abgetöteter Bakterien <i>in vitro</i>	72
2	Antimikrobielle Aktivität ausgewählter Peptide und neutrophiler Granulozyten gegenüber Mastitiserregern.....	74
2.1	Lingual antimicrobial Peptide (LAP)	74
2.2	Indolicidin (Cathelicidin 4, CATHL4)	77
2.3	Polymorphkernige Neutrophile Granulozyten (PMN)	79
3	Einfluss einer intramammären LPS-Behandlung auf die Expression ausgesuchter antimikrobieller Peptide <i>in vivo</i>.....	83
3.1	Lingual Antimicrobial Peptide (LAP)	83
3.2	Calgranulin (S100A9).....	84
3.3	β-Chemokin-Ligand-20 (CCL20; MIP-3-Alpha)	85
3.4	Einfluss einer intramammären LPS-Vorbehandlung auf die Keimzahl in der Milch nachfolgender experimenteller Infektion mit <i>E. coli</i>	87
V.	DISKUSSION	88
1	Wachstumsverhalten eingesetzter Mastitis-Pathogene <i>in vitro</i>.....	90
2	Wirksamkeit antimikrobieller Peptide gegenüber Mastitis-Pathogenen <i>in vitro</i>	

.....	91
3 Neutrophile Granulozyten zeigen antimikrobielle Wirksamkeit gegenüber Mastitis-Pathogenen <i>in vitro</i>.....	94
4 Induktion antimikrobieller Peptide in mammärem Gewebe bei Pathogen-spezifischer Mastitis.....	96
5 Schlussbetrachtung	97
VI. ZUSAMMENFASSUNG	99
VII. SUMMARY.....	102
VIII. LITERATURVERZEICHNIS	105
IX. DANKSAGUNG	116

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

C°	Grad Celsius
%	Prozent
€	Euro
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
AMP	Antimikrobielles Peptide
<i>Aqua dest.</i>	Aqua destillata (destilliertes Wasser)
BAC	Bactenecin
BHI	Brain Hearth Infusion
BMAP	Bovine myeloid antimicrobial peptide
Bp	Base pairs (Basenpaare)
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	Beziehungsweise
C	Cysteinreste
ca.	Circa (lateinisch: etwa, ungefähr)
CC	Cysteinreste mit direkter Verbindung
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	complementary DNA
CFU	Colony forming unit (Koloniebildende Einheit)
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
CpG- Motif	Cytosin-Phosphat-Guanin-Motif
CSF	Colony stimulation factor
C _t	Cycle threshold
CXC	zwei Cysteinmoleküle werden von beliebiger Aminosäure (X) getrennt
CXCR	Chemokinrezeptor
d.h.	das heißt
DAMP	Danger associated molecular pattern
DMEM-F12	Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)/Ham's Nutrient Mixture F12
DMSO	Dimethylsulfoxid
DANN	Desoxyribonucleinsäure
DNMT	DNA methyltransferasen

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	ethylendiamine-tetraacetic acid (Ethyldiamintetraacetat)
EF-Hand Motive	Helix-Loop-Helix-Motiv von Aminosäuren innerhalb eines Proteins
EN-RAGE	extracellular newly identified RAGE binding protein
ERL-Tripeptidstrukturmotiv	je nach Anwesenheit der Aminosäuren Glutamat-Leucin-Arginin; ERL+ oder ERL-
et.al.	et alii (lateinisch: und andere)
etc.	et cetera (lateinisch: und weiteres)
FKS	Fetales Kälberserum
FL1; -2; -3	Messkanäle des Durchflusszytometers für emittierte Fluoreszenz FL1 = Grünfluoreszenz, 530 ± 15 nm FL2 = Orange fluoreszenz, 585 ± 21 nm FL3 = Rotfluoreszenz, > 650 nm
For	Forward (Vorwärts-Primer)
FSC	Forward Scatter (Vorwärtsstreuung)
G	Gramm
G	Gauge
GH	Growth hormon
H	Hora (lateinisch: Stunde)
H ₂ O	Wasser
HAT	Histonacetyltransferasen
hCAP-18	humanes Cathelicidin
HCl	Salzsäure
HDAC	Histondeacetylasen
HDM	Histondemethylasen
HMT	Histonmethyltransferasen
Hz	Hertz
ICAM	intercellular adhesion molecule (interzelluläres Adhäsionsmolekül)
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IGF	insulin-like-growth-factor
IL	Interleukin
IVM	In vitro Maturation
kB	Kilo Basen
KCl	Kaliumchlorid
kD	Kilodalton (atomare Masseneinheit)

Kg	Kilogramm
KNS	Koagulase negative Staphylokokken
L	Liter
LAP	Lingual antimicrobial peptide
LB	Luria broth
LCS	Large calf syndrom
LL-37	Humanes Cathelicidin
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
LPS	Lipopolysaccharid
LTA	Lipoteichonsäure
M	milli (mal 10^{-3})
MAC-T	Mammary Alveolar Cell-Large T antigen
MEC	Milchdrüsenepithelzelle
MHC	Major Histocompatibility Complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
Min	Minuten
mL	Milliliter (10^{-3} L)
MLST	Multilocus- Sequence-Typing
Mm	Millimeter
Mmol	Millimol (10^{-3} mol)
Mol	Mol
mRNA	messengerRNA
MRP	myeloid related Protein
N	Nano (mal 10^{-9})
NaCl	Natriumchlorid
NF κ B	nuclear factor-kappa B (Transkriptionsfaktor)
Nm	Nanometer
Nmol	Nanomol (10^{-9} mol)
OD	Optische Dichte
P=	Irrtumswahrscheinlichkeit bei der Analyse der Ähnlichkeit zweier Datengruppen
PAMP	Pathogen associated molecular pattern (Molekulare Muster von Erregern)
PBS	Phosphate Buffered Saline (phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerasekettenreaktion)
PEM	Lösung aus PBS und EDTA

Pg	Picogramm (10^{-12} g)
PGN	Peptidoglykan
pH	potentia hydrogenii (lateinisch: Wasserstoffionen-Exponent)
PJ	Propidiumjodid
PMN	Polymorphonuclear Neutrophils (polymorphkernige neutrophile Granulozyten)
PRR	Pathogen Recognition Receptor (Pathogen-Erkennungsrezeptor)
qRT-PCR	quantitative real-time Polymerase Chain Reaction (quantitative Echtzeit Polymerasekettenreaktion)
R=	Korrelationseffizient
RAGE	multiligand receptor for advanced glycation end products
RANTES	regulated on activation normal T cell expressed and secreted
Rev	Reverse (Rückwärts- Primer)
rhIL-8	rekombinantes humanes Interleukin-8
RNA	Ribonukleinsäure
Rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Reverse Transkription
S	Sekunden
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
S100A12	Calgranulin C; extracellular newly identified RAGE binding protein, EN-RAGE
S100A8	Calgranulin A; myeloid-related protein 8, MRP8
S100A9	Calgranulin B; MRP14
<i>Sc.</i>	<i>Streptococcus</i>
<i>Sc. uberis</i>	<i>Streptococcus uberis</i>
SCC	Somatic Cell Count (Somatische Zellen in der Milch)
SSC	Side Scatter (Seitwärtsstreulicht), Messparameter des FACScan®
sCD14	Soluble CD14
SCFA	Short-chain-fatty-acid
SCNT	Somatischer Zellkerntransfer
SD	Standardabweichung
Sog.	sogenannte
<i>Spec</i>	Species
SV40	Simian Virus 40

Tab.	Tabelle
TBS	Tris Buffer Saline (Tris gepufferte Kochsalzlösung)
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TSA	Trichostatin
TSB	Trypton Soy Broth
US	United States
VCAM	vascular cell adhesion molecule (vaskuläres Zelladhäsionsmolekül)
VRB-Agar	Violett-Red-Bile-Agar (Kristallviolett-Galle-Laktose-Agar)
x g	multipliziert mit der Gravitationsbeschleunigung (9,81 m/s ²)
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil
μ	mikro (mal 10 ⁻⁶)
μg	Mikrogramm (10 ⁻⁶ g)
μL	Mikroliter (10 ⁻⁶ L)
μm	Mikrometer (10 ⁻⁶ m)

I. EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG

Die Mastitis stellt eine der am weitest verbreiteten und kostenintensivsten Erkrankungen in Milchviehherden dar. Etwa 30 % der Milchkühe erkranken jährlich an einer Mastitis. Die meisten Mastitiden werden durch intramammäre bakterielle Infektionen verursacht. Als bedeutendste bakterielle Mastitiserreger gelten nach wie vor *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), welcher vor allem schwer therapierbare subklinische Mastitiden verursacht und *Escherichia coli* (*E. coli*) als Hauptverursacher schwerwiegender klinischer Mastitiden. Innerhalb der letzten Jahrzehnte hat der Umweltkeim *Streptococcus uberis* (*Sc. uberis*) darüber hinaus eine große Bedeutung als Verursacher sowohl klinischer als auch subklinischer Mastitiden gewonnen.

Die derzeitigen Praktiken zur Mastitis-Prophylaxe basieren überwiegend auf einer optimierten Melkhygiene, der Reduzierung des Keimdrucks in der Umwelt und dem Einsatz antibiotischer Trockensteller. Zur Therapie bestehender Euterentzündungen wird derzeit überwiegend eine Behandlung mit Antibiotika durchgeführt. Hieraus ergibt sich, dass bis zu 80 % des Antibiotika-Einsatzes bei Milchkühen auf Therapie und Prophylaxe von Mastitiden zurückgehen. Dieser hohe Antibiotika-Einsatz wird hinsichtlich eines Rückstandsrisikos im Lebensmittel Milch und der Förderung von Resistenzen zunehmend kritisch bewertet.

Antimikrobielle Peptide (AMP) sind wesentliche Komponenten des angeborenen Immunsystems. Ihr Potential, Mikroorganismen zu bekämpfen, hat ihnen auch die Bezeichnung „natürliche Antibiotika“ verliehen. Die AMP agieren überwiegend sowohl gegen grampositive als auch gramnegative Bakterien und haben über Jahrmillionen keine erwähnenswerte Resistenzbildung bei Prokaryoten hervorgerufen. Neben der induzierten Expression als Antwort auf Pathogene kann die Expression auch konstitutiv erfolgen. Letzteres gilt vor allem für „Grenzgewebe“, welche ständiger mikrobieller Besiedlung und möglicher Invasion von Pathogenen ausgesetzt sind. Hiervon sind vor allem Haut- und Schleimhautoberflächen betroffen. Die bovine Milchdrüse hat sich entwicklungsgeschichtlich aus einer Hautdrüse entwickelt und exprimiert nachweislich eine große Anzahl an AMP. Auch immigrierende Entzündungszellen im Euter und der Milch können nach Erregerkontakt eine Vielzahl an AMP freisetzen. Dies gilt als ein Schlüsselme-

chanismus, welcher die Vermehrung von Erregern eingrenzen und die Erreger-Eliminierung im Rahmen einer intramammären Infektion vorantreiben soll.

Vor diesem Hintergrund war es ein Ziel der vorliegenden Arbeit, die Wirksamkeit ausgesuchter boviner AMP gegen die prädominanten Mastitis-Pathogene *E. coli*, *S. aureus* und *Sc. uberis* *in vitro* zu untersuchen. Zur Bearbeitung dieser Fragestellungen sollten Testverfahren auf Ihre Eignung geprüft werden, die Wirksamkeit kommerziell erhältlicher AMP gegenüber Mastitis-Pathogenen nachweisen zu können. Weiterhin sollten bovine Milchdrüsenepithelzellen und neutrophile Granulozyten in funktionellen Studien *in vitro* auf direkte und indirekte antimikrobielle Wirkungen untersucht werden, da sie als Hauptquelle für AMP im Euter gelten.

Die Problematik wachsender Bakterienresistenzen gegenüber Antibiotika hat in den letzten Jahren verstärkt dazu geführt, nach neuen therapeutischen und prophylaktischen Ansätzen durch gezielte Förderung angeborener Immunmechanismen zu suchen. Einer dieser Ansätze basiert darauf, dass es durch wiederholten Wirtskontakt mit Pathogenen oder deren Bestandteilen zu einer gesteigerten Induzierbarkeit von AMP in Geweben kommen kann. Dieser Effekt beruht nach neueren Erkenntnissen unter anderem auf einer gesteigerten Transkription antimikrobieller Faktoren aufgrund epigenetischer Veränderung der Chromatin-Struktur. Bei der bovinen Mastitis konnte im Vorfeld bereits aufgezeigt werden, dass eine gezielte Stimulation des Euters mit Lipopolysaccharid (LPS) von *E. coli* eine nachfolgende klinische *E. coli*-Mastitis abmilderte und die Erreger-Elimination verbesserte. Im Rahmen dieser Arbeit sollte überprüft werden, ob durch eine intramammäre LPS-Vorbehandlung *in vivo* die Bereitschaft zur gesteigerten Expression von AMP nach Pathogen-Kontakt positiv gefördert werden kann. Dies sollte mit Blick auf die Frage geschehen, ob die gezielte Induktion von wirtseigenen AMP zukünftig bei der Infektionsabwehr in der bovinen Milchdrüse zum Einsatz kommen kann.

Die vorliegende Arbeit ist Teil eines Gesamtkonzeptes zur Untersuchung der Beteiligung wirtsseitiger Abwehrprozesse bei der Pathogen-spezifischen Mastitis. Durch eine gezielte Beeinflussung der wirtsseitigen Responsivität und der lokalen Expression antimikrobieller Faktoren im Euter sollen langfristig neue Wege für die Mastitisprophylaxe und -therapie eröffnet werden. Dabei soll darauf abgezielt

werden, selektiv das angeborene Immunsystem in eine erhöhte Alarmbereitschaft versetzen zu können, um die Etablierung von Mastitiden zu verhindern.

II. LITERATURÜBERSICHT

1 Die Mastitis des Rindes

Unter einer Mastitis versteht man die Entzündung der Milchdrüse. Die Mastitis des Rindes stellt eine Faktorenerkrankung dar, bei der eine ganze Reihe endogener und exogener Faktoren eine entscheidende Rolle dafür spielen, ob sich intramammäre Infektionen mit überwiegend bakteriellen Erregern etablieren.

1.1 Bedeutung

Eine Entzündung der Milchdrüse kann das Wohlbefinden der betroffenen Tiere stark beeinträchtigen, ihnen Schmerzen und Leiden zufügen und zu lebensbedrohlichen Zuständen führen. Neben der Beeinträchtigung des Tierwohls entstehen der Milchwirtschaft erhebliche ökonomische Verluste (ROLLIN et al., 2015).

Die Mastitis stellt eine der am weitverbreitesten und kostenintensivsten Erkrankungen in Milchviehherden dar. Etwa 30 % der Milchkühe erkranken jährlich an einer Mastitis (TENHAGEN et al., 2006). Der Gewinn der landwirtschaftlichen Betriebe wird dabei ebenso bedroht, wie der Ruf der Milchwirtschaft vor dem Hintergrund der Lebensmittelsicherheit. Dies resultiert in erster Linie aus den finanziellen Verlusten durch eine Reduktion der Milchmenge und Milchqualität sowie Behandlungs- und Remontierungskosten (HOGEVEEN et al., 2011). Durch den vermehrten Einsatz von Antiinfektiva steigt das Rückstandsrisiko in der Milch und das Aufkommen gegen herkömmliche Antibiotika resistenter Keime an. Dies kann die Lebensmittelsicherheit und die Gesundheit der Bevölkerung nachhaltig beeinträchtigen (DE VliegHER et al., 2012).

Die Schätzungen über tatsächliche Kosten von Mastitiden decken eine große Bandbreite ab. So ergab eine Studie, dass die Kosten für eine durch gramnegative Bakterien verursachte Mastitis bei ca. 211 US Dollar liegen (CHA et al., 2011). Der größte Anteil der Kosten entfiel in diesem Fall auf die Einbußen der Milchmenge. Bei Mastitiden durch grampositive Bakterien fielen hingegen durchschnittlich 133 US Dollar an, wobei hier in erster Linie die Behandlungskosten

dominierten (CHA et al., 2011). STEENEVELD et al. (2011) untersuchten die unterschiedlich anfallenden Kosten bei Mastitiden vor dem Hintergrund von fünf verschiedenen Behandlungsschemata und den damit verbundenen wirtschaftlichen Einbußen. Die preislichen Unterschiede dieser spezifisch für Einzeltiere ausgewählten Behandlungen waren geringfügig (224-275 US Dollar). Es zeigte sich allerdings, dass der vermehrte Einsatz von Antibiotika die Behandlungskosten pro Tier deutlich steigerte.

Die größten wirtschaftlichen Verluste entstehen, wenn Tiere aufgrund von Mastitiden aus der Herde abgehen müssen. Da die Aufzucht- und Remontierungskosten sehr hoch sind, lohnt sich in vielen Fällen die Behandlung von Mastitiden, wenn sie eine weitere Nutzung des Tieres ermöglichen. Die höchsten Einbußen entstehen, wenn ein Tier bereits in der ersten Laktation am Ende des ersten Laktationsmonats entfernt wird. Die geschätzten Verluste belaufen sich ohne Behandlung auf bis zu 1.050 €, mit Behandlung vor der Tötung auf bis 1.350 € (HEIKKILA et al., 2012).

1.2 Pathogenese

Die meisten Mastitiden werden durch intramammäre bakterielle Infektionen verursacht (SCHUKKEN et al., 2011). In der Mehrheit der Fälle dringen die ursächlichen Erreger durch den Strichkanal in das Innere der Milchdrüse ein. Sind die Bakterien einmal im milchleitenden Kompartiment (Zitzen- und Drüsenzisterne, Milchgänge) angelangt, vermehren sie sich und setzen sich Erreger-abhängig im Drüsengewebe fest. Der Schweregrad der Entzündungsreaktion ist Pathogenspezifisch sehr unterschiedlich stark ausgeprägt und reicht von akuter klinischer Mastitis bis hin zur subklinischen, chronischen Mastitis (WELLNITZ und KERR, 2004).

Als bedeutendste bakterielle Mastitis-Erreger gelten *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Streptococcus uberis* (*Sc. uberis*) und *Escherichia coli* (*E. coli*). Das gramnegative Bakterium *E. coli* zählt zu den wichtigsten Erregern akuter, klinischer Mastitiden (BURVENICH et al., 2003). Es kommt ubiquitär in der Umwelt der Kuh vor und infiziert das Euter über Verunreinigungen und Verschmutzungen vor allem mit Kot. Im Gegensatz dazu werden subklinische Mastitiden meistens

durch grampositive Bakterien, allen voran *S. aureus*, verursacht. Hierbei kommt es meistens zu persistierenden und schwer therapierbaren Euterinfektionen. *S. aureus* gehört zu den Kuh-assoziierten Erregern, für welche die Übertragung von Tier zu Tier die wichtigste Infektionsquelle darstellt (SCHUKKEN et al., 2011). Darüber hinaus hat *Sc. uberis* innerhalb der letzten Jahre zunehmend an Bedeutung gewonnen. Der Umwelt-assoziierte Keim verursacht häufig zunächst subklinische Mastitiden, die sich im weiteren Verlauf aber auch in klinische Mastitiden unterschiedlichen Schweregrades verwandeln können (LEIGH et al., 2004).

1.3 Therapie

Die derzeitigen therapeutischen Herangehensweisen mittels Antibiotika verfolgen überwiegend das Ziel, die wirtschaftlichen Verluste von Mastitiden zu reduzieren. Hierbei soll eine möglichst frühe Diagnosestellung einer sofortigen Behandlung des Tiers mit einem Antibiotikum vorangehen. Gegebenenfalls wird die Wahl des Wirkstoffs nach erfolgter bakteriologischer Untersuchung und Resistenztest angepasst (TIWARI et al., 2013). Heutzutage werden in modernen Milchviehherden etwa 80 % aller Antibiotika zur Prävention oder Behandlung von Mastitis eingesetzt (POL und RUEGG, 2007). Zwei Drittel davon werden intramammär verabreicht, entweder zum Trockenstellen der Tiere (28 %) oder zur Behandlung klinischer Mastitiden (38 %). Das verbleibende Drittel entfällt auf die parenterale Gabe von Antibiotika zur Mastitis-Therapie. Alleine in einem Milchviehbetrieb mit ca. 4000 Tieren im Staat New York zeigte sich im Jahr 2013 ein Verbrauch von insgesamt 493 kg Antibiotika. Hiervon entfiel der überwiegende Anteil auf die Mastitis Behandlung (DOANE und SARENBO, 2014).

Die Therapie von *E.-coli*-Mastitiden mit Antibiotika wird derzeit nicht mehr uneingeschränkt empfohlen. Bei einer *E. coli*-Mastitis mit milden oder moderaten klinischen Symptomen sollte der Einsatz von Antibiotika beispielsweise nicht das erste Mittel der Wahl sein. Hier sollte zunächst die symptomatische Therapie gegen die durch LPS verursachten klinischen Anzeichen im Vordergrund stehen (SUOJALA et al., 2013). Dies beinhaltet eine antiinflammatorische Behandlung mittels nichtsteroidaler Antiphlogistika oder Glukocortikoiden, Flüssigkeitsthera-

pie und häufiges Ausmelken (ERSKINE et al., 2003; SUOJALA et al., 2013). Bei schweren akuten klinischen Mastitiden ist zusätzlich eine parenterale Antibiotikatherapie angezeigt, um der Gefahr einer Bakteriämie entgegen zu wirken. Die Wirksamkeit einer intramammären Gabe von Antibiotika im Falle einer *E. coli-Mastitis* ist nicht hinreichend bewiesen weshalb ihre routinemäßige Anwendung als nicht nötig erachtet wird. (SUOJALA et al., 2013). Die Infektion ist meist selbstlimitierend und die Entzündungserscheinungen heilen oft spontan nach 4-6 Tagen ab (OLIVEIRA und RUEGG, 2014).

Als ein weiterer wichtiger Verursacher von Euterinfektionen gilt *S. aureus*. Im Gegensatz zur *E. coli-Mastitis* wird die intramammäre Antibiotikatherapie gegen Infektionen durch Gram positive Erreger wie *Streptococcus spec.* oder *S. aureus* üblicherweise empfohlen (LAGO et al., 2011) und auf weitere Applikationswege verzichtet. Kombinierte Therapien mit einem zusätzlich parenteral verabreichten Antibiotikum zeigen keine höheren Heilungsraten (BARKEMA et al., 2006). Die Heilungsraten für durch *S. aureus* hervorgerufene Mastitiden variieren stark. Neben den Behandlungsstrategien wird die Heilung maßgeblich von der Behandlungsdauer und von Kuh- und Pathogen-assoziierten Faktoren beeinflusst.

BARKEMA et al. (2006) zeigten, dass der wichtigste Faktor in Bezug auf die Therapie, die Dauer der antibiotischen Behandlung ist. Eine ausgedehnte intramammäre Behandlung über 5-8 Tage stellt für *S.-aureus-Mastitiden* noch vergleichbar die beste therapeutische Option dar (ROY und KEEFE, 2012), obwohl die Prognose hinsichtlich einer bakteriologischen Ausheilung sehr vorsichtig zu stellen ist. Die Erfolgsaussichten einer Behandlung sinken mit steigender Anzahl infizierter Viertel, mit zunehmendem Alter des Tieres und Chronizität der Infektion, sowie mit ansteigenden Werten der somatischen Zellzahl (SCC; somatic cell count) und zunehmender Bakterienzahl in der Milch, weshalb von einer Behandlung solcher Tiere abgeraten werden sollte (BARKEMA et al., 2006). Behandlungswürdige Tiere sollten daher sorgfältig ausgewählt werden. Für kontagiöse Erreger wie *S. aureus* ist es wichtig, die infizierten Tiere sehr früh zu erkennen, um das Risiko der Verschleppung innerhalb der Herde möglichst gering zu halten (BARKEMA et al., 2006).

Das antibiotische Trockenstellen ist in Milchviehherden der Vereinigten Staaten aber auch in weiten Teilen Europas zur gängigen Praxis geworden. Es werden

pauschal alle Euterviertel eines Tieres intramammär antibiotisch behandelt, auch wenn die Milch bakteriologisch negativ ist (POL und RUEGG, 2007). Während der Zeit des Trockenstehens besteht das größte Risiko (61 %) für das Auftreten neuer intramammärer Infektionen (SMITH et al., 1985; TIWARI et al., 2013). Durch die Behandlung der Tiere mit über lange Zeit wirksamen Antibiotika zum Trockenstehen soll einerseits die Heilung bereits vorhandener intramammären Infektionen erreicht werden und zum anderen die Kuh vor neuen intramammären Infektionen in der frühen Phase des Trockenstehens geschützt werden (CAMERON et al., 2014). Ohne antibiotisches Trockenstellen liegt die Inzidenz für klinische Mastitis 1,7-fach höher (SCHERPENZEEL et al., 2014). Die relative Reduktion der Inzidenz für neue intramammäre Infektionen während des Trockenstehens wurde von Robert et al. (2006) auf 33-53 % auf Viertelebene geschätzt, wobei dies je nach beteiligtem Pathogenen variierte. Der größte Effekt wird demnach gegenüber intramammären Infektionen mit Streptokokken erreicht (57-68 %), wohingegen der Schutz gegenüber Koagulase negativen Streptokokken (KNS) und koliformen Erregern sehr begrenzt scheint. Die Zeit des Trockenstehens bietet die beste Phase, um infizierte Euterviertel zu therapieren, da keine wirtschaftlichen Einbußen durch das Lieferverbot der Milch von behandelten Tieren entstehen und so die Rückstandgefahr ebenso reduziert ist. Etwa 30-70 % der Viertel heilen bakteriologisch während dieser Zeit aus (ERSKINE et al., 2003).

Die Einführung von antibiotischen Trockenstellern brachte zunächst einen großen Nutzen zur Prävention von Mastitis und ist vielerorts nach wie vor eine empfohlene Methode. Dennoch wird im Hinblick auf die öffentliche Gesundheit der präventive Einsatz von Antibiotika zunehmend in Frage gestellt (SCHERPENZEEL et al., 2014). Auf Grund der Problematik von Rückständen und der Entstehung von Resistenzen sollten der angemessene Gebrauch und der vernünftige Einsatz von Antibiotika bei Lebensmittelliefernden Tieren zugunsten der öffentlichen Gesundheit im Vordergrund stehen (POL und RUEGG, 2007; OLIVEIRA und RUEGG, 2014). Die Forderung, den Antibiotikaeinsatz zur Prävention und Behandlung von Euterentzündungen zu reduzieren, stellt in der Zukunft neue Herausforderungen an Wissenschaftler, Tierärzte und Landwirte.

2 Abwehrmechanismen der bovinen Milchdrüse

Um in die Milchdrüse eingedrungene Pathogene zu eliminieren, wird das Immunsystem aktiviert. Im Rahmen dieser Abwehrreaktion kommt es zum Zusammenspiel einer Vielzahl von zellulären und humoralen Faktoren (OVIEDO-BOYSSO et al., 2007).

2.1 Zelluläre Faktoren

Der Kontakt zwischen eingedrungenen Bakterien mit Epithelzellen und Leukozyten führt zu einer Stimulierung des angeborenen Immunsystems (WELLNITZ und BRUCKMAIER, 2012). Die Leukozyten liegen entweder in der Milch oder gewebeständig vor (RAINARD und RIOLLET, 2003). Hierzu zählen überwiegend Granulozyten, Makrophagen und lymphoide Zellen (M. PAAPE et al., 2002; BURTON und ERSKINE, 2003).

Neben der Synthese einer Vielzahl von Milchinhaltsstoffen stellen die Milchdrüsenepithelzellen als Grenzfläche zwischen dem Organlumen (Zisterne, Milchgänge, Alveolen) und dem Eutergewebe eine wichtige Barriere gegenüber Mikroorganismen dar (GRIESBECK-ZILCH et al., 2008). Die Epithelzellen der Milchdrüse sind in der Lage, Erreger-spezifische, phylogenetisch hochkonservierte Molekül-Muster (PAMPs; pathogen associated molecular patterns) über Toll-like-Rezeptoren (TLR) zu erkennen (PETZL et al., 2008; WELLNITZ und BRUCKMAIER, 2012). In diversen Studien konnte die Beteiligung der Milchdrüsenepithelzellen an der Immunabwehr aufgezeigt werden, entweder über die Generierung entzündungsfördernder Signale oder die Produktion antimikrobieller Moleküle (GOLDAMMER et al., 2004; WELLNITZ und KERR, 2004; GRIESBECK-ZILCH et al., 2008; FU et al., 2013; GILBERT et al., 2013; ZBINDEN et al., 2014)

Die Milch einer eutergesunden Kuh weist üblicherweise einen somatischen Zellgehalt $<100.000/\text{mL}$ auf. Hierbei wird das Zellbild überwiegend durch lymphoide Zellen dominiert (MEHNE et al., 2010). Im Falle einer Mastitis kommt es zu einem Anstieg des SCC in der Milch. Dies beruht überwiegend auf der Einwanderung neutrophiler Granulozyten (PMN; polymorphonuclear neutrophils) ins

Milchdrüsengewebe als Reaktion auf proinflammatorische Zytokine und Chemokine. Diese chemoattraktiven Stoffe werden nach Erregererkennung von Makrophagen und epithelialen Zellen freigesetzt (M. PAAPE et al., 2002; OVIEDO-BOYSO et al., 2007). Durch die Einwanderung der neutrophilen Granulozyten steigt ihr Anteil an den Leukozyten auf über 90 % (M. PAAPE et al., 2002) und sie beherrschen damit das Zellbild der Milch während einer Mastitis (OVIEDO-BOYSO et al., 2007). Am Ort der Entzündung phagozytieren immigrierende PMN die intramammären Erreger. Diese sind darüber hinaus durch opsonisierende Antikörper oder Komplementfaktoren für die PMN besser erkennbar (BURTON und ERSKINE, 2003). In der Milchdrüse gilt die Phagozytose durch PMN als die effektivste Abwehr gegenüber bakterieller Infektionen (M. PAAPE et al., 2002). Neben der Phagozytose ist der sauerstoffabhängige „Respiratory Burst“ ein weiterer wichtiger Wirkmechanismus der PMN. Es kommt hierbei zur Freisetzung von Superoxid und Hydrogenperoxid, welche mit der Membran des Phagosoms interagieren. Außerdem werden die Ribonukleinsäure (RNA; ribonucleic acid), Desoxyribonucleinsäure (DNA; deoxyribonucleic acid) und Proteine der Bakterien durch die Bildung von Sauerstoff- und Hydroxylradikalen geschädigt (BURTON und ERSKINE, 2003; M. J. PAAPE et al., 2003). Die Granula der PMN enthalten weiterhin antimikrobiell wirksame Proteine, wie Defensine, Laktoferrin, Bactenezin und Lysozym (SORDILLO et al., 1997). Eine schnelle Rekrutierung von PMN in das Milchdrüsengewebe gilt als essentiell für die Eliminierung intramammärer Pathogene (GRIESBECK-ZILCH et al., 2008).

2.2 Lösliche Faktoren

Neben den unter 2.1 beschriebenen zellulären Faktoren spielt eine Reihe von humoralen Faktoren eine wichtige Rolle bei der Immunabwehr. Hierzu zählen vor allem antimikrobielle Peptide (Defensine, Cathelicidine, S100-Proteine) aber auch Immunglobuline, Laktoferrin, Enzyme, Komplementfaktoren Zytokine und Chemokine.

Antikörper (Immunglobuline) stellen eine weithin bekannte Komponente der löslichen Abwehrfunktion dar. Die höchsten Konzentrationen der Immunglobuline liegen während der Kolostrogenese oder bei Entzündungen der Milchdrüse vor

(SORDILLO und STREICHER, 2002). Ihre Beteiligung an der körpereigenen Abwehr im Euter ist weitgehend ungeklärt und beruht seit Jahrzehnten auf Spekulationen. Es wurde bisher nie gezeigt, dass Epitop-spezifische Immunglobuline im Sinne eines immunologischen Gedächtnisses Mastitiden verhindern oder abmildern.

Als unspezifisch agierender löslicher Faktor gilt das Protein Laktoferrin, welches mit Eisen Komplexe bildet und bakteriostatisch und bakteriozid wirkt (SORDILLO und STREICHER, 2002; RAINARD und RIOLLET, 2006). Lysozym, Laktoperoxidase und Xanthinoxidase sind Enzyme aus der Milch, die ebenfalls durch antimikrobielle Wirkungen an der Erregerabwehr beteiligt sind (SORDILLO und STREICHER, 2002; RAINARD und RIOLLET, 2006).

Ein weiterer Bestandteil der humoralen Abwehr ist das lösliche CD14 (sCD14; soluble CD14), welches von Monozyten und Makrophagen freigesetzt wird. Es spielt eine wichtige Rolle beim Schutz des Wirtes, in dem es als LPS-Korezeptor agiert (FILIPP et al., 2001). Außerdem unterstützt sCD14 das Immunsystem indem es die Ausbreitung der Bakterien verhindert, die Proliferation der Lymphozyten stimuliert und die Phagozytose erleichtert (LEE et al., 2003).

Das Komplementsystem besteht aus Proteinen, welche sowohl in der Milch, als auch im Blutserum vorkommen. Es gehört der unspezifischen Immunität an und wird hauptsächlich von Hepatozyten, Monozyten und gewebeständigen Makrophagen gebildet. Die Komplementfaktoren dienen der Opsonisierung von Erregern und der Vermittlung ihrer Lyse. Die Einwanderung der PMN in die Milchdrüse wird durch einige Faktoren der Komplementkaskade induziert (SORDILLO und STREICHER, 2002).

Durch Kontakt mit bakteriellen Bestandteilen kommt es zur Induktion endogener Mediatoren (Zytokine und Chemokine), welche wesentlich zur Rekrutierung von Leukozyten zum Entzündungsort beitragen (GOUWY et al., 2005). Die größten Gruppen der Zytokine repräsentieren die Interleukine (IL), Wachstumsfaktoren (CSF, colony-stimulating factor;) und die Tumor-Nekrose-Faktoren (TNF) (SORDILLO und STREICHER, 2002). Die Zytokine, wie Interleukin-1 (IL-1) und Interferon gamma (IFN- γ) können als primäre Induktoren der Immunantwort angesehen werden, da sie zu einer Induktion von Chemokinen (z.B. CXCR3,

CXCR8, CCL20) führen. Diese spielen wiederum als sekundäre Induktoren eine besonders wichtige Rolle bei der Attraktion von Leukozyten (GOUWY et al., 2005). Zytokine und Chemokine werden während einer Euterentzündung gleichzeitig ausgeschüttet und können entweder als Stimulatoren oder Inhibitoren modulierend die Immunantwort gestalten.

3 Antimikrobielle Peptide (AMP)

Antimikrobielle Peptide sind eine wesentliche Komponente der Angeborenen Immunität (LAI und GALLO, 2009). Ihr Potential, Mikroorganismen zu bekämpfen, hat ihnen auch die Bezeichnung „natürliche Antibiotika“ verliehen. Die Problematik der wachsenden Resistenzen gegen kommerziell erhältliche Antibiotika hat in den letzten Jahren verstärkt dazu geführt, den möglichen Einsatz von AMP bei der Infektionsabwehr zu prüfen.

AMP sind insgesamt positiv geladene Peptide und bestehen aus 12-50 Aminosäuren. Zudem besitzen sie die Fähigkeit, eine amphipatische Struktur anzunehmen (RISSO, 2000; ZASLOFF, 2002; BOWDISH et al., 2005). Die Einteilung der AMP in verschiedenen Gruppen erfolgt auf Grund ihrer Aminosäuresequenz sowie ihrer Größe und räumlichen Anordnung. Demnach werden Peptide mit α -helikaler Struktur, Peptide mit β -Faltblatt-Struktur und gestreckte oder schleifenförmige Peptide unterschieden (LAI und GALLO, 2009). Peptide mit einer β -Faltblatt-Struktur repräsentieren die größte Gruppe. Hierzu zählen u.a. die β -Defensine und einige antimikrobiell wirkende Chemokine (YUNG und MURPHY, 2012). Bei Rindern ist bisher nur die Familie der β -Defensine bekannt, in der das zunächst in der Zunge nachgewiesene Defensin LAP (lingual antimicrobial peptide) als wichtigster Vertreter gilt (ROOSEN et al., 2004). In verschiedenen Studien konnte eine starke Heraufregulation von LAP nach Pathogenkontakt in mammären Zellen nachgewiesen werden (GUNTHER et al., 2011; PETZL et al., 2012). Neben den Defensinen gehören die Cathelicidine zu den am häufigsten untersuchten AMP (LAI und GALLO, 2009). Das breit angelegte antimikrobielle Wirkungsspektrum teilen die bekannten sieben Cathelicidine der Rinder mit den Defensinen und einigen Chemokinen (TOMASINSIG und ZANETTI, 2005; TOMASINSIG et al., 2010; TOMASINSIG et al., 2012).

Die AMP agieren gegen grampositive und gramnegative Bakterien, gegen Protozoen, Pilze und einige Viren (LAI und GALLO, 2009). Ihre Expression kann sowohl Pathogen-induziert als auch konstitutiv erfolgen (BOWDISH et al., 2005). Demnach sind AMP besonders in Geweben zu finden, welche ständig mikrobieller Besiedlung und möglicher Invasion von Pathogenen ausgesetzt sind. Hiervon sind vor allem Haut- und Schleimhautoberflächen betroffen (RISSO, 2000).

Einige der AMP besitzen die Fähigkeit, die mikrobielle Membran zu penetrieren und im intrazellulären Raum der Zielzelle an DNA oder Proteine zu binden. Die so entstandene Hemmung biosynthetischer Abläufe führt zum Tod der Mikroorganismen. Die Toxizität der AMP richtet sich dabei nicht gegen die eukaryotischen Wirtszellen (LAI und GALLO, 2009). Dies beruht auf Unterschieden in der Zusammensetzung und der Struktur der Zellmembranen (v.a. Cholesterol), welche eine Interaktion mit den Peptiden unterbindet (LAI und GALLO, 2009). Neben der beschriebenen direkten antimikrobiellen Aktivität können einige AMP die Produktion von Zytokinen und Chemokinen beeinflussen und stellen somit potente Immunmodulatoren dar (LAI und GALLO, 2009).

3.1 Cathelicidine

Als ein wesentlicher Bestandteil der neutrophilen Granulozyten werden die Cathelicidine der angeborenen Immunität zugeordnet und erfüllen im Rahmen früher Abwehrmechanismen eine wichtige Rolle (TAKAGI et al., 2012).

Beim Wiederkäuer konnten ADDIS et al (2013) mit immunhistochemischen Methoden darstellen, dass Cathelicidine (und das antimikrobiell wirksame S100A9 Protein) im Zytoplasma von MEC und PMN vorhanden sind. Hierzu wurden laktierende Schafe nach zweimaliger intramammärer Infektion mit *Sc. uberis* untersucht. Dagegen konnten Cathelicidine nicht in mononukleären Blutzellen nachgewiesen werden (TOMASINSIG et al., 2002).

Zum einen entfalten die Cathelicidine direkte antimikrobielle Aktivität, zum anderen fungieren sie durch Wirtszellaktivierung als Modulatoren der Immunantwort (ZANETTI, 2005). Die Wirkung der Peptide richtet sich gegen ein breites Spektrum von grampositiven und gramnegativen Bakterien (TOMASINSIG et al., 2010). Ebenso kann die Plasmamembran von Pilzen und Algen zum Angriffsziel

des Cathelicidins BMAP-28 (BMAP; bovine myeloid antimicrobial peptide) werden (TOMASINSIG et al., 2012).

Die derzeit sieben bekannten Cathelicidine der Rinder variieren in ihrer Größe zwischen 12-80 Aminosäuren, der Anordnung der Aminosäuren und ihren unterschiedlichen Strukturklassen. Demnach unterscheidet man zwischen den Prolinreichen Cathelicidinen BAC5 und BAC7 (Bacteneicin 5 und 7), den α -Helix Cathelicidinen BMAP-27, BMAP-28 und BMAP-34, dem linearen und Tryptophan-reichen Indolicidin, sowie dem Cathelicidin „Dodecapeptid“. Letzteres zeigt eine sogenannte β -Hairpin-Struktur, welche durch Disulfidbrücken stabilisiert wird (TOMASINSIG und ZANETTI, 2005).

Im Gegensatz zum Rind gibt es beim Menschen nur ein einziges bekanntes Cathelicidin, das LL-37/hCAP-18. Dieses Peptid wird in Phagozyten und in Epithelzellen exprimiert (ZANETTI, 2005).

Alle Cathelicidine werden im Knochenmark als Vorläuferpeptide synthetisiert und in den zytoplasmatischen Granula neutrophiler Granulozyten gespeichert (ZANETTI et al., 1991; TOMASINSIG und ZANETTI, 2005). Zunächst sind die Vorläuferpeptide inaktiv. Sie bestehen aus einer konservierten N-terminalen „Cathelin-Domäne“, sowie einer variablen C-terminalen Domäne. Die C-terminale Domäne wird auch als antimikrobielle Domäne bezeichnet. Dies beruht darauf, dass die antimikrobielle Domäne amphiphile Eigenschaften besitzt und positiv geladen ist. Diese Strukturcharakteristika ermöglichen es ihnen, an die negativ geladene mikrobielle Oberfläche zu binden und in die Zellmembran einzudringen (ZANETTI, 2004; TOMASINSIG und ZANETTI, 2005). Zur Aktivierung der Vorläuferpeptide kommt es, wenn ein neutrophiler Granulozyt seine Granula abgibt und in Folge dessen die C-Domäne enzymatisch von der Cathelin-Domäne abgespalten wird (ZANETTI et al., 1991; ZANETTI, 2004).

Kinetische Messungen der Cathelicidin-Sekretion in die Milch zeigten, dass diese Peptide umgehend nach experimenteller intramammärer Infektion mit *Sc. uberis* bei Schafen freigesetzt wurden (ADDIS et al., 2013). Auch SMOLENSKI et al. (2011) beobachteten einen sofortigen Anstieg von Cathelicidinen in der Milch nach intramammärer Infektion mit *Sc. uberis* bei laktierenden Kühen. Weiterhin konnte ein Zusammenhang zwischen ansteigender Zellzahl in der Milch und vermehrtem Nachweis von Cathelicidinen und S100-Proteinen aufgezeigt werden (SMOLENSKI et al., 2014).

In vitro konnte anhand immortalisierter boviner Milchdrüsenepithelzellen (MAC-T) gezeigt werden, dass eine Stimulation mit *E. coli* zu Heraufregulation der mRNA- sowie der Proteinexpression von Cathelicidin 1, -2 und -4 führte, während die Stimulation mit *S. aureus* lediglich Cathelicidin 4 induzierte (IBEAGHA-AWEMU et al., 2010).

3.2 Indolicidine

Indolicidine bestehen aus nur sechs verschiedenen Aminosäuren und sind damit die kleinsten, natürlich vorkommenden linearen AMP. Sie besitzen unter den Proteinen den höchsten prozentualen Anteil von Tryptophan und sind zudem reich an Prolin (BERA et al., 2015). Für Indolicidine sind verschiedene antimikrobielle Wirkungsmechanismen beschrieben, welche auf mehreren möglichen strukturellen Eigenschaften des Peptids beruhen. Obwohl Indolicidin eine bakterizide Wirkung hat und in der Lage ist, die äußere und innere Zellmembran von *E. coli* zu durchdringen, führt es nur in sehr hohen Konzentrationen zur Lyse der Zellwand. In niedrigerer Konzentration tötet Indolicidin Bakterien mit anderen Mechanismen: Hierbei induziert es einen spannungsabhängigen Transport durch die Zellmembran, um im Zytoplasma seine Wirkung zu entfalten (FALLA et al., 1996). Es ist dabei in der Lage, die DNA-Synthese, nicht aber die RNA-Synthese zu hemmen und Proteine anderer Signalkaskaden oder biosynthetischer Abläufe zu binden. Die verschiedenen Struktur-Konformationen von Indolicidin könnten für das breite Wirkungsspektrum gegen die meisten Bakterien, Pilze und einige Viren verantwortlich sein (FALLA et al., 1996; SUBBALAKSHMI und SITARAM, 1998; HSU et al., 2005). Um die Funktion der Prolinreste am Indolicidin zu untersuchen, ersetzten BERA et al. (2015) die Reste durch Alanin. Es wurde gezeigt, dass die Anwesenheit von Prolin essentiell ist für die Bindungsfähigkeit an LPS und damit für die antimikrobielle Aktivität gegen Bakterien. FRIEDRICH et al. (2001) konnten außerdem eine Prolin-abhängige Aktivität gegen Gram positive Erreger wie *S. aureus* zeigen.

3.3 Defensine

Defensine sind multifunktionale Peptide der angeborenen Immunität (ROOSEN et

al., 2004). Sie sind charakterisiert durch eine β -Faltblatt-Struktur mit sechs Cysteinenresten, welche drei Disulfidbrücken formen. Darüber hinaus sind Defensine kationisch und amphiphatisch, wie es für antimikrobielle Peptide typisch ist (GANZ, 2003). Defensine werden auf Grund von Strukturunterschieden in die drei Unterfamilien der α -, β -, und θ -Defensine eingeteilt (GANZ, 2003). Die β -Defensine werden von Schleimhaut-assoziierten und epithelialen Zellen exprimiert. Hierbei erfolgt die Expression konstitutiv oder induziert durch Entzündungsvorgänge (WIESNER und VILCINSKAS, 2010). Sie entfalten direkte antibakterielle Wirkung sowohl gegen gramnegative, als auch gegen grampositive Bakterien, sowie gegen Pilze (SCHONWETTER et al., 1995). Als wesentlicher Bestandteil der azurophilen Granula neutrophiler Granulozyten (GANZ, 2003) tragen die Defensine nach der Verschmelzung der Vesikel mit dem Phago lysosom maßgeblich zur Lyse von eingeschlossenen Bakterien bei (KAWAI et al., 2013). Darüber hinaus mildern β -Defensine die pathogene Wirkung von Bakterien ab, indem sie diese oder ihre Produkte zu binden vermögen (KOHLEGRAB et al., 2010). Weitere Wirkungen der Defensine sind die Induktion inflammatorischer Mediatoren, die Förderung der Phagozytose durch Makrophagen, die Regulation des Komplementsystems, die Unterstützung der Antigen-spezifischen Immunantwort sowie die chemotaktische Wirkung auf Phagozyten und Mastzellen. Neben der induzierbaren Expression von β -Defensinen in epithelialen Geweben und dem Knochenmark, konnte ihre mRNA zum Beispiel auch in Makrophagen nachgewiesen werden (KOHLEGRAB et al., 2010; YAMAGUCHI und OUCHI, 2012).

Bei Rindern ist nur die Familie der β -Defensine vertreten. Das LAP ist der wichtigste Vertreter dieser Familie mit antimikrobieller Aktivität gegen grampositive und gramnegative Bakterien sowie gegen einige Viren und Pilze (ROOSEN et al., 2004). Defensine kommen beim Rind in Epithelzellen und in neutrophilen Granulozyten vor (GANZ, 2003). SCHONWETTER et al. (1995) und ROOSEN et al. (2004) konnten beide zeigen, dass LAP konstitutiv in infiziertem und in gesundem Gewebe exprimiert wird. In der infizierten Milchdrüse wurde die LAP - Expression sowohl im Epithel der Zisterne als auch der Alveoli nachgewiesen (SWANSON et al., 2004). Die Induktion von LAP erfolgt über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B (nuclear factor [kappa- light-chain- enhancer] of activated B- cells), welcher wiederum IL-8 und LAP induziert. Durch IL-8 werden außerdem neutrophile Granulozyten rekrutiert (GANZ, 2003). Die Einwande-

Die Konzentration der neutrophilen Granulozyten resultiert in einem Anstieg der somatischen Zellzahl in der Milch. Somit steigt auch die Konzentration von LAP in der Milch an Mastitis erkrankter Tiere, und es gibt eine positive Korrelation zwischen der Höhe der Zellzahl und LAP (KAWAI et al., 2013). Die LAP-Konzentration variiert allerdings mit der Schwere der Mastitis Erkrankung. Die Konzentration ist in Kühen mit höherer Zellzahl am ersten Tag der Erkrankung niedriger, als in Tieren mit geringerer Zellzahl. Dies scheint am Zelluntergang der Euterepithelzellen bei schweren Mastitiden zu liegen (KAWAI et al., 2015).

3.4 S100-Proteine

Die S100-Proteine sind kleine Proteine, gekennzeichnet durch zwei EF-Hand-Motive, welche Kalzium mit unterschiedlichen Affinitäten binden können (HEIZMANN und COX, 1998). Die Bezeichnung „S100“ ist von der Eigenschaft abgeleitet, dass die Proteine in 100%iger Ammonium-Sulfat-Lösung löslich sind. Vor über 40 Jahren wurden die ersten Mitglieder der S100-Protein-Familie aus bovinem Gehirn gewonnen (FOELL et al., 2007). Die S100-Proteine werden auf Grund ihrer proinflammatorischen Eigenschaften der Molekülgruppe der „DAMPs“ (damage-associated molecular patterns) zugeordnet (JIN et al., 2014). DAMPs, oder auch „Alarmine“ (VOGL et al., 2014) genannt, spielen eine ähnliche Rolle wie die PAMPs, welche als exogene Gefahrensignale über Pathogen-Erkennungs-Rezeptoren (PRR; pathogen recognition receptors) Mechanismen der angeborenen Immunität aktivieren. Im Gegensatz dazu wirken DAMPs als endogene Gefahrensignale, da sie bei Zellstress aus dem Zytoplasma geschädigter oder zerstörter körpereigener Zellen freigesetzt werden. DAMPs binden an TLR und RAGE (multiligand receptor for advanced glycation end products) und induzieren so eine Immunreaktion über die Aktivierung der NF- κ B-Signalkaskade (TANG et al., 2012). Die drei Proteine S100A8 (Calgranulin A; myeloid-related protein 8, MRP8), S100A9 (Calgranulin B; MRP14) und S100A12 (Calgranulin C; extracellular newly identified RAGE binding protein, EN-RAGE) werden als Calgranuline bezeichnet, was ihre Kalzium-bindenden Eigenschaften und ihre überwiegende Expression in Granulozyten beschreibt (GOYETTE und GECZY, 2011). Calgranuline werden überwiegend in myeloiden Zellen exprimiert (FOELL et al., 2007) und spielen durch ihre antimikrobielle Aktivität eine wichtige Rolle in der Entzündungsab-

wehr (DONATO et al., 2013). S100-Proteine üben unabhängige intrazelluläre und extrazelluläre Effekte aus. Als zytoplasmatische Bestandteile binden die Proteine im Zellinneren Kalzium, Zink und Kupfer und beteiligen sich so an der Zellhomöostase. Darüber hinaus unterstützen die intrazellulären S100-Proteine den Metabolismus des Zytoskeletts und die Zellmigration (FOELL et al., 2007). Ihre Kalzium-abhängigen Interaktionen mit Komponenten des Zytoskeletts spielen eine wichtige Rolle in der Migration, Degranulation und Phagozytoseaktivität von aktivierten Granulozyten und Monozyten (DONATO et al., 2013). Durch aktivierte Granulozyten oder geschädigte Zellen werden die S100-Proteine in den extrazellulären Raum abgegeben. Als proinflammatorische Gefahrensignale vermitteln sie die Rekrutierung und Aktivierung von Immunzellen und dem Gefäßendothel (FOELL et al., 2007).

S100A8 und S100A9 werden im Zytoplasma von Granulozyten, Monozyten und frühen Differenzierungsstadien von Makrophagen exprimiert (DESSING et al., 2014). Zudem kann die Expression in entzündlich aktivierten Epithelzellen induziert werden (VOGL et al., 2014). Neben dem unabhängigen Vorkommen als Homodimere formen S100A8 und S100A9 unter reduzierenden Bedingungen ein Heterodimer (DONATO, 1999; DONATO et al., 2013). Der Heterokomplex wird als „Calprotectin“ bezeichnet (FOELL et al., 2007). Es bindet intrazellulär an Mikrotubuli und die Zellmembran um diese zu stabilisieren (FOELL et al., 2007). Extrazellulär ist es an der Regulation von Zellwachstum und Zellapoptose beteiligt und entfaltet ein weites Spektrum an antimikrobieller Aktivität (DONATO et al., 2013). Das Heterodimer Calprotectin moduliert außerdem die Entzündungsantwort und triggert die Immunantwort durch die Induktion proinflammatorischer Signalmoleküle (VOGL et al., 2014). S100A8 und S100A9 binden nach ihrer Abgabe spezifisch an Endothelzellen und induzieren so eine prothrombotische und inflammatorische Reaktion. Es kommt zu einer Heraufregulation der Expression von proinflammatorischen Zytokinen und Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 (ICAM-1; intercellular adhesion molecule-1). Die Gefäßpermeabilität wird ebenfalls erhöht. Die Zellmigration wird durch eine gesteigerte Expression von Adhäsionsmolekülen (CD11b und CD 18) in Phagozyten verbessert (FOELL et al., 2007). Komplexe von S100A8 und S100A9 werden passiv von nekrotischen Zellen bei Gewebeschaden abgegeben oder aktiv von einwandernden Phagozyten sezerniert. Wegen der spezifischen Expression und Freisetzung dienen S100A8

und S100A9 als sensitive Biomarker für Reaktionen der angeborenen Immunität auf die Zerstörung von Gewebe (VOGL et al., 2014). VOGL et al. (2014) konnten zeigen, dass die Expression von S100A8 und S100A9 während der initialen Phase eines Entzündungsprozesses ein früher und sensitiver Marker für die subklinische Aktivität von Phagozyten ist.

S100A12 zeigt keinerlei Interaktionen mit S100A8 oder S100A9, ebenso wenig wie mit deren Heterodimer Calprotectin. S100A12 wird in Neutrophilen Granulozyten exprimiert und liegt als Homodimer im deren Zytosol vor (VOGL et al., 2014). Die Interaktion von S100A12 und RAGE auf Endothelzellen, Lymphozyten und mononukleären Phagozyten (MOROZ et al., 2003) vermittelt proinflammatorische Effekte durch die Aktivierung der NF- κ B-Signalkaskade (HOFMANN et al., 1999; HATAKEYAMA et al., 2004). S100A12 erhöht auf Endothelzellen außerdem die Expression der Adhäsionsmoleküle VCAM-1 (VCAM-1; vascular cell adhesion molecule-1) und ICAM-1, wodurch die Migration der Entzündungszellen verbessert wird (FOELL et al., 2007). In Mastzellen induziert S100A12 die Expression von proinflammatorischen Zytokinen (GOYETTE und GECZY, 2011) und wirkt zudem chemotaktisch auf Monozyten und Mastzellen (DONATO et al., 2013). Bei Entzündungen wird S00A12 sehr stark exprimiert (FOELL et al., 2007).

Die Forschung zur bovinen Mastitis innerhalb der letzten zehn Jahre hat immer wieder die frühe und starke Regulation von S100-Proteinen in der Milchdrüse aufgezeigt. MITTERHUEMER et al. (2010) konnten eine gesteigerte Expression der antibakteriell wirksamen Proteinen S100A8, S100A9 und S100A12 nach experimenteller Infektion der Milchdrüse mit *E. coli* zeigen. In dem infizierten Euterviertel wurde S100A12 um das 110-fache heraufreguliert und im nicht infizierten Nachbarviertel um das 4-fache. Dies deutet auf eine aktive Abwehrreaktion im infizierten und angrenzenden gesunden Euterviertel hin (MITTERHUEMER et al., 2010). Auch in zwei weiteren Mastitis-Infektionsversuchen bei Kühen mit *E. coli* und *S. aureus* gehörten S100A8, S100A9 und S100A12 zu den am frühesten und am stärksten regulierten Faktoren (RINALDI et al., 2010; JENSEN et al., 2013). *In vitro* wurde gezeigt, dass rekombinantes S100A12 das Wachstum von *E. coli* hemmt (LUTZOW et al., 2008). LIND et al. (2015) zeigen, dass eine Stimulation von bovinen Gewebeexplantaten des Zitzenkanals mit LPS eine gesteigerte

gerte Expression der mRNA von S100A8, S100A9 und S100A12 induzierte. Die Stimulation mit Lipoteichonsäure (LTA) von *S. aureus* führte hingegen nur zu einer signifikanten Heraufregulierung von S100A8. Die Expression S100A12 wird bei intramammären Infektionen mit *S. aureus* gesteigert. BRENAUT et al.(2014) zeigen dies in einer Studie zur Untersuchung der Beteiligung von Milchdrüsenepithelzellen an der frühen Immunantwort auf eine *S. aureus*-Infektion *in vivo*. LUTZOW et al.(2008) zeigten erhöhte Werte für S100A12 in Milch von mit *S. aureus* infizierten Kühen. Kühe, die experimentell mit *E. coli* infiziert waren exprimierten Psoriasin (S100A7), ein weiteres Mitglied der S100-Protein-Familie, in den Epithelzellen der Zitzenzisterne, aber nicht im Drüsenparenchym (REGENHARD et al., 2010). Gesunde, nicht infizierte Kühe zeigten an beiden Lokalisationen hingegen keine Expression von Psoriasin. Insgesamt konnte eine starke konstitutive Expression auf der Euter- und Zitzenhaut nachgewiesen werden. Neueste Erkenntnisse zeigen auf, dass eine Vielzahl von antimikrobiell wirksamen S100-Proteinen im sogenannten „Keratinpfropf“ des Strichkanals vorkommen und unterstreichen hiermit ihre wichtige Abwehrfunktion gegenüber Mastitis-Pathogenen (SMOLENSKI et al., 2015).

3.5 Antimikrobiell wirksame Chemokine

Chemokine sind chemotaktisch wirksame Zytokine, deren Hauptfunktion darin besteht, als kleine Signalproteine die Attraktion und Migration von Entzündungszellen in das Gewebe zu orchestrieren (ZLOTNIK und YOSHIE, 2000). Neben ihrer chemotaktischen Funktion erfüllen eine Vielzahl an Chemokinen auch direkte antimikrobielle Wirkungen (ZLOTNIK und YOSHIE, 2000; YUNG und MURPHY, 2012). Eine Übersicht zur antimikrobiellen Wirkung von Chemokinen ist in Tabelle 1 wiedergegeben. Potente Induktoren von Chemokinen sind Zytokinen wie IL-1 β und TNF- α , aber auch diverse exogene Stimuli, wie bakterielle oder virale Produkte, können ihre Ausschüttung direkt anregen (GOUWY et al., 2005). Damit sind Chemokine in die angeborene und adaptive Immunantwort involviert und beteiligen sich sowohl an akuten als auch an chronisch entzündlichen Geschehen (YUNG und MURPHY, 2012).

Chemokine entfalten ihre antimikrobielle Aktivität ähnlich wie Defensine, welchen sie in Struktur, Größe und Ladung ähnlich sind (COLE et al., 2001; GANZ,

2003). Die Wirkung antimikrobieller Chemokine ist stark abhängig von der vorliegenden Salzkonzentration im Wirkungsmilieu. Ab einer Na^+ -Konzentration von 100 nM geht die Wirkung verloren (YUNG und MURPHY, 2012). Für CCL20 wurde gezeigt, dass es seine Wirkung ab einer Na^+ -Konzentration von 130 nM *in vitro* verliert (YANG et al., 2003). Die positiv geladene Struktur führt dazu, dass sie sich an negativ geladenen bakteriellen Oberflächen anlagern und lokal ansammeln, in die Membran eindringen und dort zur Bildung von Poren führen. Der Inhalt der Zelle kann daraufhin austreten, was den Untergang der Zielzelle bedeutet (ZASLOFF, 2002; HIESHIMA et al., 2003). Der exakte Mechanismus, der zum Abtöten des mikrobiellen Organismus führt ist jedoch noch nicht bis ins Detail bekannt. Gesichert hingegen ist, dass Chemokine ihre abtötenden Wirkungen sehr schnell entfalten (HIESHIMA et al., 2003). Der Wirkmechanismus wurde für einige Chemokine mittels Elektronenmikroskopie untersucht und es konnte gezeigt werden, dass diese eine Lyse der bakteriellen Zellwand induzieren. Die induzierte Ruptur der mikrobiellen Zellwand konnte beispielsweise für *Streptococcus pyogenes* durch CXCL9, für *E. coli* durch CXCL6 und für *Pseudomonas aeruginosa* sowie *Candida albicans* durch CCL28 gezeigt werden (HIESHIMA et al., 2003; EGESTEN et al., 2007; LINGE et al., 2008)

Chemokine werden je nach Vorhandensein und der Anzahl von N-terminalen konservierten Cysteinresten (C) in vier Gruppen aufgeteilt: C, CC, CXC und CX3C (PAREEK et al., 2005). Die Cysteinreste sind entweder direkt (CC) miteinander verbunden oder durch eine bzw. drei weitere Aminosäuren (X) voneinander getrennt (CXC, CX3C) (ZLOTNIK und YOSHIE, 2000). Die Chemokine mit dem CXC-Motiv werden nochmal in zwei weitere Klassen unterteilt. Basierend auf der An- oder Abwesenheit der drei Aminosäuren Glutamat-Leucin-Arginin (ELR- Tripeptidstrukturmotiv) vor den ersten beiden Cysteinresten werden die ELR(+)- und ELR(-)-Chemokine unterschieden (PAREEK et al., 2005). Mitglieder der ELR(-)-Chemokine (IP-10/CXCL10, Mig/CXCL9, I-TAC/CXCL11) wirken vorrangig chemotaktisch auf Lymphozyten, wohingegen Mitglieder der ELR(+)- Chemokine (IL-8/CXCL8, GRO- α /CXCL1) stark chemotaktisch und aktivierend auf PMN wirken (GOUWY et al., 2005; PAREEK et al., 2005). Die CC-Chemokine zeigen im Gegensatz zu den CXC-Chemokinen ein breiteres Spektrum an Zielzellen (GOUWY et al., 2005).

Tabelle 1 Übersicht zu Chemokinen mit antimikrobieller Wirkung (nach Sobirk

Chemokine*	Antimikrobielle Aktivität gegen:
CXCL1/Gro- α	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i>
CXCL2/GRO- β	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>C. albicans</i>
CXCL3/Groy	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i>
CXCL6/GCP-2	<i>Sc. pyogenes</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. dysgalactiae</i>
CXCL8/IL-8	<i>S. aureus</i> , <i>S. typhimurium</i> , <i>C. albicans</i>
CXCL9/MIG	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. pyogenes</i> , <i>N. gonorrhoeae</i>
CXCL10/IP-10	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>C. albicans</i>
CXCL11/I-TAC	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>C. albicans</i>
CXCL12/SDF-1	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>C. albicans</i>
CXCL13/BCA-1	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i>
CXCL14/BRAK	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i>
CX3CL1/fractalkine	Keine Aktivität gegen <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i>
XCL1/lymphotactin	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i>
CCL1/I-309	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i>
CCL2/MCP-1	Keine Aktivität gegen <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i>
CCL3/MIP-1 α	Keine Aktivität gegen <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i>
CCL5/RANTES	Keine Aktivität gegen <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i>
CCL7/MCP-3	Keine Aktivität gegen <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i>
CCL8/MCP-2	<i>E. coli</i> , Keine Aktivität gegen <i>S. aureus</i>
CCL11/eotaxin	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>C. albicans</i>
CCL13/MCP-4	<i>E. coli</i> , <i>C. albicans</i> , Keine Aktivität gegen <i>S. aureus</i>
CCL16/LEC	Keine Aktivität gegen <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i>
CCL17/TARC	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i>
CCL18/PARC	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i>
CCL19/MIP-3 β	<i>E. coli</i> , Keine Aktivität gegen <i>S. aureus</i>
CCL20/MIP-3 α	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>C. albicans</i>
CCL21/SLC	<i>E.coli</i> , <i>S. aureus</i>
CCL22/MDC	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i>
CCL25/TECK	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i>
CCL27/CTACK	<i>C. albicans</i> . Keine Aktivität gegen <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i>
CCL28/MEC	<i>Sc. pyogenes</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>C. albicans</i>

et al., 2013; Yang et al., 2003)

* Neue/alte Bezeichnung der Chemokine; *Staphylococcus* (*S*), *Streptococcus* (*Sc*), *Escherichia* (*E*), *Candida* (*C*), *Pseudomonas* (*P*), *Neisseria* (*N*)

Die Heraufregulation von Chemokinen während inflammatorischer Geschehen konnte *in vitro* in diversen Studien gezeigt werden. LIND et al. (2015) konnten in bovinen Explantaten des Strichkanals und der Fürstenbergschen Rosette eine Heraufregulation der mRNA Expression von CCL20, CCL5 und CXCL8 als Reaktion auf eine Exposition mit LPS zeigen. Eine Stimulation mit LTA hingegen steigerte signifikant nur die Expression von CCL20 und CXCL8 (LIND et al., 2015). Auch RINALDI et al. (2010) konnten zeigen, dass in gewonnenen Gewebeproben aus der Fürstenbergschen Rosette, der Drüsenzisterne und der Zitenzisterne nach

experimentell induzierter *E. coli-Mastitis* die mRNA-Expression von CCL20 signifikant hochreguliert wurde. CCL20 trägt somit vermutlich auch bei der bovinen Mastitis durch Rekrutierung von Immunzellen zur Erregerbekämpfung bei (RINALDI et al., 2010).

4 Epigenetische Mechanismen bei der Infektionsabwehr

Die Antwort des Immunsystems auf eine Verletzung, Infektion oder Gewebestress äußert sich im Rahmen einer Entzündung als komplexes Geschehen aus einer Vielzahl von beteiligten Faktoren und Zellen. Bei der Regulierung des Zusammenspiels der beteiligten Komponenten spielt die Gentranskription eine entscheidende Rolle. Mechanismen, welche die inflammatorische Antwort regulieren, können Zell-spezifisch, Signal-spezifisch oder Gen-spezifisch sein (MEDZHITOV und HORNG, 2009). Die Epigenetik beschreibt Mechanismen, die entscheidend dazu beitragen, welche Gene zu welchem Zeitpunkt im Zellkern abgelesen und translatiert werden. Histon-modifizierende Enzyme wie Histon-Acetyltransferasen, Histon-Methyltransferasen, Histon-Deacetylasen oder Histon-Demethylasen katalysieren dabei die Modifikation von Histonen an bestimmten Basen, wie Lysin, Histidin und Arginin (DODD et al., 2007). Die Enzyme fungieren als Chromatin-Regulatoren, indem sie als ‚Schreiber‘ oder als ‚Radierer‘ Einsatz finden und somit eine Transkription/Expression fördern oder hemmen (SNEPPEN und DODD, 2012). Epigenetische Kontrollen der Genexpression spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation von Immunfunktionen in der Zelle. Es wurde gezeigt, dass diverse Kombinationen von DNA-Methylierungen und Histon-Modifikationen an der Differenzierung und der Funktion verschiedener Typen von Immunzellen der angeborenen Immunität beteiligt sind (IVASHKIV, 2013; RUSS et al., 2013; DOHERTY et al., 2014).

Epithelzellen und Makrophagen wirken TLR-vermittelt als wichtige Initiatoren im entzündlichen Geschehen. Bindet ein Ligand wie LPS an einen TLR, so kommt es in der Folge zu einer streng regulierten Transkription. Hierbei erfolgt fast unmittelbar die Induktion und Unterdrückung mehrerer hundert Gene. Die Effekte zeigen weitreichende Auswirkungen im Ablauf der gesamten Regulation der Immunantwort: Hiervon sind vor allem die Zellmigration und -phagozytose, die antimikrobielle Abwehr und die Gewebereparation betroffen (HUME et al., 2002;

RAMSEY et al., 2008; MEDZHITOV und HORNG, 2009).

4.1 Das Konzept der Endotoxin-Toleranz

Eine ‚Endotoxin-Toleranz‘ eines Organismus kann entstehen, wenn eine initiale Stimulation mit dem TLR-4-Ligand LPS dazu führt, dass die Zellen in einen refraktorisches Zustand übergehen. Das heißt, dass im Falle erneuter TLR-Stimulationen keine oder nur eine abgeschwächte proinflammatorische Antwort erfolgt (GUNTHER et al., 2012). Hierbei wird das Geschehen von der selektiven Herabregulation TLR-assoziierter Signalkaskaden und einer verminderten Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B dominiert. Die Endotoxin-Toleranz ist neben dem LPS (‚Endotoxin‘) auch für weitere natürliche und synthetische TLR-Liganden bekannt und kann ebenfalls eine gegenseitige Toleranz zwischen verschiedenen TLR-Liganden induzieren (sog. ‚cross-tolerance‘). Diesem Phänomen werden vor allem epigenetische Mechanismen zugeschrieben, welche die gewebe-spezifische Reaktionsweise durch Chromatin-Modifikationen nachhaltig verändern (FOSTER et al., 2007). Die Endotoxin-Toleranz besitzt zudem eine duale Kernfunktion: Neben der beschriebenen fehlenden Induktion proinflammatorischer Gene werden viele endogene antimikrobielle Faktoren signifikant verstärkt und verlängert exprimiert (FOSTER et al., 2007). Dies wird als ein Mechanismus angesehen, erneute bakterielle Infektion zu verhindern.

4.2 Epigenetische Regulation bei der bovinen Mastitis

Es ist davon auszugehen, dass epigenetische Mechanismen bei der Modulation von Entzündungsvorgängen im Euter eine Rolle spielen. Die Anzahl an Studien, die hierzu im bovinen System vorliegen, sind jedoch stark in der Anzahl begrenzt und beschränken sich überwiegend auf *In vitro-Studien*. In einem Mausmodell für bovine Mastitis führte eine experimentelle *S.-aureus*- und *E. coli*-Infektion der Milchdrüse zu spezifischen Veränderungen epigenetischer Zustände (MODAK et al., 2012; MODAK et al., 2014). *E. coli* induziert spezifische Hyperacetylierungen in Euterepithelzellen und Entzündungszellen sowie Veränderungen in der Expression von bestimmten entzündungsrelevanten Faktoren, antimikrobiellen Peptiden und Milchproteinen (MODAK et al., 2012). Auch *S. aureus* induzierte spezifische

Histonmodifikationen, welche die Expression pro- und antiinflammatorischer Gene veränderte (MODAK et al., 2014). DOHERTY et al. (2013) beschäftigten sich mit Histondeacetylasen (HDAC) und DNA-Methyltransferasen (DNMT) in mononukleären Blutzellen nach LPS-Stimulation sowie nach einer zusätzlichen Vorbehandlung mit dem Histondeacetylaseinhibitor Trichostatin A (TSA). Die Stimulation mit LPS resultierte in verschiedenen Expressionen von HDAC6-, HDAC7- und DNMT3A-Genen. Die Behandlung mit TSA inhibierte signifikant die Expression proinflammatorischer Zytokine (TNF, IL-2, IFNG). Dies lässt eine einschlägige Aufgabe der HDAC-Genfamilie in der Regulation boviner Gene der angeborenen Immunität vermuten (DOHERTY et al., 2013). FALVO et al.(2013) berichteten über die epigenetische Regulation der Expression von Zytokinen in Zellen der angeborenen und der erworbenen Immunantwort, welche wiederum wichtige Mediatoren für die folgende Immunzellendifferenzierung sowie die Vermittlung und Effektivität der Immunreaktion darstellen. In mammären Epithelzellen wurde gezeigt, dass es nach einem Pathogen-Kontakt mit *E. coli* zu einer Auflockerung der Chromatinstruktur kommt, was die Verstärkung des NFκB- Signalwegs erleichtert. Das führte zu einer ansteigenden Expression des antimikrobiellen Defensins LAP in bovinen Euterepithelzellen (LIU et al., 2011).

III. MATERIAL UND METHODEN

1 Geräte

Accuri C6 Flow Cytometer mit Software CFlow	(Accuri Cytometers Inc., Großbritannien)
Automatisches Hämatologiegerät „Sysmex pocH-100iV Diff“	(Sysmex Corporation, Kobe, Japan)
Automatisches Kolonienzählgerät „flash&go“	(IUL Instruments, Königswinter)
Brutschrank „Incucell“	(MMM Medcenter, Planegg)
Brutschrank „Thermo Electron corporation“	(Thermofisher, Osterode)
Brutschrank „Thermo Scientific“	(Thermofisher, Osterode)
Bunsenbrenner mit automatischer Zündung	(WLD-TEC GmbH, Göttingen)
CLARiStar, Photometer	(BMG Labtech, Ortenberg)
Eismaschine „ZBE 70-35“	(Ziegra, Isernhagen)
Experion	(Biorad, Mercurus, USA)
Flash and Grow	(IUL Instrumentes, Königswinter)
Gefrierschrank	(Liebherr, Einzelhandel)
Laborwaage „Kern PU 360“	(KERN&Sohn GmbH, Balingen)
Laborwaage „SBC22“	(Scaltec Instruments, Heiligenstadt)
Magnetrührer	(IKA, Staufen)

Mikroskop	(Leica Microsysteme, Wetzlar)
Minishaker "MS 1"	(IKA, Staufen)
Nanophotometer Pearl	(Implen, München)
Nitril Handschuhe	(Meditade, Chiemgau)
Pipetten, einstellbar (1-10 μ L, 10-100 μ L, 20-200 μ L, 100-1.000 μ L, 1-5 mL)	(Biohit, Köln)
Pipetten, einstellbar (0,5- 10 μ L)	(Brand, Wertheim)
Pipetten, einstellbar (2- 20 μ L)	(Eppendorf, Hamburg)
Pipetten, einstellbar (200-1.000 μ L, 50 μ L, 100 μ L)	(Gilson, Villers Le Bel, Frankreich)
Pipettierhilfe „accu-jet®“	(Brand, Wertheim)
Reinstwassersystem „GenPure“	(TKA, Niederelbert)
Rüttelplatte „Wiseshake SHO 2D“	(Bendary Group, Korea)
Schüttler „Vortex Genius 3“	(IKA, Staufen)
Schüttler „Vortex Genius 3“	(IKA, Staufen)
Sicherheitswerkbank „Biowizard 130 GL“	(Kojair, Vilppula, Finnland)
Speed Mill	(Analytika Jena, Jena)
Tiefkühlschrank -80°C	(Thermo Electron, Dreieich)
Tiefkühltruhe -80°C „Forma ULT Freezer“	(Thermo Electron, Dreieich)

Tischzentrifuge „Universal 32 R“	(Hettich, Tuttlingen)
Tischzentrifuge „Z233 MK-2“	(HermLe, Wehingen)
Topical Thermocycler	(Biometra, Göttingen)
Transmigrationskammer, 10-Well mit Polycarbonat-Membran 25 x 80 mm, Porengröße 3 µm	(NeuroProbe, Gaithersburg, USA)
Vakuumpumpe „IBS Integra Vacuboy“	(Bioscience, Jena)
Wasserbad „WBU-45“	(Mettmert, Schwabach)
Wasserbad Labor 2	(Mettmert, Schwabach)
Werkbank UVC IT-M-AR	(LFT Labortechnik GmbH, Wasserburg)
Zentrifuge für 96 Wellplatte Universal 320	(Hettich, Zentrifugen, Tuttlingen)
Zentrifuge für Reaktionsgefäß 0,2 mL	(Biozym, Hessisch Oldendorf)
Zentrifuge für Reaktionsgefäß 2 mL, Biofuge mini	(Heraeus, Hanau)

2 Material

2.1 Verbrauchsmaterial

96 Well-Platte für PCR	(4titude, Berlin)
Abdichtungsfolie für Kulturplatte	(4titude, Surrey, UK)
Cryoröhrchen, Cryo ball	(Sarstedt, Nümbrecht)

Einmal-Untersuchungshandschuhe	(Meditrade, Kiefersfelden)
Einmal-Nitrilhandschuhe "Blue Nitril"	(neoLab Migge, Heidelberg)
Eppendorf-Reaktingefäße Rnase/Dnase frei 0,2 mL	(Biozym, Hessisch Oldendorf)
Eppendorf-Reaktingefäße Rnase/Dnase frei 1,5 mL	(Roth, Karlsruhe)
Eppendorf-Reaktionsgefäß, 1,5 mL	(Greiner, Frickenhausen)
Ethanol 70 %	(Roth, Karlsruhe)
Experion Electrophorese Chip	(Biorad, Mercurus, USA)
Experion Electrophorese Prepartion Kid	(Biorad, Mercurus, USA)
FACS-Röhrchen	(Becton Dickinson, Heidelberg)
Gewebekulturplatte 6 well, steril mit Abdeckplatte	(Gechno Plastic Products TPP®, Trasadingen, Schweiz)
Glasperlen	(Roth, Karlsruhe)
Glaspipetten von Absauger in Lamina	(Roth, Karlsruhe)
innuSPEED Tissue RNA Kit	(Analytica Jena, Jena)
Kryoboxen aus Karton	(Zefa Laborservice, Harthausen)
Kryoboxen aus Plastik	(Zefa, Harthausen)
Kulturplatten, 96 well	(ThermoFisher, Dreieich)
Kulturflaschen; Zellkultur 75 cm ² , 15 mL	(VWR International bvba, Belgien)

Laborflaschen mit Gewinde, 250 mL, 500 mL, 1.000 mL	(Schott, Mainz)
Lysetubes innuSPEED 500 μ l; mit Keramik Beads 0,4-0,6 mm	(Analytik Jena, Jena)
Mikro Tube Röhrchen, 2 mL	(Sarstedt, Nümbrecht)
MM Sybrgreen	(Bioline, Luckenwalde)
M-MLV RT 5x Reaction Buffer	(Promega, Madison, USA)
Natriumchlorid (NaCl)	(Sigma-Aldrich, Steinheim)
oligo dt Primer	(Promega, Madison, USA)
Parafilm (Pechiney, Plastic Packaging)	(Roth, Karlsruhe)
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) Dulbecco, ohneCa ⁺⁺ /Mg ⁺⁺	(Biochrom, Berlin)
Pipetten, einstellbar (1-10 μ L, 10-100 μ L, 20-200 μ L, 100-1.000 μ L)	(Brand, Wertheim)
Pipetten, einstellbar (1-10 μ L, 20-200 μ L, 100-1.000 μ L, 1-5 mL)	(Biohit, Köln)
Pipetten, einstellbar „pipetman“ (1-10 μ L, 1-20 μ L, 10-100 μ L)	(Gilson, Villers Le Bel, Frankreich)
Pipettenspitzen "Biohit optifit Tip 5.000 μ L"	(Biohit, Köln) (Hessisch Oldendorf)
Pipettenspitzen 1-10 μ L wei, 10-200 μ L gelb und 100-1.000 μ L blau	(Brand, Wertheim)
Pipettenspitzen, 1.000-5.000 μ L	(Brand, Wertheim)
Pipettenspitzen, 10-100 μ L, 100-1.000 μ L	(Brand, Wertheim)
Pipettenspitzen, 1-10 μ L	(Brand, Wertheim)

Plastibrand 100 µl	(Brand, Wertheim)
Reagenzröhrchen mit Deckel	(VWR International bvba, Leuven)
Recombinant Rnasin®	(Promega, Madison, USA)
RNAlater®	(Sigma-Aldrich, Steinheim)
Rnase/Dnase free Water	(life Technologies, Carlsbad, USA)
Röhrchen, 15 mL Polypropylen	(Greiner, Frickenhausen)
Röhrchen, 50 mL Polypropylen	(Greiner, Frickenhausen)
Serologische Pipetten, 5 mL, 10 mL, 25 mL	(Gechno Plastic Products TPP®, Trasadingen, Schweiz)
TruCount tubes, 5 mL	(Becton Dickinson, Heidelberg)
<i>Vacutainer</i> ® Brand Luer Adapters	(Becton Dickinson, Heidelberg)
<i>Vacutainer</i> ® System, Halter	(Fa. Becton Dickinson, Heidelberg)
<i>Vacutainer</i> ®-Röhrchen, 10 mL, Heparin (170 IU)	(Becton Dickinson, Heidelberg)
Wägeschiffchen, einmal	(Zefa Laborservice, Harthausen)

2.2 Reagenzien

Bacteriostatic Concentrate Solution	(Accuri Cytometers, Großbritannien)
Biocoll®	(Biochrom, Berlin)
Bio&Sell RNA Mini Kit	(Bio&Sell, Nürnberg)

Bovines Serum Albumin (BSA)	(Sigma-Aldrich, Steinheim)
Brain-Hearth Infusion Broth, Trockensubstanz	(Sigma- Aldrich, Steinheim)
Columbia Schafblut-Agar	(Oxoid, Wesel)
Decontamination Concentrate Solution	(Accuri Cytometers, Großbritannien)
DMSO 99,5 %	(Sigma-Aldrich, Missouri, USA)
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)/Ham's Nutrient Mixture F12	(Sigma-Aldrich, Steinheim)
Experion™ RNA-StdSens Analyse Kit	(BioRad, München)
Interleukin-8, human, rekombinant	(PeproTech, Rocky Hill, USA)
Kristallviolett-Galle-Lactose-Agar (VRB-Agar)	(Oxoid, Wesel)
L-Glutamin 200 mM	(Biochrom, Berlin)
Lipopolysaccharid von <i>E. coli</i> 055:B5	(Sigma-Aldrich, Missouri, USA)
Luria/Miller Medium, Trockensubstanz	(Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe)
Natriumchlorid >99,8 %	(Roth, Karlsruhe)
Natriumhypochlorit	(Sigma- Aldrich, Steinheim)
Penicillin 10.000 U/mL/Streptomycin 10.000 µg/mL	(Biochrom, Berlin)
Percoll®	(Biochrom, Berlin)
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) Dulbecco, ohne Ca ⁺⁺ /Mg ⁺⁺	(Biochrom, Berlin)

Trypsin 2,5 %, in PBS Ca ⁺⁺ , Mg ⁺⁺	(Biochrom, Berlin)
Tryptic-Soy-Broth, Trockensubstanz	(Sigma- Aldrich, Steinheim)
Zitronensäure	(Roth, Berlin)

2.3 Versuchstiere

2.3.1 Spendertiere für die Blutgewinnung

Für die Isolierung neutrophiler Granulozyten wurde das Blut (III.3.3) einer Kuh der Rasse „Deutsche Schwarzbunte“ des Typs Holstein-Friesian verwendet. Das Tier stammte aus dem Lehr- und Versuchsgut der Ludwig-Maximilians-Universität München und war klinisch gesund.

2.3.2 Spendertiere für die Gewinnung von Eutergewebe

Bei den Tierversuchen handelte es sich um durch die Regierung Oberbayern genehmigte Versuchsvorhaben mit den Aktenzeichen 55.2-1-54-2531-108-05 sowie 55.2-1-54-2531-102-09.

2.4 Kulturmedien, Puffer und Lösungen

Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) ohne EDTA

Die Bestandteile lagen in den folgenden Konzentrationen vor:

NaCl	8,0 g
KCl	1,24 g
Na ₂ HPO ₄	0,2 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g

Aqua dest. ad 1.000 mL

Die PBS-Trockensubstanz wurde in *Aqua dest.* gelöst. Die Lösung wurde vor Gebrauch autoklaviert und bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

2.4.1 Kulturmedium und Lösungen für die Zellkultur

Die MAC-T wurde in DMEM-F12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Ham's Nutrient Mixture F12) kultiviert. Das Medium wurde mit verschiedenen Zusätzen (s.u.) angereichert. Die Zusätze wurden aliquotiert, bei -20°C gelagert und vor dem Gebrauch bei 37°C im Wasserbad aufgetaut. Das Kulturmedium wurde nach Bedarf frisch gemischt, wobei für eine Kulturflasche 10 mL benötigt wurden.

Medium für die Kultivierung der MAC-T

DMEM-F12

Fetales Kälberserum (FCS) 10 %

Penicillin-Streptomycin 1 %

Glutamin (2 nmol) 1 %

Lösung für das Passagieren der MAC-T (PEM)

PBS Lösung 500 mL

EDTA (2 mmol) 5 mL

Trypsin (2,5 %) 10 mL

PBS (steril) 40 mL

Medium für die Cryokonservierung der MAC-T

Pro Cryotube wurde jeweils 1 mL benötigt:

DMSO (99,5 %) 200 µL

FCS 800 µL

2.4.2 Lipopolysaccharidlösung für die Stimulationsversuche

Für die Stimulationsversuche wurde lyophilisiertes LPS von *E. coli 055:B5* (L6529) der Firma Sigma-Aldrich angeschafft. Die LPS-Trockensubstanz wurde in PBS (III.2.4) zu einer Stammlösung von 1000 µg/mL gelöst. Die Aliquots von 1 mL wurden bei -20°C gelagert. Für die Stimulationsversuche wurde eine Gebrauchslösung von 10 µg/mL LPS benötigt. Hierzu wurden 100 µL der Stocklösung mit 9 mL FCS-freien Mediums (III.2.4.1) verdünnt.

2.4.3 Material für die Separation von Zellen aus Blut

Biocoll[®]

Biocoll[®] dient mit einer Dichte von 1,077 g/mL als Separationslösung. Die Granulozyten wurden mit Hilfe von Biocoll[®] durch eine Dichtegradientenzentrifugation von anderen Leukozyten-Fractionen getrennt.

Phosphatpuffer, doppelt konzentriert (2 x PBS)

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

2.4.4 Lösungen für den Chemotaxis-Assay in der Transmigrationskammer

Percoll[®]

Percoll[®] soll die Adhärenz der wandernden PMN am Boden und an den Wänden der Vertiefungen („Wells“) in der Transmigrationskammer verhindern. Hierzu wurden sowohl die „Wells“ mit dem Probenmaterial, als auch die Positiv- und Negativkontrollen mit unverdünntem Percoll[®] unterschichtet. Percoll[®] besteht aus Silikateilchen, welche mit Polyvinyl-Pyrolidon beschichtet sind. Mit einem spezifischen Gewicht von 1,130 g/mL wird es üblicherweise in der Dichtegradientenzentrifugation verwendet.

Rekombinantes, humanes Interleukin-8

Rekombinantes, humanes IL-8 (rhIL-8) ist ein Chemokin, welches eine starke

chemotaktische und aktivierende Wirkung auf PMN hat. Auf Grund dieser Eigenschaft dient es in der Transmigrationskammer als Positivkontrolle. Das lyophilisiert vorliegende IL-8 wurde in sterilem *Aqua dest.* mit 1 % BSA (Bovines Serum Albumin) auf eine Konzentration von 1000 ng/mL verdünnt. Die Aliquots wurden bei -20°C gelagert. Vor Gebrauch wurde die Lösung mit FCS-freiem Kulturmedium (III.2.4.1) auf eine Gebrauchskonzentration von 100 ng/mL verdünnt.

2.4.5 Lösungen für die Durchflusszytometrie

Zur Reinigung des Gerätes wurde das Messkanalsystem mit steril filtriertem *Aqua dest.*, „Cleaning Solution“ und Dekontaminationslösung gespült.

Cleaning solution

Es wurden 200 mL *Aqua dest.* mit 3 mL 25 %iger Zitronensäure versetzt.

Dekontaminationslösung

Es wurden 180 mL *Aqua dest.* mit 20 mL Natriumhypochlorid versetzt.

Trägerflüssigkeit

Als Trägerflüssigkeit während der Messung wurde entweder PBS oder das jeweilig eingesetzte Kulturmedium verwendet.

Farbstoffe für den Vitalitätsnachweis der Bakterien

Das eingesetzte „LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit“ enthält die Fluorochrome Propidiumjodid (PJ) und SYTO 9. PJ ist ein rotfluoreszierendes Fluorochrom, welches mit doppelsträngiger DNA interkaliert. PJ kann die intakte Zellmembran lebender Zellen nicht durchdringen. Tritt der Zelltod ein oder kommt es zu einer Schädigung der Zellmembran, dann dringt PJ ins Zellinnere ein und bindet an die Nukleinsäuren. PJ dient somit als Marker für membrangeschädigte Zellen. Im Gegensatz dazu besitzt das grünfluoreszierende SYTO 9 die Eigenschaft in lebende Zellen zu penetrieren. Der Farbstoff färbt im Gegensatz zu PJ die Nucleinsäure lebender und toter Zellen. Die Farbstoffe werden eingesetzt um die Zellviabilität durchflusszytometrisch zu erfassen. Bei Verwendung des

Testkits fluoreszieren intakte Zellen grün, während membrangeschädigte (tote) Zellen rot fluoreszieren. Die Exzitations- bzw. Emissionsmaxima liegen für SYTO 9 bei 480/500 nm und für PJ bei 490/635 nm.

Die verwendete Stocklösung von PJ hatte eine Konzentration von 2,4 mM, welche ohne Vorverdünnung verwendet wurde. Von der SYTO 9-Stocklösung (5,0 mM) wurden zunächst zwei Vorverdünnungen von 1:10 und 1:100 hergestellt. Die Aliquots beider Farbstoffe wurden bei -20°C gelagert.

2.4.6 Medien und Zusätze für die Kultivierung von Bakterien und eines Testverfahrens zur Messung antimikrobieller Aktivität

Natriumchlorid-Lösung

NaCl 0,9 %

Brain-Heart-Infusion Broth (BHI)

BHI 37 g

Aqua dest. 1.000 mL

Die BHI-Trockensubstanz wurde in *Aqua dest.* gelöst und anschließend autoklaviert. Das Kulturmedium wurde bei 4°C im Kühlschrank bis zu 14 Tage gelagert.

Trypton-Soy-Broth (TSB)

TSB 30 g

Aqua dest. 1.000 mL

Die TSB-Trockensubstanz wurde in *Aqua dest.* gelöst und anschließend autoklaviert. Das Kulturmedium wurde bei 4°C im Kühlschrank bis zu 14 Tage gelagert.

Luria Bertani-Broth (LB)

LB 25 g

Aqua dest. 1.000 mL

Die LB-Trockensubstanz wurde in *Aqua dest.* gelöst und anschließend autokla-

viert. Das Kulturmedium wurde bei 4°C im Kühlschrank bis zu 14 Tage gelagert.

Polymyxin B

Das Polymyxin B lag als Lösung in einer Konzentration von 1 mg/mL in H₂O vor.

Penicillin/Streptomycin

Die Kombination von Penicillin und Streptomycin lag als Lösung in einer Konzentration von 10.000 U/mL Penicillin und 10.000 µg/mL Streptomycin in H₂O vor.

Lingual antimicrobial Peptide (LAP)

Rekombinantes bovines LAP wurde von der Firma Cusabio bezogen und lag als Lösung in einer Konzentration von 0,5 mg/mL bzw. 0,7 mg/mL vor. Die Lösung wurde auf eine Gebrauchskonzentration von 0,25 mg/mL verdünnt und im Kühlschrank bei 4°C bis zu einer Woche gelagert. Die Katalognummer von LAP lautete CSB-EP 632987BO. Es hat ein Molekulargewicht von 20 kD und ist rekombinant mittels *E. coli* synthetisiert. Der Hersteller gibt eine antibakterielle und fungizide Aktivität mit breitem Wirkungsspektrum an. Das Peptid wurde in einem Puffer aus Tris-HCl, NaCl und Glycerol mit einem pH-Wert von 8 geliefert.

Cathelicidin-4 (CATHL4)

Rekombinantes bovines CATHL4 (Indolicidin) wurde von der Firma Cusabio bezogen und lag als Lösung in einer Konzentration von 1 mg/mL vor. Die Lösung wurde auf eine Gebrauchskonzentration von 0,25 mg/mL verdünnt und im Kühlschrank bei ca. 4°C bis zu einer Woche gelagert. Die Katalognummer von I CATHL4 lautete CSB-EP 341386BO. Es hat ein Molekulargewicht von 16 kD und wurde mittels *E. coli* synthetisiert. Der Hersteller gibt eine starke mikrobiozide Aktivität gegen *S. aureus* und *E. coli* an. Das Peptid wurde in einem Puffer aus Tris-HCl, NaCl und Glycerol mit einem pH- Wert von 8 geliefert.

2.5 Modellpathogene

Bei den im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Bakterienstämmen von *E. coli*, *S. aureus* und *Sc. uberis* handelte es sich um Isolate aus Milch an klinischer Mastitis erkrankter Kühe. Der Stamm *E. coli*₁₃₀₃ und *S. aureus*₁₀₂₇ wurden in der Klinik für Rinder an der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover isoliert. Beide Stämme wurden bereits mehrfach *in vitro* und *in vivo* experimentell eingesetzt (PETZL et al., 2008; GUNTHER et al., 2011; PETZL et al., 2016). Eine umfassende Charakterisierung beider Isolate ist mittlerweile veröffentlicht (WOLF et al., 2011; LEIMBACH et al., 2016). Der Stamm *Sc. uberis*_{O140J} (ATCC® Nummer BAA-854) wurde im Jahre 1972 aus der Milch einer an klinischer Mastitis erkrankten Kuh isoliert und freundlicherweise durch Prof. Jamie Leigh von der Universität in Nottingham, Großbritannien zur Verfügung gestellt. Die eingesetzten Bakterienstämme wurden mittels „Cryobank™“-System bei -80°C gelagert und jeweils für die Durchführung der Versuche frisch ausplattiert (III.3.1).

2.6 Reagenzien für die molekularbiologischen Untersuchungen

Tabelle 2 Mastermix zur Umschreibung in cDNA

Reagenzien	Volumen	Endkonzentration
Oligo (dT) ₁₅ - Primer	1 µl	0,5 µg/µl
tRNA Probe	10 µl	1 ng-1 µg
M-MLV RT 5x Puffer ®	5 µl	1x
dNTP-MIX	1,25 µl	10 nM
RNasin	0,625 µl	2,5 u/µl
M-MLV RT®	1 µl	40 u/µl
H ₂ O RNase free	6,125 µl	
Endvolumen	25 µl	

Tabelle 3 Mastermix für die RT-qPCR

Reagenzien	Volumen	Endkonzentration
2xSensieFast SYBR	10 µl	1x
10 µM forward Primer	0,8 µl	400 nm
10 µM reverse Primer	0,8 µl	400 nm
H2O RNase free	7,4 µl	
Probe	1 µl	200 ng/µl
Endvolumen	20 µl	

2.7 Primer

Die verwendeten Primer für CCL20 und S100A9 wurden im Labor der Klinik für Wiederkäuer abgeleitet (LIND, 2011) und von der Firma MGW aus Ebersberg bezogen. Die Primersequenzen für LAP wurden freundlicherweise durch die Arbeitsgruppe von Prof. Hans-Martin Seyfert vom Leibniz-Institut, Dummerdorf, zur Verfügung gestellt und über die Firma Biomers bezogen. In Tabelle 4 sind die Sequenzen und entsprechenden Referenzen dargestellt.

Tabelle 4 Sequenzen und Referenzen der Primer

Gen	Vorwärts- (for) und Rückwärts- (rev) Primer (5'' → 3'') und Konzentrationen (nmol/L)	Länge des Amplikons	Referenz
CCL20	for GACTGCTGTCTCCGATATACA (300) rev GCCAGCTGCTGTGTGAAGC (300)	71	(LIND et al., 2015)
S100A9	for GGCTAGGGCACTATGACAC (300) rev GGCCACCAGCATAATGAAC (300)	179	(LIND et al., 2015)
LAP	for AGGCTCCATCACCTGCTCCTT rev CCTGCAGCATTACTTGGGCT	182	(GUNTHER et al., 2011)

3 Methoden

Die gesamte Versuchsdurchführung erfolgte in den Laborräumen der Klinik für Wiederkäuer mit Ambulanz und Bestandsbetreuung der Ludwig-Maximilians-Universität in Oberschleißheim.

3.1 Kultivierung einer immortalisierten Milchdrüsenepithelzelllinie (MAC-T) *in vitro*

Die Arbeiten mit der Zellkultur wurden unter der Sterilwerkbank durchgeführt.

3.1.1 Kultivierung und Passagierung

Für die Kultivierung der MAC-T wurde ein kryokonserviertes 1 mL-Aliquot (entspricht der Anzahl an Zellen von zwei konfluenten Kulturflaschen, (siehe III.3.1.2) rasch im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und in ein 15 mL Zentrifugenröhrchen mit 10 mL vorgelegtem Medium überführt. Die Zellen wurden 10 Minuten bei 250 x g und Raumtemperatur in der Zentrifuge ohne Bremse zentrifugiert. Währenddessen wurde das Zellkulturmedium (III.2.4.1) vorbereitet und in 8 Zellkulturflaschen je 9 mL davon vorgelegt. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet in 8 mL Kulturmedium resuspendiert und in jede vorbereitete Kulturflasche je 1 mL Zellsuspension zugegeben. Die Flaschen wurden bei 37°C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Sobald die Zellen angewachsen waren erfolgte der erste Mediumswechsel, danach erfolgte er ca. alle 48 h bis die Zellen zu einem konfluenten „Monolayer“ (einschichtiger Zellrasen) herangewachsen waren.

Der konfluente Monolayer war die Voraussetzung für die Durchführung einer Passage. Hierzu wurde das alte Medium abgesaugt und die Zellen einmal mit 3 mL PEM (III.2.4.1) gespült, da das serumhaltige Medium sonst die Wirkung der folgenden Trypsin-Behandlung hemmen würde. Nach Absaugen der Spülflüssigkeit und erneuter Zugabe von 3 mL PEM wurden die Kulturflaschen für 5 Minuten bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. PEM lockert die Zell-Zell-Verbindungen und verbessert so die Wirkungsbedingungen von Trypsin, welches nachfolgend die Zellen vom Boden der Kulturflaschen löst. Das PEM wurde abgesaugt und 3 mL 0,5 % iges Trypsin auf die Zellen gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 10 Mi-

nuten wurde die Menge der abgelösten Zellen unter dem Lichtmikroskop kontrolliert und gegebenenfalls noch weitere 3 Minuten inkubiert. Wenn sich alle Zellen gelöst hatten wurden 9 mL Medium in die Kulturflasche pipettiert, die Flasche damit mehrmals gespült und die Spülflüssigkeit mit den enthaltenen Zellen in ein Zentrifugen Röhrchen (15 mL) überführt. Die Zellen wurden bei 250 x g für 5 Minuten bei Raumtemperatur ohne Bremse zentrifugiert. Anschließend konnte das Zellpellet in frischem Kulturmedium resuspendiert werden und in neuen Kulturflaschen ausgesät werden. Bei jeder Passage wurden die Zellen einer Kulturflasche auf 4 neue Kulturflaschen aufgeteilt. Um die Ausbeute zu erhöhen wurde der Vorgang einige Male wiederholt bevor die Zellen erneut kryokonserviert wurden.

3.1.2 Kryokonservierung

Für die Kryokonservierung wurden die Zellen zunächst wie unter III.3.1.1 beschrieben für eine Passage aus den Kulturflaschen gelöst und abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 mL Einfriermedium (III.2.4.1) resuspendiert und in Kryotubes (III.2.1) überführt. Um ein langsames und gleichmäßiges Einfrieren zu gewährleisten wurden die Röhrchen zunächst für 24 h in einer Styroporbox in der Gefriertruhe der (-80°C) gelagert. Danach wurden sie in Kunststoffboxen umgepackt.

3.2 Stimulation einer immortalisierten Milchdrüsenepithelzelllinie (MAC-T) *in vitro*

Die MAC-T sollte durch verschiedene Stimuli zur Bildung und Sekretion antimikrobiell und chemotaktisch wirksamer Faktoren angeregt werden. Hierfür kamen LPS und hitzeinaktivierte Bakterien zum Einsatz. Die gewonnenen Zellkulturüberstände wurden nach Stimulationsende auf ihre Funktionalität untersucht. Dabei lag das Augenmerk auf deren chemotaktischer und antimikrobieller Wirkung sowie auf deren PMN-modulierenden Kapazität.

3.2.1 Vorbereitung der MAC-T

Die Zellen wurden wie unter III.3.1 beschrieben kultiviert. Nach der Passage wurden die Zellen je einer Kulturflasche in jeweils eine 6-Well-Platte ausgesät, wobei

pro Stimulationsversuch zwei 6-Well-Platten benötigt wurden. Ungefähr 24 h nach dem Aussähen waren die Zellen zu einem konfluenten Monolayer herangewachsen. Das Wachstumsmedium wurde abgesaugt und die Zellen viermal gründlich mit warmem PBS gewaschen um Serumreste zu entfernen.

3.2.2 Stimulations-Ansatz

Für die Stimulation der Zellen wurden verschiedene Stimulations-Ansätze gewählt. Ein Ansatz wurde mit FCS-freien, LPS-haltigem Medium versetzt. Die LPS Konzentration betrug 5µg/mL. Weiterhin wurden verschiedene Ansätze mit hitzeinaktivierten Bakterien durchgeführt. *E. coli*₁₃₀₃, *S. aureus*₁₀₂₇ und *Sc. uberis*_{O140J} lagen je in einer Konzentration von 10⁴ CFU/mL (CFU; colony forming units) in FCS-freien Medium vor. Als Kontroll-Ansätze diente FCS-freies Wachstumsmedium mit und ohne Anwesenheit von MAC-T. Es folgte eine Inkubationszeit von 24 h bei 37°C und 5 % CO₂ im Brutschrank. Danach wurden die Überstände dreimal resuspendiert und zur vorübergehenden Kryokonservierung (-80°C) in Eppendorfgefäße überführt. Die gewonnenen Zellkulturüberstände aus dem Stimulationsversuch wurden in verschiedenen Versuchen weiterverwendet. Zum einen wurden sie im Chemotaxis-Assay auf ihre chemoattraktive und Wirkung auf PMN untersucht. Zum anderen wurden die Überstände in einem „Time-Kill-Assay“ (siehe III.3.5.1) auf ihr antimikrobielle Wirkung untersucht.

3.3 Gewinnung von venösem Blut

Die Gewinnung der Blutproben fand im Mehrzweckstall des Lehr- und Versuchsguts der Ludwig-Maximilians Universität in Oberschleissheim statt. Das Blut wurde von einem gesunden Versuchstier (III.2.3) unter sterilen Kautelen aus der *Vena jugularis* entnommen. Die Vene wurde mit einer Staukette nach Witte angestaut und das Blut mit einer Butterfly-Kanüle mit angeschlossenem Vacutainer[®]-System (III.2.1) entnommen. Die Vacutainer[®]-Röhrchen waren Natriumheparinat-beschichtet.

3.4 Bestimmung der chemotaktischen Wirkung von Zellkulturüberständen der MAC-T in der Transmigrationskammer

Die Zellkulturüberstände aus den Stimulationsversuchen der MAC-T wurden in einem Chemotaxis-Assay auf ihre Funktionalität untersucht. Es wurde überprüft, ob die MAC-T auf Grund der Stimulation mit LPS, *E. coli*₁₃₀₃, *S. aureus*₁₀₂₇ und *Sc. uberis*_{O140J} chemotaktische Produkte gebildet und in das Medium abgegeben hatte. Mit dem Chemotaxis-Assay kann das Migrationsverhalten von PMN analysiert werden. Hierzu werden die PMN durch chemoattraktive Produkte angelockt, wobei sie aktiv eine Polycarbonat-Membran durchwandern müssen. Die Membran ist 10 µm stark und hat eine Porengröße von 3 µm. Die gewanderten PMN sammeln sich in einer „blinden“ Vertiefung (unteres „Well“) an. Dieses Verfahren bietet somit die Möglichkeit, die Migrationsleistung der Zellen quantitativ zu erfassen und somit funktionelle chemoattraktive Faktoren nachzuweisen.

3.4.1 Zellseparation der neutrophilen Granulozyten aus Blut

Um die PMN aus dem wie unter III.3.3 beschrieben gewonnenen Blut zu isolieren wurden zunächst 15 mL des Vollblutes 1:1 mit 15 mL PBS (III.2.4) in einem 50 mL-Röhrchen verdünnt. Insgesamt 30 mL dieser Mischung wurden vorsichtig mit einer Serumpipette und der Pipettierhilfe Accu-Jet[®] über 15 mL vorgelegtes Bicoll[®] geschichtet, ohne dass die Phasen sich vermischten. Danach folgte die Dichtegradientenzentrifugation für 30 Minuten bei 1.300 x g und 10°C ohne Bremse. Das Serum und die Interphase, welche die mononukleären Zellen enthält, wurden abpipettiert und verworfen. Es verblieb ein Erythrozytensediment, welches ebenfalls die eosinophilen und neutrophilen Granulozyten enthält. Um die Erythrozyten zu entfernen, folgte eine zweimalige Hypotone Lyse: zunächst wurde das Sediment mit PBS auf 10 mL aufgefüllt und gründlich gemischt. Anschließend wurden 20 mL *Aqua dest* zugegeben und das Röhrchen für 20 Sekunden geschwenkt, bevor der Lyseprozess mit 20 mL doppelt konzentriertem (2x) PBS (III.2.4.3) abgebrochen wurde. Nach dem Zentrifugieren für 8 Minuten bei 220 x g und 4°C wurde der Überstand verworfen. Um die restlichen Erythrozyten zu lysieren wurde das Zellpellet erneut in 10 mL PBS resuspendiert und der Lysevorgang sowie die Zentrifugation wiederholt. Die gewonnenen Granulozyten wurden noch einmal mit PBS gewaschen. Hierzu wurde das Zellpellet in 20 mL

PBS resuspendiert und wiederum für 8 Minuten bei 220 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 3 mL Kulturmedium zusammengeführt. Nach der automatischen Zellzahlbestimmung mittels des Sysmex[®] (III.1) konnten die Granulozyten auf die gewünschte Dichte von $5 \cdot 10^6$ PMN/mL eingestellt werden.

3.4.2 Chemotaxis-Assay

Der Chemotaxis-Assay wurde in einer 10-Well-Transmigrationskammer durchgeführt. Diese besteht aus einer Acrylboden- und Deckplatte, einer Silikondichtungsmatte, sechs Schraubmuttern und einer Polycarbonat-Membran. Die Acrylbodenplatte weist zehn Vertiefungen ("blinde" untere Wells) mit Rundböden und je 400 µl Fassungsvermögen auf. Außerdem ragen sechs Gewindestangen senkrecht empor, die der Verankerung und Fixierung der anderen Bestandteile dienen. Die Acryldeckplatte hat passend zu der Bodenplatte zehn Löcher, welche nach dem Zusammenbauen durch die Polycarbonat-Membran unten abgedichtet werden. Diese Vertiefungen fassen dann ein Volumen von 285 µl. Zudem hat die Deckplatte am Rand sechs kleine Löcher zum Durchtritt der Gewindestangen. Die Silikondichtungsmatte hat ebenfalls passend zu den Acrylplatten zehn Aussparungen und sechs kleine Löcher am Rand, um auf die Gewindestange aufgefädelt werden zu können. Die Silikonmatte dient der Abdichtung. Die Polycarbonat-Membran ist etwa 10 µm dick und hat eine Porengröße von 3 µm. Die Membran hat eine glänzende, weniger adhärenente Seite und eine matte, stärker adhärenente Seite. Um die Transmigrationskammer korrekt zusammenzubauen, wird nach der Beschickung der Acrylbodenplatte zunächst vorsichtig die Polycarbonat-Membran mit der glänzenden Seite nach oben aufgelegt. Anschließend wird die Silikondichtungsmatte und die Acryldeckplatte entsprechend ihrer Aussparungen und Gewindelöcher auf der Acrylbodenplatte platziert. Zum Schluss werden die sechs Schraubmuttern mäßig fest angezogen und die Acrylplatten so aufeinandergedrückt.

Die Versuche wurden pro Probe in Doppelansätzen durchgeführt. Die "blinden" Wells der Acrylbodenplatte wurden mit jeweils 300 µl des Probenmaterials bzw. 300 µl Kulturmedium als Negativkontrolle und 300 µl der IL-8 Gebrauchslösung (100 ng/mL, III.2.4.4) beschickt. Um die Adhärenz der migrierenden Granulozyten zu vermindern, wurde jedes Well vorsichtig mit 125-150 µl 100 %igem Per-

coll[®] unterschichtet bis ein positiver Flüssigkeitsmeniskus zu sehen war. Beim Auflegen der Polycarbonat-Membran musste streng darauf geachtet werden, dass sich keine Luftblasen unter der Membran sammeln und dass ein Verrutschen der Membran unbedingt vermieden wurde. Dabei könnte Probenmaterial aus verschiedenen Wells vermischt werden. Die restlichen Teile der Kammer wurden wie beschrieben zusammengesetzt und festgeschraubt. Anschließend wurde in jede Vertiefung der Deckplatte 200 µl der Zellsuspension ($5 \cdot 10^6$ PMN/mL) gegeben. Die Transmigrationskammer wurde für 2 h bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert.

Nach der Inkubation wurde die Zellsuspension (nicht gewanderte Zellen) der oberen Wells vorsichtig resuspendiert, abpipettiert und zur Aufbewahrung jeweils in ein Eppendorfgefäß überführt. Dabei durfte die Polycarbonat-Membran nicht verletzt werden. Nach Entfernen der Schraubmuttern wurde die Deckelplatte, die Silikonmatte und die Membran gleichzeitig waagrecht abgehoben. Die unteren Wells wurden durch Auf- und Abpipettieren gut durchmischt. In 5 mL-Probenröhrchen wurden 125 µL Zellkulturmedium vorgelegt und je 350 µL aus den Wells zugegeben. Bis zur durchflusszytometrischen Messung wurden die Proben auf Eis gelagert.

Nach Versuchsende wurden alle Kammerteile mit *Aqua dest.* gespült und über Nacht an der Luft getrocknet.

3.4.3 Analyse mittels Durchflusszytometrie

Der Probenanalyse mittels Durchflusszytometrie liegt die Messung von Lichtstreuung und Fluoreszenzen zu Grunde. Für die Versuche wurde das Gerät BD Accuri[™] C6 verwendet. Dieses enthält zwei Laser der Wellenlängen 488 nm und 640 nm sowie zwei Detektoren für Streulicht und vier Fluoreszenzdetektoren. Jedes Messereignis wird durch sechs Parameter charakterisiert. Das Probenmaterial wird im rechten Winkel an einem fokussierten Lichtstrahl (Laser) vorbeigeleitet. Trifft der Lichtstrahl auf eine Zelle, so streut diese das Licht. Die Lichtstreuung wird von den Zelleigenschaften beeinflusst. Das Vorwärtsstreulicht (FCS; Forward Scatter) wird maximal in einem Winkel von 10° zum Laserstrahl abgelenkt. Es erfasst die Querschnittsfläche der Partikel und gibt damit Auskunft über die Partikelgröße. Das Seitwärtsstreulicht (SCC; Side Scatter) wird in einem Win-

kel von 90° zum Laserstrahl abgelenkt. Es spiegelt durch die Erfassung des Refraktionsindex die Komplexität des Partikels, also seine Granularität und Oberflächenstruktur wieder. Außerdem wird von jedem Partikel mit entsprechenden Detektoren Fluoreszenz- Emissionen in vier verschiedenen Wellenlängenbereichen (FL1 = Grünfluoreszenz: 530 ± 15 nm; FL2 = Orangefluoreszenz: 585 ± 20 nm; FL3 = Rotfluoreszenz: > 650 nm; FL4 = Violettfluoreszenz: 675 ± 12,5 nm) gemessen. Die charakteristischen Licht- und Fluoreszenzsignale (FCS, SCC, FL1, FL2, FL3, FL4) werden digital gespeichert (RADBRUCH, 2000). Die Auswertung der Messungen erfolgte im FCS 3.0 Datenformat mit der Software FCS Express™.

3.4.4 Ermittlung der relativen Transmigrationsrate

Die Transmigrationsrate beschreibt, wie viele der eingesetzten PMN aus dem oberen „Well“ dem chemotaktischen Reiz gefolgt sind und aktiv durch die Membran in das untere „Well“ gewandert sind. Im Versuchsansatz wurden zu Beginn $1 \cdot 10^6$ PMN in das obere „Well“ eingesetzt ($5 \cdot 10^6$ PMN/mL).

Als Positivkontrollen wurden die Migrationsraten von PMN nach Einsatz von 100 ng/mL rhIL-8 (III.2.4.4) der jeweiligen Kammer herangezogen und gleich 100 % gesetzt. Die weiteren Migrationsraten wurden in Bezug auf die Positivkontrollen der jeweiligen Kammer bezogen, um tagesabhängige Schwankungen zu relativieren. Die Formel zur Ermittlung der relativen Migrationsrate lautete wie folgt:

$$\text{relative Migrationsrate} = \text{Anzahl PMN Ansatz} * \frac{100}{\text{Anzahl PMN (Positivkontrolle)}}$$

3.5 Funktionelle Untersuchungen zur antimikrobiellen Aktivität von Zellkulturüberständen

Die Zellkulturüberstände aus Stimulationsversuchen mit der Zelllinie MAC-T (III.3.2) sollten in einem „Time-Kill-Assay“ (III.3.5.1) auf ihre potentielle antimikrobielle Wirkung untersucht werden. Hierbei sollte geprüft werden, ob die MAC-T aufgrund einer Stimulation mit LPS, *E. coli*₁₃₀₃, *S. aureus*₁₀₂₇ und *Sc. uberis*_{O140J} antimikrobiell aktive Stoffe in das Medium abgibt.

3.5.1 Time-Kill-Assay

Mit dem Time Kill Assay sollte das Wachstumsverhalten bzw. eine Wachstumshemmung der Modellpathogene zeitabhängig dargestellt werden. Möglicherweise sezernierte antimikrobiell wirksame Stoffe in den Überständen könnten das Wachstum der Bakterien hemmen oder verlangsamen. Das Wachstum der Bakterien wurde stündlich anhand der optischen Dichte bestimmt. Die Anzucht und Herstellung der Gebrauchskonzentration der Modellpathogene erfolgten wie unter (III.3.6) aufgeführt. Zur Versuchsdurchführung wurde eine 96-Well-Flachbodenplatte verwendet. Jeder zu testende Überstand aus den Stimulationsversuchen mit der MAC-T Zelle wurde einfach jeweils mit *E. coli*₁₃₀₃, *S. aureus*₁₀₂₇ und *Sc. uberis*_{O140J} beimpft. Außerdem wurde Polymyxin B in den Konzentrationen 100 µg, 10 µg, 1 µg und 0,1 µg pro Well für jeden getesteten Keim als Kontrolle zugesetzt. Weiterhin wurde LB-Medium ohne antimikrobiellen Zusatz mitgemessen. In jedes „Well“ wurde zunächst die entsprechende Menge LB-Medium vorgelegt, sodass am Ende mit den Bakterien und den zu testenden Überständen 300 µL Volumen je „Well“ vorlagen. Von *E. coli*₁₃₀₃, *S. aureus*₁₀₂₇ und *Sc. uberis*_{O140J} wurden pro „Well“ je 20 µl der Gebrauchskonzentrationen in die „Wells“ pipettiert. Dies entsprach einer Anzahl CFU/Well von $3,06 \cdot 10^4$ *E. coli*₁₃₀₃, $2,16 \cdot 10^5$ *S. aureus*₁₀₂₇, sowie $1,38 \cdot 10^4$ *Sc. uberis*_{O140J}. Von den Überständen wurden außerdem je 180 µl pro Well zugegeben. Die beschickte und mit Folie abgeklebte Platte wurde über sechs Stunden bei 37°C inkubiert und stündlich die OD600 gemessen, um die zeitabhängige Wachstumshemmung des Bakterienwachstums darzustellen.

3.6 Kultivierung und Präparation der Modellpathogene *in vitro*

Für die Versuche wurde mit den Bakterienstämmen *E. coli*₁₃₀₃, *S. aureus*₁₀₂₇ und *Sc. uberis*_{O140J} gearbeitet. Zur Ermittlung des durchschnittlichen Wachstumsverhaltens wurde zunächst eine tiefgefrorene Ablage von *E. coli*₁₃₀₃ auf Kristallviolett-Galle-Lactose-Agar (VRB), sowie eine tiefgefrorene Ablage von *S. aureus*₁₀₂₇ auf Columbia-Schafblut-Agar (CSB) ausplattiert. *Sc. uberis*_{O140J} lag als flüssiges Aliquot vor und wurde mittels einer Öse auf einer CSB-Platte ausgestrichen. Die Agarplatten wurden anschließend 24 h bei 37°C inkubiert und danach bis zu drei

Wochen im Kühlschrank aufbewahrt. Zur weiteren Kultivierung der Bakterien wurden in zwei Reagenzgläser je 10 mL der BHI vorgelegt und mittels einer abgeflamnten Öse jeweils einige Kolonien von *E. coli*₁₃₀₃, *S. aureus*₁₀₂₇ und *Sc. uberis*_{O140J} zugegeben. Nach Verschluss der Röhrchen und gründlichem Rütteln folgte eine weitere Inkubation für 6 h bei 37°C auf der Rüttelplatte. Anschließend wurden je 9,9 mL TSB in zwei frische Reagenzgläser vorgelegt und nach erneutem gründlichen Vortexen je 100 µl der Bakteriensuspensionen hinzu pipettiert. Nach guter Durchmischung erfolgte eine weitere Inkubation für 18 h bei 37°C auf der Rüttelplatte. Um eine definierte Anzahl an CFU zu erhalten, wurden aus den Suspensionen von *E. coli*₁₃₀₃, *S. aureus*₁₀₂₇ und *Sc. uberis*_{O140J} Verdünnungsreihen erstellt und diese ausplattiert. Hierzu wurden zunächst Reagenzröhrchen mit 9 mL 0,9 %iger Natriumchloridlösung vorbereitet und entsprechend beschriftet. Die Verdünnungen erfolgten in Zehnerschritten bis zu der Stufe 10⁻⁸. Anschließend wurden aus den Verdünnungsstufen 10⁻⁶ bis 10⁻⁸ je 100 µL auf VRB-Agar für *E. coli*₁₃₀₃ bzw. CSB-Agar für *S. aureus*₁₀₂₇ und *Sc. uberis*_{O140J} ausplattiert. Die auf den Agarplatten aufgetragenen Bakteriensuspensionen wurden mit Hilfe von 10 sterilen Glasperlen durch leichtes Schütteln der Agarplatten gleichmäßig verteilt. Jede der Verdünnungsstufen wurde in Triplikaten ausplattiert. Anschließend wurden die Platten über 24 h bei 37°C inkubiert.

In die Auswertung aufgenommen wurden Platten, auf denen mindestens 3 und maximal 300 Kolonien gewachsen waren. Mit der folgenden Formel konnte so die Anzahl CFU in der Ursprungssuspension errechnet werden (III.3.6.1.)

Nach >7 Wiederholungen der unter (III.3.6) angeführten Arbeitsschritte lagen ausreichend Ergebnisse der CFU/mL in der Ursprungssuspension vor. Anhand des Mittelwertes dieser Zahlen konnte in darauffolgenden Versuchsansätzen jede gewünschte Anzahl CFU/mL durch eine entsprechende Verdünnung mit 0,9% NaCl-Lösung eingestellt werden. Dies wurde durch erneutes Ausplattieren und Inkubieren für 24 h bei 37°C kontrolliert.

3.6.1 Ermittlung einer Wachstumskurve für die eingesetzten Modellpathogene

Die Lagerung und Anzucht der Modellpathogene erfolgte wie unter (III.3.6) beschrieben. Die Bakterienkolonien wurden von den bewachsenen Kulturplatten aus dem Kühlschrank (4°C) zur weiteren Kultivierung eingesetzt. In drei Reagenzglä-

serten wurden je 10 mL des LB-Mediums vorgelegt und mittels einer abgeflamten Öse jeweils einzelne Kolonien von *E. coli*₁₃₀₃, *S. aureus*₁₀₂₇ und *Sc. uberis*_{O140J} zugegeben. Nach Verschluss der Röhren und gründlichem Durchmischen folgte eine Inkubation über 18 h bei 37°C auf der Rüttelplatte. Anschließend wurden von den drei Bakteriensuspensionen je 300 µL in eine 96-Well-Flachbodenplatte überführt und im Plattenphotometer die OD₆₀₀ bestimmt. Daraufhin wurde die benötigte Menge der Ausgangssuspension errechnet, um eine Lösung (Starterkultur) für jedes Modellpathogen mit einer OD₆₀₀ von 0,02 herzustellen. Das fehlende Volumen wurde mit LB-Boullion auf die gewünschte Ansatzmenge (10 mL) ergänzt und die Reagenzröhren auf dem Rüttler bei 37°C weiter inkubiert.

Für die Ermittlung der Wachstumskurven für die drei Modellpathogene wurde nach der Herstellung der Starterkulturen mit einer OD₆₀₀ von 0,02 stündlich über sieben Stunden die OD₆₀₀ gemessen. Um zu den gemessenen OD₆₀₀-Werten eine definierte Anzahl an CFU/mL zu erhalten, wurden jeweils zu den gleichen Zeitpunkten von den Bakteriensuspensionen Verdünnungsreihen erstellt und diese ausplattiert. Hierzu wurden zunächst Reagenzröhren mit 9 mL 0,9%iger Natriumchloridlösung vorbereitet. Die Verdünnungen erfolgten in Zehnerschritten Pathogen- und Zeitabhängig bis zu 10⁻⁹. Anschließend wurden aus den jeweils benötigten Verdünnungsstufen je 100 µL auf VRB-Agar für *E. coli*₁₃₀₃ bzw. CSB-Agar für *S. aureus*₁₀₂₇ und *Sc. uberis*_{O140J} ausplattiert. Die aufpipettierte Bakteriensuspensionen wurden mit Hilfe von 10 sterilen Glasperlen durch leichtes Schütteln der Agarplatten gleichmäßig verteilt. Jede der Verdünnungsstufen wurde in Triplikaten ausplattiert. Anschließend wurden die Platten 24 h bei 37°C inkubiert.

In die Auswertung aufgenommen wurden Platten, auf denen zwischen mindestens 3 und maximal 300 Kolonien gewachsen waren. Mit der folgenden Formel konnte so die durchschnittliche Anzahl der CFU/mL in der Ursprungssuspension errechnet werden.

CFU/mL=

$$\frac{\text{Summe aller CFU}}{(\text{Anzahl Platten niedrigere Verdünnung} * 1) + (\text{Anzahl Platten höhere Verdünnung} * 0,1)}$$

* (Faktor der niedrigeren Verdünnung)

Anhand aller ermittelten Werte und der daraus ermittelten Wachstumskurve kann-

te für die folgenden Versuche die Anzahl CFU/mL anhand der gemessenen OD₆₀₀ nach 18 h Inkubation errechnet werden und beliebig auf die gewünschte Anzahl CFU/mL oder eine gewünschte OD₆₀₀ eingestellt werden.

3.7 Methoden zur Ermittlung antimikrobieller Aktivität

3.7.1 Time-Kill-Assay

Mit dem ‘Time-Kill-Assay’ wurde das zeitlich abhängige Absterben der Modellpathogene nach Hinzugabe von entweder einem Antibiotikum, isolierter PMN oder ausgesuchter Antimikrobieller Peptide (AMP) in 96-Well-Platten mit Rundboden untersucht. Die Proben wurden jeweils über eine Zeitdauer von sechs Stunden stündlich photometrisch gemessen (OD₆₀₀). So konnte eine Zeitabhängige Darstellung des bakteriellen Wachstums bzw. seiner Hemmung bei den eingesetzten Modellpathogenen erzielt werden.

Die Anzucht der Modellpathogene erfolgte für alle Ansätze wie unter (III.3.6) beschrieben. Nach dem Einstellen der Starterkulturen auf eine OD₆₀₀ von 0,02 wurden diese für 1,5 h bis zur mittleren Log-Phase bei 37°C weiter inkubiert. Anschließend wurden je 300 µl von jeder Bakteriensuspension in eine 96-Well-Platte überführt und diese wiederum bei OD₆₀₀ photometrisch gemessen. Anhand der erstellten Wachstumskurve konnten folgende Medianwerte von CFU/mL zum Zeitpunkt 1,5 h ermittelt werden:

Tabelle 5 Medianwerte von CFU/mL zum Zeitpunkt 1,5h

Modellpathogen	Median CFU/mL
<i>E. coli</i> ₁₃₀₃	1,53*10 ⁶
<i>S. aureus</i> ₁₀₂₇	1,08*10 ⁷
<i>Sc. uberis</i> _{O140J}	6,90*10 ⁵

Von den Bakteriensuspensionen wurden nach gründlichem Durchmischen je 20 µl zur weiteren Versuchsdurchführung verwendet. Damit ergab sich bei einem Versuchsansatz aus insgesamt 300 µl/Well (20 µl Bakteriensuspension + 280 µl weitere Reagenzien) eine Gebrauchskonzentration von 1,02*10⁵ CFU/mL *E. coli*₁₃₀₃,

$7,2 \cdot 10^5$ CFU/mL *S. aureus*₁₀₂₇ sowie $4,6 \cdot 10^4$ CFU/mL *Sc. uberis*_{O140J}. Das entsprach einem Einsatz CFU/Well von $3,06 \cdot 10^4$ *E. coli*₁₃₀₃, $2,16 \cdot 10^5$ *S. aureus*₁₀₂₇, sowie $1,38 \cdot 10^4$ *Sc. uberis*_{O140J}.

3.7.1.1 Ermittlung der Wirkung eingesetzter Antibiotika gegenüber Mastitis-Pathogenen *in vitro*

In Vorversuchen wurden mit den antibiotischen Wirkstoffen Polymyxin B und Penicillin/Streptomycin (PS) die minimale Hemmstoffkonzentration (MHK) für eine definierte Anzahl CFU/mL ermittelt. Aufgrund seiner wachstumshemmenden Effekte gegenüber allen eingesetzten Mastitis-Pathogenen als auch seiner strukturellen Verwandtschaft zu den AMP wurde Polymyxin B des Weiteren als Negativkontrolle eingesetzt.

Die Gebrauchskonzentration von $1,02 \cdot 10^5$ CFU/mL *E. coli*₁₃₀₃, $7,2 \cdot 10^5$ CFU/mL *S. aureus*₁₀₂₇, sowie $4,6 \cdot 10^4$ CFU/mL *Sc. uberis*_{O140J} wurden wie unter (III.3.6.13.6.1) beschrieben hergestellt. Pro Modellpathogen wurde eine 96-Well-Platte verwendet. Pro Well wurden 200 µL der vorbereiteten Verdünnungen verwendet. Von den eingesetzten Antibiotika wurden vorab Verdünnungsreihen in Zehnerschritten (bis 10^{-9}) vorbereitet, wobei das Polymyxin B eine Ursprungskonzentration von 1 mg/mL hatte und das PS eine Konzentration von 10.000 U/mL Penicillin bzw. 10.000 µg/mL Streptomycin enthielt. Zudem wurden sowohl LB-Medium ohne Pathogene oder antibiotischen Zusatz (Negativ-Kontrolle) als auch LB-Medium mit Pathogenen, aber ohne antibiotischen Zusatz (Positiv-Kontrolle) verwendet.

Die beschickten 96-Well-Platten wurden über 6 h bei 37°C inkubiert und stündlich die OD₆₀₀ photometrisch gemessen. Anschließend konnte aus den gewonnenen Werten die minimale Hemmstoffkonzentration abgeleitet werden.

3.7.1.2 Ermittlung der Wirkung von PMN gegenüber Mastitis-Pathogenen *in vitro*

Die Blutentnahme und die Gewinnung der PMN erfolgten wie unter (III.3.3) bzw. (III.3.4.1) beschrieben. Die Anzahl der PMN wurde im Sysmex[®] elektronisch gezählt und anschließend auf eine Konzentration von $1,6 \cdot 10^7$ mit LB-Medium eingestellt. Außerdem wurde eine Verdünnungsreihe mit einem Verdünnungsfak-

tor von 1:10 in Medium bis $1,6 \times 10^4$ hergestellt.

Die Anzucht und Herstellung der Gebrauchskonzentration der Modellpathogene erfolgten wie bereits unter (III.3.6.1) aufgeführt.

Zur Versuchsdurchführung wurde eine 96-Well-Flachbodenplatte verwendet und jede zu testende Verdünnungsstufe der PMN wurde in Triplikaten angesetzt. Außerdem wurde Polymyxin B in den Konzentrationen 100 µg, 10 µg, 1 µg und 0,1 µg pro Well für jedes Modellpathogen als Positivkontrolle einer Wachstumshemmung getestet. Als Negativ-Kontrolle diente LB-Medium. In jedes Well wurde zunächst die entsprechende Menge LB-Medium vorgelegt, so dass am Ende 300 µL Volumen je Well vorlagen. Von *E. coli*₁₃₀₃, *S. aureus*₁₀₂₇ und *Sc. uberis*_{O140J} wurden pro Well je 20 µl der Gebrauchskonzentrationen in die Wells pipettiert. Von den Verdünnungsstufen der PMN wurden außerdem je 100 µl pro Well zugegeben. Die beschickten und mit Folie abgeklebten Platten wurden über sechs Stunden bei 37°C inkubiert und stündlich die OD₆₀₀ photometrisch gemessen.

3.7.1.3 Ermittlung der Wirkung ausgesuchter Antimikrobieller Peptide (AMP) gegenüber Mastitis-Pathogenen *in vitro*

Die Anzucht der Modellpathogene, sowie die Einstellung der Gebrauchskonzentrationen erfolgte wie unter (III.3.6.1) beschrieben.

Das antimikrobielle LAP lag in einer Ursprungskonzentration von 0,5 mg/mL vor. Zunächst wurde es in PBS 1:1 auf 0,25 mg/mL verdünnt. Zur Versuchsdurchführung wurde eine 96-Well-Flachbodenplatte verwendet. Jedes der Modellpathogene und die zu testende Konzentration von LAP wurden in Triplikaten angesetzt. Außerdem wurde Polymyxin B in den Konzentrationen 100 µg, 10 µg, 1 µg und 0,1 µg pro Well für jedes Modellpathogen als Positivkontrolle einer Wachstumshemmung getestet. Als Negativ-Kontrolle diente LB-Medium. In jedes Well wurde zunächst die entsprechende Menge LB-Medium vorgelegt, so dass final 300 µL Volumen je Well vorlagen. Von *E. coli*₁₃₀₃, *S. aureus*₁₀₂₇ und *Sc. uberis*_{O140J} wurden pro Well je 20 µl der Gebrauchskonzentrationen in die Wells pipettiert. Das LAP wurde in Konzentrationen von 0,025 mg/Well und 0,0125 mg/Well getestet. Die beschickte und mit Folie abgeklebte Platte wurde über sechs Stunden bei

37°C inkubiert und stündlich die OD₆₀₀ photometrisch gemessen. Der gleiche Versuchsansatz wurde mit Indolicidin (CATL4) anstelle von LAP durchgeführt. Die getesteten Konzentrationen waren ebenfalls 0,025 mg und 0,0125 mg/Well.

3.7.2 Durchflusszytometrische Erfassung vitaler und nicht-vitaler Bakterien

Das zeitabhängige Absterben von *E. coli*₁₃₀₃ und *S. aureus*₁₀₂₇ sollte nach Zugabe antimikrobiell wirksamer Substanzen mittels einer Lebend-Tot Färbung durchflusszytometrisch erfasst werden. Diese Methodik wurde im hauseigenen Labor im Rahmen der vorliegenden Arbeit zwar für bekannte Mengen vitaler und nicht-vitaler Bakterien etabliert, fand jedoch keine Verwendung bei der Ermittlung der antimikrobiellen Wirkung von AMP und PMN auf Mastitis-Pathogene.

Die Anzucht der Modellpathogene erfolgte im Prinzip wie unter (III.3.6) beschrieben. Allerdings betrug die erste Inkubationszeit in BHI 18 h bei 37°C und die zweite Inkubationszeit in TSB nur 3 h bei 37°C. Anschließend wurde die Anzahl CFU/mL in der Suspension durchflusszytometrisch ermittelt. Um die gewünschte Anzahl von 10⁷ CFU/mL einzustellen, wurden die Suspensionen mit *Aqua dest.* entsprechend verdünnt. Anschließend wurde ein Teil der Bakterien bei 60°C im Wasserbad für 60 Minuten hitzeinaktiviert. Die Farbstoffe SYTO9 und PJ des 'LIVE/DEAD Testkits' wurden wie unter III.2.4.5 vorbereitet. Für *E. coli*₁₃₀₃ wurden 496,5 µL der Bakteriensuspension (10⁷CFU/mL) mit 2 µL PJ-Stocklösung, sowie 1,5 µL der SYTO9 Vorverdünnung (1:10) gemischt. Entsprechend wurden für *S. aureus*₁₀₂₇ 498 µL der Bakteriensuspension (10⁷ CFU/mL) mit 1 µL PJ-Stocklösung und 1 µL SYTO9 Vorverdünnung (1:100) gemischt. So hatte PJ bei *E. coli*₁₃₀₃-Ansätzen eine Endkonzentration von 9,6 µM und bei *S. aureus*₁₀₂₇-Ansätzen eine Endkonzentration von 4,8 µM. Die Endkonzentration von SYTO9 lag bei bei 1,5 nM (*E. coli*₁₃₀₃) und bei 100 nM (*S. aureus*₁₀₂₇). Die Bakteriensuspensionen wurden als erstes mit SYTO9 versetzt, 15 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend im Durchflusszytometer gemessen. Danach wurde PJ zugegeben, nochmals 15 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert und erneut gemessen.

3.8 Mastitis-Infektionsversuch

Die im Rahmen dieser Arbeit analysierten Gewebeproben entstammten zwei Mastitis-Infektionsversuchen, die im Rahmen assoziierter Projekte durchgeführt wurden (WALDMÜLLER, 2012). Es handelte sich hierbei um allgemein- und eutergesunde Kühe der Rasse Holstein-Friesian. Etwa zwei Wochen vor errechnetem Kalbetermin wurden die Versuchstiere in der Klinik für Wiederkäuer der Ludwig-Maximilians-Universität München in Einzelhaltung aufgestellt. Die Tiere standen auf Gummimatten mit Stroheinstreu und wurden mit Heu *ad libitum* und nach der Kalbung mit TMR *ad libitum* sowie leistungsabhängigen Mengen an Kraftfutter und Getreideschrot gefüttert. Ab dem Zeitpunkt der Einstallung standen die Tiere ganztägig unter Geburtsüberwachung und wurden alle 3 h durch eine Person kontrolliert und mindestens einmal pro Tag rektal untersucht.

3.8.1 Induktion einer experimentellen Mastitis

Eine Übersicht zum zeitlichen Ablauf und zu Behandlung der einzelnen Versuchsgruppen ist in Abbildung 1 wiedergegeben. Insgesamt gab es drei Tiergruppen die zur Gewinnung von mammärem Gewebe herangezogen wurden: Die Tiere der Gruppe „LPS_EC“ (LPS Behandlung vor *E. coli* Infektion; LPS_EC) erhielten ca. 24-48 h nach der Kalbung in jedes Euterviertel eine Vorbehandlung mit 1 µg LPS/5 mL 0,9%iger NaCl-Lösung. Nach 72 h wurde jeweils das Viertel, das zu diesem Zeitpunkt den niedrigsten SCC aufwies, mit 500 CFU *E. coli*₁₃₀₃ experimentell infiziert. Die Tiere der Gruppe „EC“ (*E. coli*) wurden keiner Vorbehandlung unterzogen und maximal 72-156 h nach der Kalbung in dem Euterviertel mit dem niedrigsten SCC analog zu „LPS_EC“ mit *E. coli* infiziert. Die Tiere wurden 24 h nach *E. coli*-Infektion getötet, und es erfolgte die Entnahme von lobuloalveolärem Drüsenparenchym. Keines der Versuchstiere wurde im Versuchszeitraum mit antimikrobiellen oder antiphlogistischen Therapeutika behandelt. Die Tiere der Gruppe „GS“ (Goldstandard) erhielten keinerlei Behandlung. Es handelte sich hierbei ausschließlich um erstlaktierende Kühe in der Mitte der Laktation (2. - 6. Laktationsmonat, SCC < 50.000 Zellen/mL Milch).

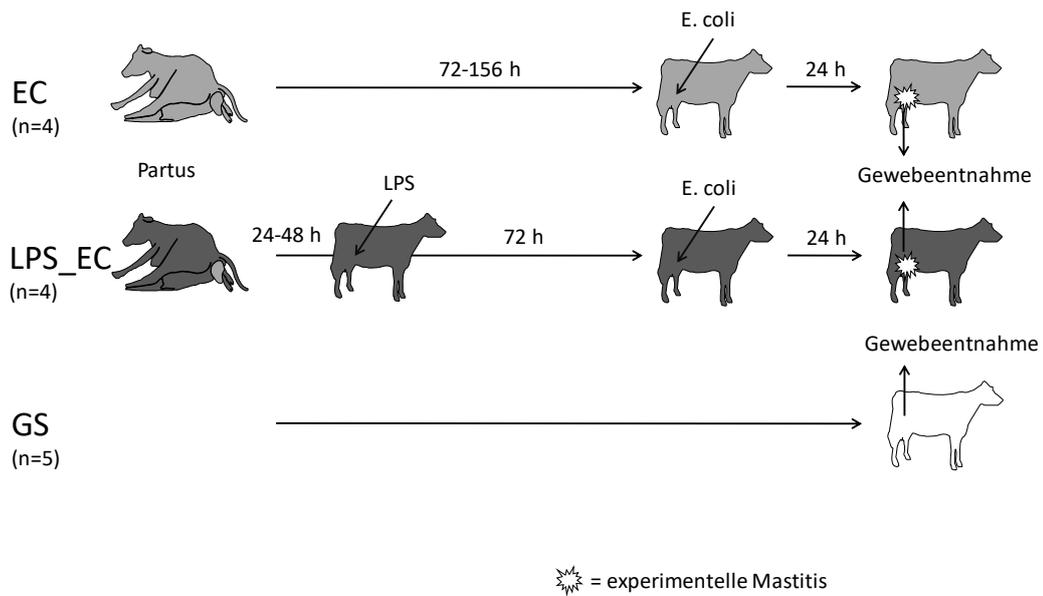


Abbildung 1 Mastitis-Infektionsversuch zur Untersuchung des Einflusses einer intramammären LPS-Vorbehandlung auf die Expression antimikrobieller Peptide im Eutergewebe

Die Gruppe „EC“ (n=4) wurde auf dem zellniedrigste Viertel 72-500 CFU *E. coli* infiziert. Die Gruppe „LPS_EC“ wurde 24-48 h nach der Kalbung auf jedem Euterviertel mit 1 µg LPS vorbehandelt. 72 h später wurde jeweils das Viertel mit dem niedrigsten Zellgehalt eines Tieres mit 500 CFU *E. coli* experimentell infiziert. Die Tiere wurden 24 h nach experimenteller Infektion getötet und Gewebeproben aus dem Euterparenchym entnommen. Die Tiere der Gruppe „GS“ (Goldstandard) erhielten keinerlei Behandlung und dienten nur der Gewebegewinnung.

3.8.2 Gewinnung von Gewebeproben

Zum Zeitpunkt 24 h nach experimenteller Infektion wurden die Versuchstiere im Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL), Oberschleißheim nach Betäubung mittels Bolzenschuss unter Blutentzug getötet. Innerhalb von 15 min nach Tötung wurden Gewebeproben aus distalen Anteilen des Drüsenparenchyms gewonnen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur weiteren Aufarbeitung wurden die Gewebeproben bei -80°C gelagert.

3.9 Real Time quantitative Polymerase Kettenreaktion (RT-qPCR)

Mit der Reversen Transkription von RNA kann ein Zellprodukt auf molekularbiologischer Ebene nachgewiesen werden. Das gesuchte Zielgen kann mittels quantitativer Real Time PCR (RT-qPCR) aus der gebildeten cDNA isoliert werden. An-

hand von Standardkurven können die Transkript-Abundanzen für das gesuchte Gen anschließend absolut quantifiziert werden. Die im Folgenden beschriebenen Methoden zur RT-qPCR wurden in Anlehnung an vorangegangene Arbeiten beschrieben und durchgeführt (LIND, 2011).

3.9.1 Extraktion der mRNA

Die Aufbereitung der mRNA erfolgte mit Hilfe eines Extraktionskits der Firma Bio&Sell (III.2.2) bei Raumtemperatur. Vor Beginn der Extraktion wurden 70 mL 99%igen Ethanol zu der im Kit enthaltenen Flasche mit Waschpuffer HS sowie 160 mL 99%igen Ethanol zu der im Kit enthaltenen Flasche mit Waschpuffer LS zugegeben. Der Inhalt der Flaschen wurde gründlich gemischt und verschlossen aufbewahrt. Zur Zerkleinerung der Gewebestücke (1 mm x 3 mm) wurden diese in ein Röhrchen mit Keramik-Kügelchen überführt und mit 400 µL Lysis-Puffer versetzt. Danach wurden die Proben gründlich für 2 x 2 min bei einer Frequenz von 50 Hz homogenisiert. Dazwischen erfolgte eine Pause über 1 min um eine Überhitzung des Gewebes zu vermeiden. Die homogenisierte Probe wurde bei 13.000 xg für 2 min zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgenommen und in ein 2 mL Sammel-Röhrchen mit eingesetzter Zentrifugationssäule überführt. Die Säule wurde mit geschlossenem Deckel für weitere 2 min bei 10.000 xg zentrifugiert. Anschließend wurde die Zentrifugationssäule verworfen, das Filtrat mit der gleichen Menge 70%igen Ethanol versetzt und auf eine frische Zentrifugationssäule in einem Sammel-Röhrchen pipettiert. Nach einer Zentrifugation von 2 min bei 10.000 xg wurde das Sammel-Röhrchen mit dem Filtrat verworfen und die Säule in ein neues Sammel-Röhrchen gestellt. Zum Waschen der Probe wurden 500 µL Waschpuffer HS auf die Säule pipettiert und geschlossen für 1 min bei 10.000 xg zentrifugiert. Das Sammel-Röhrchen mit dem Filtrat wurde verworfen und die Säule in ein neues Sammel-Röhrchen gestellt. Es folgte ein zweiter Waschschriff mit 700 µL Waschpuffer LS und erneuter Zentrifugation. Das Sammel-Röhrchen mit dem Filtrat wurde verworfen und die Säule in ein neues Sammel-Röhrchen gestellt. Zum Trocknen der Säule und zur Entfernung der Ethanolreste folgte eine weitere Zentrifugation für 2 min bei 10.000 xg. Das Sammel-Röhrchen mit dem Filtrat wurde verworfen und die Säule in ein 1,5 mL Elutions-Röhrchen gestellt. Zur Elution der RNA wurden 80 µL RNase-freies Wasser auf die Mitte der Säule pipettiert, für 1 min bei Raumtemperatur inkubiert und bei

600 xg für 1 min zentrifugiert. In dem gewonnenen Eluat war die gereinigte RNA enthalten.

3.9.2 Messung der RNA-Integrität

Die Qualität und Menge der RNA wurde mittels eines ExperionTMRNA-StdSens-Analysis Kits (III.2.2) bestimmt. Das Prinzip des Test-Kits beruht dabei auf einer automatisierten Gelelektrophorese. Das System besteht aus einem Chip für 12 Proben, einer Station für die Präparation des Chips und dem Analysator, in dem die eigentliche Gelelektrophorese stattfindet. Der Testchip wurde anhand der im Testkit enthaltenen Anleitung beschickt und anschließend in der ExperionTM-Automated Electrophoresis-Station analysiert. Die Ergebnisse wurden graphisch dargestellt und als Datensatz mit der entsprechenden Hersteller-Software abgerufen. Die Software ermittelt hierbei die quantitative Bestimmung der RNA-Integrität, welche anschließend als RNA-Qualitäts-Index (RQI) ausgedrückt wird. Die Werte werden auf einer Skala von 1 (denaturierte RNA) bis 10 (intakte RNA) dargestellt und ermöglichen so eine schnelle Beurteilung der Probenqualität. Für die folgenden Schritte wurden ausschließlich Proben mit einem RQI > 6 verwendet.

3.9.3 Reverse Transkription zur Synthese von cDNA

Die aus den Gewebeproben gewonnene RNA wurde mittels der Reversen-Transkriptase-Reaktion durch das Enzym M-MLV RT[®] (M-MLV Reverse Transkriptase RNaseHMinus Point Mutant) in cDNA umgeschrieben. Um ausschließlich die für die Transkript-Analyse relevante mRNA in cDNA umzuschreiben, wurden Oligo-(dt)₁₅-Primer verwendet (Tabelle 4). Der Primer dient als Startregion für die Reverse Transkriptase, indem er sich an das Poly-A-Ende der mRNA-Moleküle anlagert. 1 µL des Oligo-(dt)₁₅-Primers und 10 µL der RNA-Probe wurden in einem Reaktionsgefäß gemischt. Die Probe wurde im Thermocycler bei 70°C für 5 min inkubiert um Sekundärstrukturen der RNA aufzufalten. Danach wurden die Proben sofort für 5 min auf Eis gestellt und jeweils 14 µL des in der Zwischenzeit hergestellten Mastermix (III.2.6) hinzugefügt. Im Anschluss durchlief die Probe ein 3-Schritt Temperaturprotokoll bestehend aus einer Inkubation für 10 min bei 38°C und dann 50 min bei 46°C. Um die Reaktion zu stoppen, folgte zum Abschluss noch eine Enzym-Denaturierung über 15 min bei 70°C. Durch die Inaktivierung der verwendeten Enzyme wird außerdem eine Interaktion der durchgeführten PCR mit Komponenten einer nachfolgenden PCR vermieden.

In einem Nanophotometer (Pearl, Implen III.1) wurde die Reinheit und Konzentration der gewonnenen cDNA ermittelt. Über den Quotienten der ermittelten optischen Dichten wurde die Probe beurteilt. Dabei wurden Quotienten von 1,7 bis 2,1 als akzeptabel beurteilt. Bei niedrigeren Quotienten lag vermutlich eine Verunreinigung mit Proteinen vor. Die Konzentration (c) in $\mu\text{g/mL}$ wurde anhand der optischen Dichte bei 260 nm (OD_{260}) nachfolgender Formel berechnet:

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

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

OD_{260} : optische Dichte bei 260 nm

Im Anschluss an die Beurteilung wurden die Proben auf 200 ng cDNA pro μL eingestellt. Die Lagerung der cDNA erfolgte bei -20°C , sofern sie nicht sofort weiterverwendet wurde.

3.9.4 Durchführung der RT-qPCR

Die RT-qPCR dient der quantitativen Darstellung der PCR-Produkte während der ablaufenden Amplifikationszyklen in Echtzeit. Es kommt hierbei zum wiederholten Ablauf von drei Reaktionsschritten (Zyklus). Dabei wird zunächst die doppelsträngige DNA aufgeschmolzen, danach erfolgt die Anlagerung von Primern und im letzten Schritt wird das Produkt verlängert (KUBISTA et al., 2006). Dieser Zyklus wird für eine PCR ca. 40- bis 50-mal durchlaufen. Für die RT-qPCR wird außerdem ein Farbstoff benötigt, welcher an die gebildeten Produkte bindet, so dass deren Anwesenheit durch Fluoreszenz angezeigt wird. Der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green ist den Reaktionsansätzen enthalten. Dieser lagert sich an die doppelsträngige DNA an und die Extinktion wird nach jedem durchlaufenen Zyklus ermittelt. Die Extinktion ist dabei direkt proportional zur Menge der amplifizierten DNA. Das heißt, dass es im Laufe der PCR-Zyklen zu ansteigenden Fluoreszenzsignalen kommt. Zunächst ist das Signal sehr schwach und kann nicht von anderen Hintergrundsignalen unterschieden werden. Zu einem späteren Zeitpunkt steigt die Fluoreszenz des PCR-Produktes exponentiell an und hebt sich so von den Hintergrundsignalen ab. Dieser Zyklus wird dann als 'Cycle threshold' (C_t) bezeichnet. Im weiteren Verlauf geht diese exponentielle Phase der Fluoreszenzkurve in eine Plateauphase über (Bild B) (KUBISTA et

al., 2006).

Der verwendete Farbstoff SYBR Green bindet unspezifisch, das heißt jede doppelsträngige DNA fluoresziert und nicht nur die Gesuchte. Um die Produkte unterscheiden zu können wird im Anschluss an die Reaktionszyklen zur Amplifikation eine Analyse der Schmelzkurven durchgeführt (Bild A). Hierbei werden die Proben schrittweise denaturiert, sodass die doppelsträngige DNA zerfällt. Dies geschieht in Abhängigkeit ihrer Größe zu unterschiedlichen Zeitpunkten und ist gekennzeichnet durch einen abrupten Abfall der Fluoreszenz (KUBISTA et al., 2006).

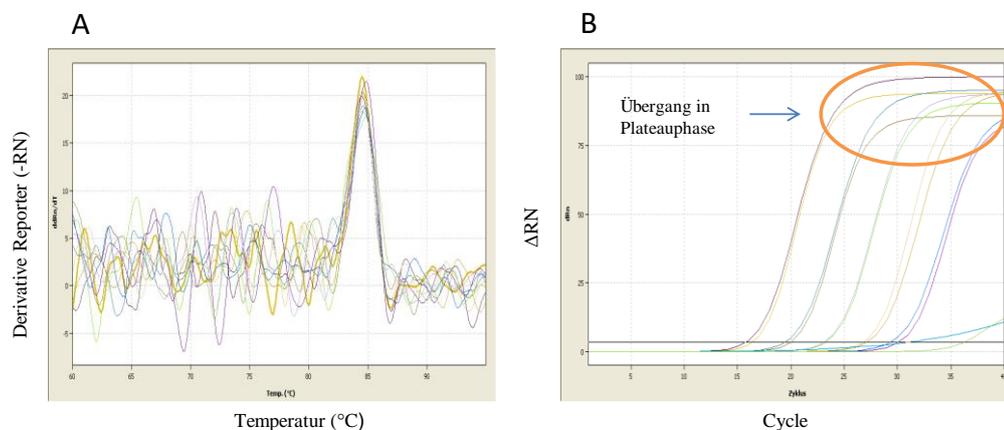


Abbildung 2 Schmelzkurve und Amplifikations-Plot einer qRT-PCR.

Dargestellt ist eine Schmelzkurve von LAP in der ersten Ableitung (Reporter Farbstoff SYBR Green) gegen die Temperatur mit einem Peak bei 85°C. Der einzige und einheitliche Peak bedeutet, dass nur ein Produkt amplifiziert wird (A). Amplifikation (Steigung der SYBR Green-Fluoreszenz (ΔR_n)) von Messplasmiden des Proteins LAP in den Verdünnungen 1×10^2 Kopien bis 1×10^6 Kopien über 40 Zyklen. Am Ct- Wert findet der Übergang in die exponentielle Phase statt und am Ende der Amplifikation der Übergang in die Plateauphase (B).

In der RT-qPCR wurde die Genexpression der Gene CCL20, S100A9 und LAP untersucht. Für die Durchführung wurde der SensiFAST™ SYBR Master Mix verwendet. Die Gewebeproben wurden wie unter III.3.8.2 beschrieben vorbereitet, in cDNA umgeschrieben und auf eine Konzentration 200 ng/ μ L gebracht. Alle Ansätze wurden in Dublikaten angesetzt. Für jede Messung wurden mindestens fünf Punkte der Standardreihe ($100 - 10^6$ Kopien/ μ L) und eine Negativkontrolle (Mastermix + Wasser) eingesetzt. Pro Vertiefung einer 96-Well-Platte wurden 1 μ L cDNA und 19 μ L des entsprechenden Mastermix (Tabelle 3, III.2.6) pipettiert. Zur vollständigen Aktivierung der Polymerase DNA wurden die Proben zu Beginn der PCR ein-

malig für 2 min auf 95°C erhitzt. Danach erfolgten 40 Zyklen mit je einer Denaturierung der Proben bei 95°C über 5 sec und der Anlagerung der Primer und der Verlängerung des Produkts bei 60°C über 15 sec. Im Anschluss wurde eine Analyse der Schmelzkurve durchgeführt, indem die Proben von 60°C in Schritten von 0,5°C unter ständiger Aufzeichnung der Fluoreszenz auf 95°C erhitzt wurden.

Die in den Proben enthaltene Kopienzahl konnte wie folgt abgeleitet werden: Die Software qPCRsoft3.0 zeichnete die Fluoreszenz von SYBR Green kontinuierlich auf und ermittelte die C_t -Werte der einzelnen Proben. Außerdem wurden C_t -Werte für den externen Standard festgelegt, von welchem die jeweilige Kopienzahl bekannt war. Anhand dieser Werte konnte eine Standardkurve (Regressionsgerade erstellt werden. Dabei wurden die ermittelten C_t -Werte (C_t) logarithmisch gegen die Kopienzahl der Standardpunkte dargestellt (Abbildung 3). Die Steigung der Standardkurve, sowie die Effizienz, das Bestimmtheitsmaß (R^2) und die Güte wurden für die Validierung der PCR verwendet.

Wenn sich das Produkt in jeden Zyklus verdoppelt, dann liegt eine Effizienz von 95 % vor. Dies trifft bei einer Steigung von -3,46 zu, wobei Steigungen von -3,1 bis - 3,6 (Effizienz 90 %- 110 %) als auswertbar eingestuft wurden. Die Schmelzkurve darf nur einen Peak für ein amplifiziertes Produkt anzeigen. Der Bestimmtheitsgrad (R^2) dient zur Überprüfung des linearen Zusammenhangs zwischen den C_t -Werten und der eingesetzten Kopienzahl. R^2 wird von der Software ermittelt und sollte Werte $> 0,985$ annehmen. Wurden alle Kriterien erfüllt, dann wurden die berechneten Kopienzahlen der Proben weiterverwendet.

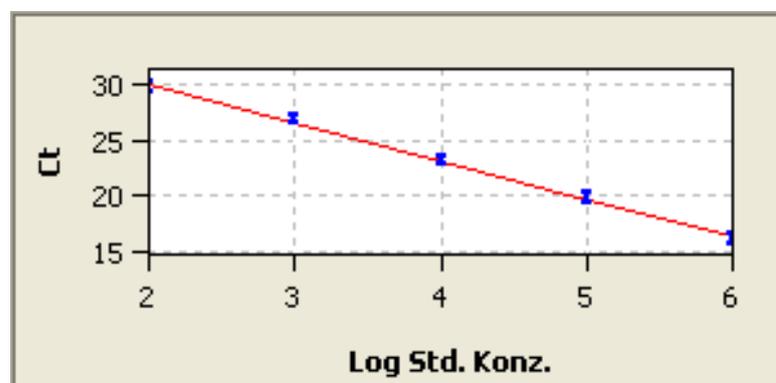


Abbildung 3 Regressionsgerade von LAP

Regressionsgerade einer Standardreihe in der RT-qPCR. Dargestellt sind Messplasmide von LAP in den Verdünnungen 1×10^2 Kopien bis 1×10^6 Kopien. Die C_t -Werte sind gegen die Kopienzahlen aufgetragen und ergeben eine Regressionsgerade mit der Stei-

gung $s = -3,46$; einer Effizienz von 0,95 % und $R^2=0,99$

3.10 Statistische Auswertung

Die statistischen Analysen wurden mit Excel (2010, Microsoft) und Origin (Version 8) durchgeführt. Die Werte für die optische Dichte wurden mittels Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung getestet. Dieser wurde mehrheitlich abgelehnt. Daher wurde zum Vergleich der Mediane der nicht-parametrische Mann-Whitney-U-Test verwendet. Ergebnisse mit einem P-Wert $< 0,05$ wurden als signifikant betrachtet. Die Arbeit wurde als explorativ bzw. Hypothesen-basiert aufgefasst. Daher wurde auf eine Bonferroni- oder sonstige Korrektur des multiplen Testens verzichtet. Die Berechnungen wurden mit dem Statistik-Programm R (Version 3.2.2) unter Verwendung des Zusatz-Paketes „coin“ (Version 1.1-1) durchgeführt. Die für die graphische Darstellung wiederholt verwendeten „Boxplots“ sind in Abbildung 4 erklärt.

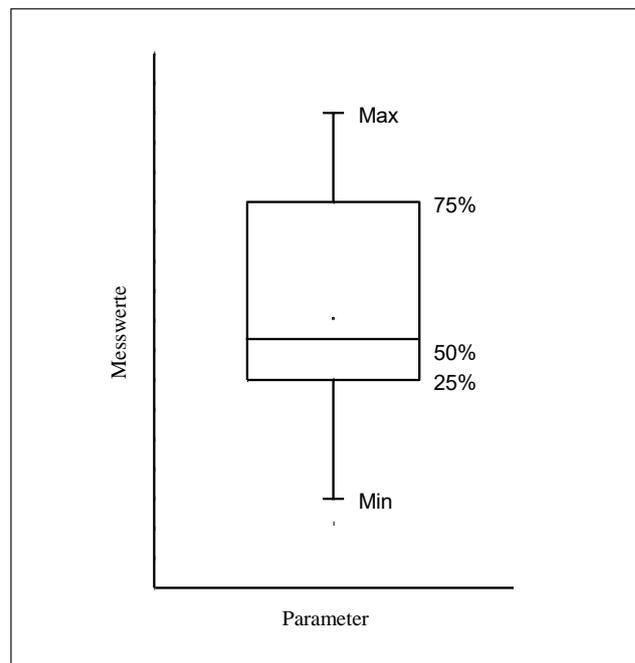


Abbildung 4 Exemplarische Darstellung eines Boxplot

Innerhalb der Box liegen 50 % aller gemessenen Werte. Die untere Begrenzung der Box markiert die 25 %-, die mittlere Linie die 50 %- und die obere Begrenzung die 75 %-Grenze. Das untere Ende der vertikalen Linie bezeichnet die 5 %-Grenze und das obere

die 95 %-Grenze. Das arithmetische Mittel aller Messwerte ist als Quadrat dargestellt. Die T- Balken machen deutlich wie weit die restlichen 50 % der Daten streuen.

IV. ERGEBNISSE

1 Methodische Vorarbeiten

Im Rahmen methodischer Vorarbeiten sollte zunächst das Wachstumsverhalten relevanter Mastitis-Pathogene untersucht werden um darauf basierend geeignete Modelle zur Untersuchung antimikrobieller Aktivität *in vitro* zu entwickeln.

1.1 Untersuchungen zum Wachstum von *E. coli*₁₃₀₃, *S. aureus*₁₀₂₇ und *Sc. uberis*_{O140J} *in vitro*

Die im Rahmen der vorliegenden Dissertation eingesetzten Mastitis-Pathogene *E. coli*₁₃₀₃, *S. aureus*₁₀₂₇ und *Sc. uberis*_{O140J} wurden zunächst bezüglich ihres Wachstumsverhaltens *in vitro* untersucht. Hierfür wurden Experimente in unterschiedlichen standardisierten Medien sowie mit unterschiedlichen Verfahren (Spatelverfahren, Messung der optischen Dichte) durchgeführt. Hierbei wurde zum einen die Zeit ermittelt, welche die einzelnen Pathogene benötigten, um eine Plateauphase zu erreichen, als auch die Pathogen-spezifische Höhe der maximal erreichbaren Anzahl CFU/mL. Hinsichtlich der eingesetzten Medien konnte bei allen drei Pathogenen kein unterschiedliches Wachstumsverhalten verzeichnet werden, unabhängig davon, ob sie ausschließlich in LB-Medium (III.2.4.6) kultiviert wurden oder eine Vorinkubation wie unter III.3.6 beschrieben in BHI und TSB stattgefunden hatte (Daten nicht gezeigt).

1.1.1 Ermittlung der Wachstumskurven eingesetzter Mastitis-Pathogene anhand des Spatelverfahrens

Zur Erstellung der Wachstumskurven mittels Spatelverfahren wurden Starterkulturen, wie unter III.3.6.10, beschrieben in LB-Medium hergestellt. Anschließend wurde stündlich nach Verdünnung der Bakteriensuspensionen in 10er Schritten je 100 µl in Triplikaten ausplattiert, nach 24-stündiger Inkubation ausgezählt und die Anzahl CFU/mL in der Ursprungssuspension berechnet. So konnte der Wachstumsverlauf *in vitro* für jeden Keim über 7 Stunden, wie in Abbildung 5, dargestellt ermittelt werden. Die eingesetzten Mastitis-Pathogene *E. coli*₁₃₀₃ und

*S. aureus*₁₀₂₇ zeigten eine vergleichbare Dynamik unter Laborbedingungen hinsichtlich des Wachstumsverhaltens und der Anzahl CFU/mL (Abbildung 5). Im Gegensatz dazu setzte zwar bei *Sc. uberis*_{O140J} die exponentielle Wachstumsphase zum gleichen Zeitpunkt ein (zwischen 4 und 5 h) aber die Höhe der erreichten Werte hinsichtlich CFU/mL lag deutlich unter denen der anderen beiden untersuchten Pathogene.

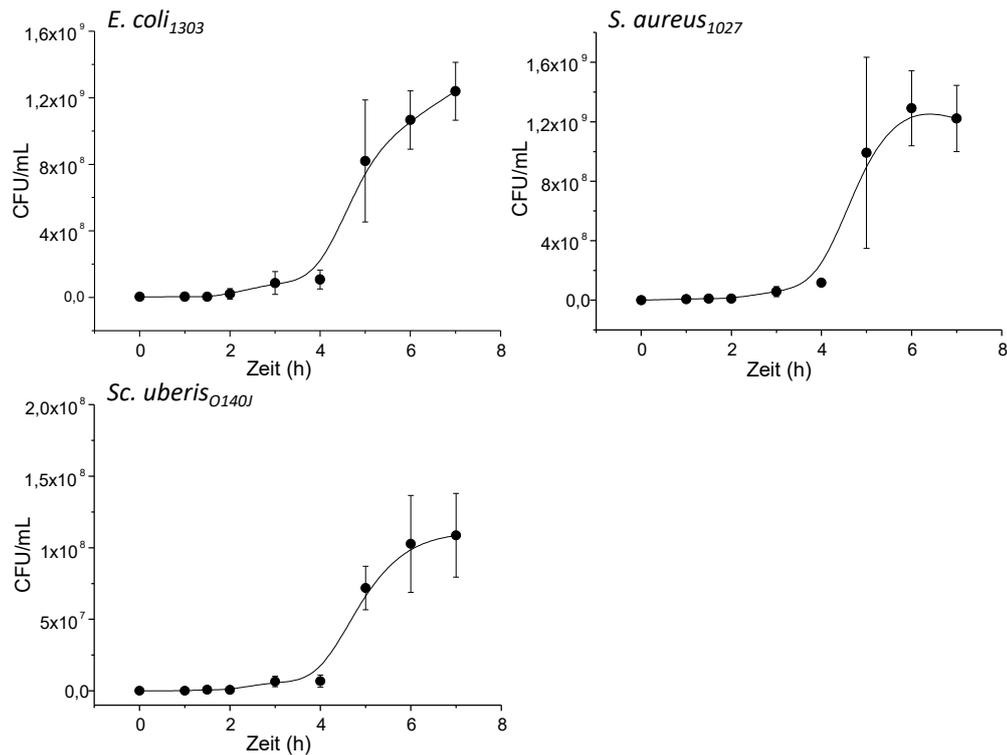


Abbildung 5 Wachstumskurven von *E. coli*₁₃₀₃, *S. aureus*₁₀₂₇ und *Sc. uberis*_{O140J} (Spätverfahren)

Dargestellt ist das Wachstum (CFU/mL) von *E. coli*₁₃₀₃, *S. aureus*₁₀₂₇ und *Sc. uberis*_{O140J} in LB-Medium über einen Zeitraum von 7 h. *E. coli*₁₃₀₃ zu Stunde 0, 1, 2, 3, 4 n = 6, Stunde 1,5 n = 3, Stunde 5-7 n = 4. *S. aureus*₁₀₂₇ und *Sc. uberis*_{O140J} zu Stunde 0-7 n = 5 und Stunde 1,5 n = 3.

1.1.2 Ermittlung der Wachstumskurven eingesetzter Mastitis-Pathogene anhand der optischen Dichte (OD)

Zur Erstellung der Wachstumskurven anhand der optischen Dichte wurden Starterkulturen wie unter III.3.6.10 beschrieben in LB-Medium hergestellt und im Plattenphotometer stündlich hinsichtlich der optischen Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀) untersucht. Wie bereits durch das Spätverfahren ermittelt, zeigten auch hier

*E. coli*₁₃₀₃ und *S. aureus*₁₀₂₇ eine vergleichbare Dynamik hinsichtlich des Wachstumsverhaltens während *Sc. uberis*_{O140J} im Vergleich hierzu zu jedem Zeitpunkt niedrigere Werte seiner OD₆₀₀ aufwies (siehe Abbildung 6).

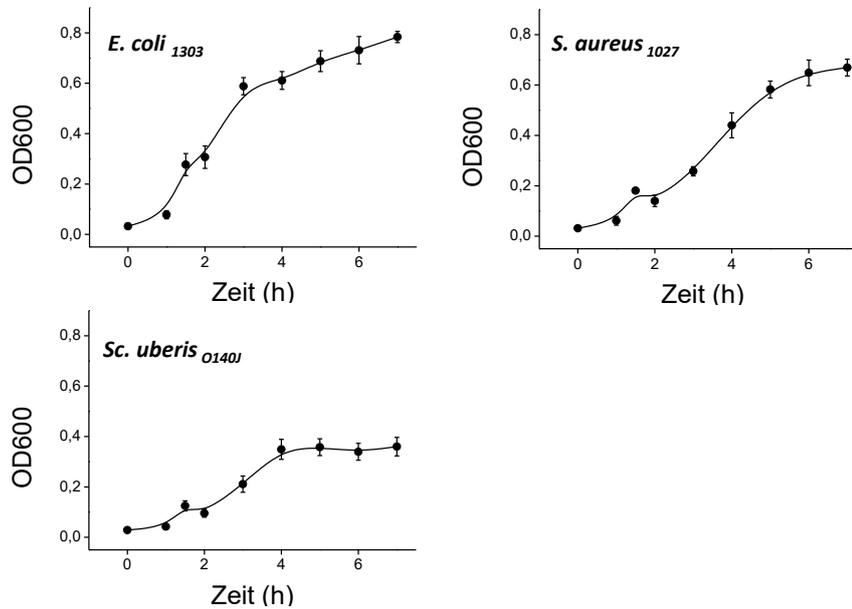


Abbildung 6 Wachstumskurven von *E. coli*₁₃₀₃, *S. aureus*₁₀₂₇ und *Sc. uberis*_{O140J} (optische Dichte)

Dargestellt ist das Wachstum (OD₆₀₀) von *E. coli*₁₃₀₃, *S. aureus*₁₀₂₇ und *Sc. uberis*_{O140J} in LB-Medium gemessen über einen Zeitraum von 7 h. *E. coli*₁₃₀₃ zu Stunde 0, 1, 2, 3, 4 n = 6, Stunde 1,5 n = 3, Stunde 5-7 n = 4. *S. aureus*₁₀₂₇ und *Sc. uberis*_{O140J} zu Stunde 0-7 n = 5 und Stunde 1,5 n = 3.

Beide eingesetzten Verfahren zeigten eine hohe Korrelation zueinander (Abbildung 7), die überdies für alle 3 eingesetzten Pathogene sich als hochsignifikant erwies ($P < 0,001$). So konnten anschließend die gewonnenen Werte der OD₆₀₀ rechnerisch einer entsprechenden Anzahl CFU/mL in der Ursprungssuspension zugeordnet werden. Dieses Verfahren ermöglichte es, anstatt des zeit- und materialaufwändigen Spatelverfahrens ein photometrisches Verfahren im überwiegenden Anteil der Versuche einzusetzen.

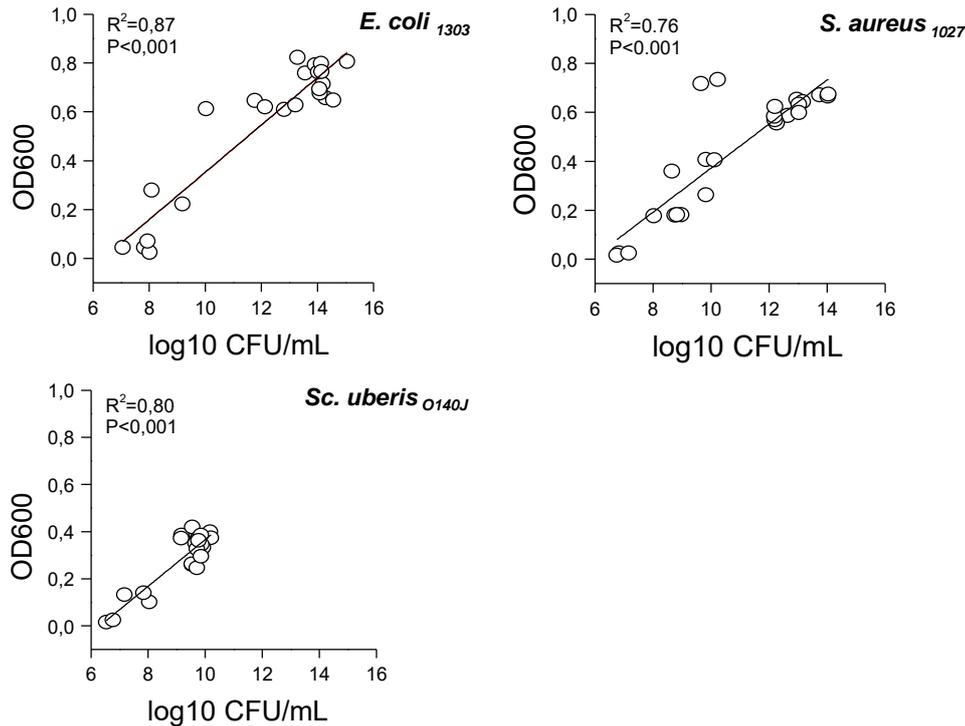


Abbildung 7 Korrelation zweier Verfahren zur Messung des Wachstums von *E. coli*₁₃₀₃, *S. aureus*₁₀₂₇ und *Sc. uberis*_{O140J} *in vitro*

Dargestellt ist die erreichte Anzahl CFU/mL (ermittelt durch Spatelverfahren) in Korrelation zur zeitgleich gemessenen optischen Dichte (OD₆₀₀) über 7 h von *E. coli*₁₃₀₃, *S. aureus*₁₀₂₇ und *Sc. uberis*_{O140J} *in vitro*. *E. coli*₁₃₀₃ zu Stunde 0, 1, 2, 3, 4 n = 6, Stunde 1,5 n = 3, Stunde 5-7 n = 4. *S. aureus*₁₀₂₇ und *Sc. uberis*_{O140J} zu Stunde 0-7 n = 5 und Stunde 1,5 n = 3. Die Anzucht erfolgte in LB-Medium.

1.1.3 Wachstumsmaxima der eingesetzten Mastitis-Pathogene

Die Wachstumsmaxima der eingesetzten Mastitis-Pathogene *E. coli*₁₃₀₃, *S. aureus*₁₀₂₇ und *Sc. uberis*_{O140J} wurden wie unter III.3.6 beschrieben ermittelt. Für *E. coli*₁₃₀₃ zeigte sich eine durchschnittlich maximale Anzahl von $7,93 \cdot 10^8$ CFU/mL (Median). Damit erreichte *E. coli*₁₃₀₃ die höchsten Werte und unterschied sich signifikant zu *S. aureus*₁₀₂₇ ($P < 0,01$) und *Sc. uberis*_{O140J} ($P < 0,0001$, siehe Abbildung 8). Im Schnitt erreichte *S. aureus*₁₀₂₇ eine maximale Anzahl von $4,24 \cdot 10^8$ CFU/mL (Median) und unterschied sich damit nochmals signifikant von den ermittelten Werten für *Sc. uberis*_{O140J} ($P < 0,0001$). Das geringste Wachstumsmaximum erreichte *Sc. uberis*_{O140J}, mit $5,24 \cdot 10^7$ CFU/mL (Median) und zeigte auch die höchste Varianz der erreichten Wachstumsmaxima.

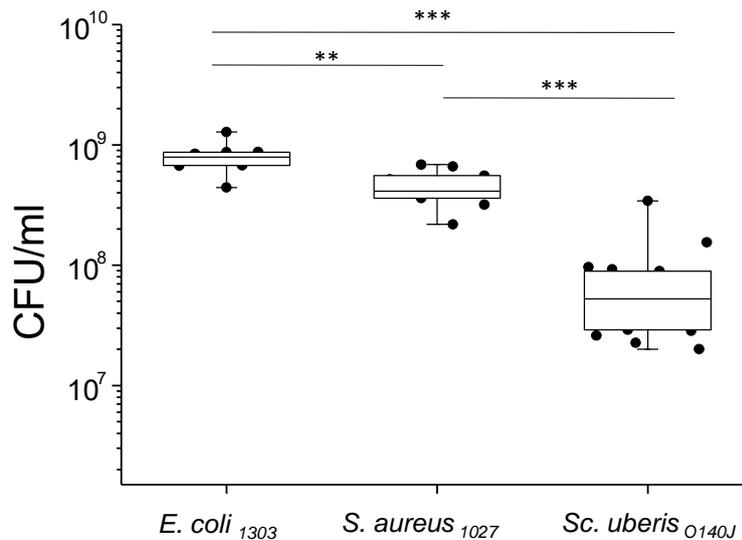


Abbildung 8 Wachstumsmaxima von *E. coli*₁₃₀₃, *S. aureus*₁₀₂₇ und *Sc. uberis*_{O140J}

Dargestellt als Boxplot ist die maximal erreichte Anzahl CFU/mL der verwendeten Mastitis-Pathogene *E. coli*₁₃₀₃ (n = 9), *S. aureus*₁₀₂₇ (n = 10) und *Sc. uberis*_{O140J} (n = 17) in TSB Medium. Statistisch signifikante Unterschiede sind gekennzeichnet wie folgt: ** = P < 0,01; *** = P < 0,0001.

1.2 Vorarbeiten zur Verwendung einer immortalisierten Milchdrüsenepithelzelle (MAC-T) zur Untersuchung einer Pathogenvermittelten Induktion von Chemokinen

Zunächst sollte untersucht werden, ob die Milchdrüsenepithelzelle MAC-T nach Stimulation mit LPS und hitzeinaktivierten *E. coli*₁₃₀₃, *S. aureus*₁₀₂₇ und *Sc. uberis*_{O140J}, chemotaktisch wirksame Faktoren in das Kulturmedium sezerniert.

Die Untersuchungen in der Transmigrationskammer wurden mit Zellkulturüberständen durchgeführt. Die MAC-T Zelle wurde zuvor nach dem Vorgehen wie unter III.3.2.2 beschrieben stimuliert und anschließend die Überstände gewonnen. Nach Durchführung des Chemotaxis-Assays (siehe III.3.4.2) wurde die Anzahl gewanderter PMN durchflusszytometrisch ermittelt und die relative Transmigrationsrate im Vergleich zu IL-8 als Positivkontrolle errechnet.

Es zeigte sich, dass Überstände von MAC-T in unstimuliertem Zustand aber auch

das Medium alleine wiederholt eine deutliche chemotaktische Wirkung zeigten (siehe Tabelle 6). Gepaart mit den hohen Standardabweichungen zwischen den einzelnen Versuchsansätzen führte dies dazu, dass sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Überständen stimulierter als auch unstimulierter MAC-T herausarbeiten ließen. Diese methodischen Schwierigkeiten waren durch vielfache Modifikationen (Wechsel der Medien und Zusätze, Testung verschiedener Zellablagen) nicht zu beheben, weshalb auf eine weitere Verwendung der Methodik verzichtet wurde.

Tabelle 6 Relative Transmigrationsrate von PMN auf Überstände stimulierter und nicht-stimulierter Milchdrüsenepithelzellen (MAC-T)

Ansatz (n = 12)	MW (%)	SD (%)
Positivkontrolle (IL8)	100	± 0
Negativkontrolle (PBS)	12,4	± 28,9
Medium	56,8	± 41,0
MAC-T	51,5	± 63,2
MAC-T + LPS (5 µg/mL)	146,3	± 162,9
MAC-T + <i>E. coli</i> (10 ⁴ CFU/mL)	75,4	± 70,1
MAC-T + <i>S. aureus</i> (10 ⁴ CFU/mL)	74,1	± 37,7
MAC-T + <i>Sc. uberis</i> (10 ⁴ CFU/mL)	65,7	± 58,1

Die ermittelten Transmigrationsraten (%) beziehen sich auf die jeweilige Positivkontrolle (100 ng/mL IL-8) pro Versuchsansatz.

1.3 Vorarbeiten zur Verwendung einer immortalisierten Milchdrüsenepithelzelle (MAC-T) als Synthesort endogener antimikrobieller Peptide

Ein Ziel war es, die Sekretion antimikrobieller Faktoren von Milchdrüsenepithelzellen in Zellkulturüberstände nach Stimulation mit hitzeinaktivierten Mastitis-Pathogenen zu prüfen. Hierzu sollte die immortalisierte Milchdrüsenepithelzelle MAC-T (III.3.1) Verwendung finden. Eine Vielzahl an Versuchen, diese Zelllinie ohne antibiotischen Medium-Zusatz zu kultivieren, schlugen fehl. Aus diesem Grund wurden zunächst Überstände, die den unter (III.2.4.1) verwendeten Zusatz enthielten, *in vitro* geprüft. Die Überstände waren aus Stimulationsversuchen mit MAC-T und hitzeinaktivierten Partikeln von *E. coli*₁₃₀₃, *S. aureus*₁₀₂₇ und *Sc. uberis*_{O140J} gewonnen worden. Der potentiell wachstumshemmende Effekt wurde wie unter III.3.5.1 beschrieben photometrisch über 6 h geprüft. Als Positivkontrolle einer antimikrobiellen Wirkung wurde Polymyxin B eingesetzt. Als Negativkontrolle wurden sowohl Bakterien ohne wachstumshemmenden Zusatz als auch Medium ohne Zusatz von Bakterien inkubiert.

Alle inkubierten Pathogene ohne wachstumshemmenden Zusatz zeigten eine signifikante Vermehrung (Zunahme der OD) nach 6 h (siehe Abbildung 9). Unter Zusatz der genannten Überstände zeigten alle drei untersuchten Pathogene keine Vermehrung (Zunahme der OD) über 6 Stunden. Eine Ausnahme bildeten Überstände der MAC-T nach Stimulation mit 5 µg/mL LPS. Für sie konnte aufgezeigt werden, dass *S. aureus*₁₀₂₇ in der Lage war, sich in diesen Überständen zu vermehren (siehe Abbildung 9). Die Kultivierung der MAC-T war aus technischen Gründen ohne antibiotischen Zusatz nicht möglich. Daraus ergab sich, dass keine Unterscheidung zwischen zugesetztem Antibiotikum und möglicherweise sezernierten Faktoren durch die MAC-T möglich war. Von einer weiteren Verwendung wurde im Rahmen dieser Arbeit Abstand genommen.

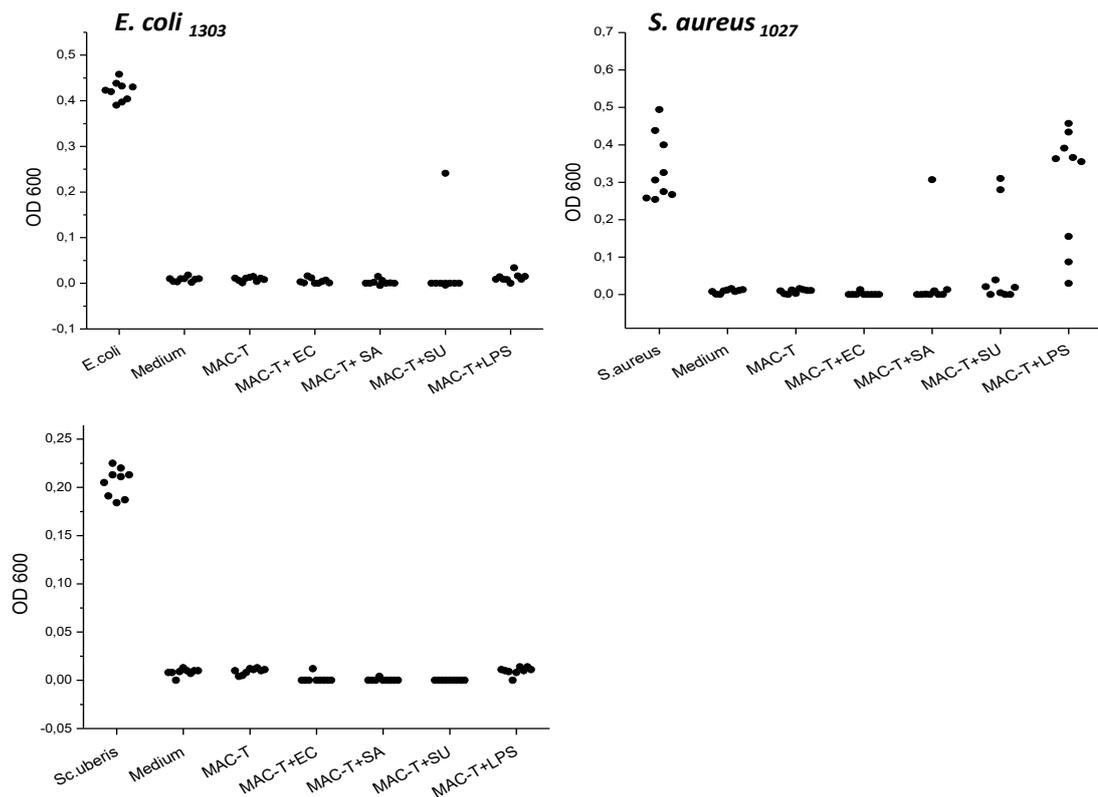


Abbildung 9 Koinkubation von *E. coli*₁₃₀₃, *S. aureus*₁₀₂₇ und *Sc. uberis*_{0140J} mit Überständen stimulierter und nicht-stimulierter MAC-T *in vitro*

Dargestellt sind jeweils die optischen Dichten bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD 600). Es wurden $1,02 \cdot 10^5$ CFU/mL *E. coli*₁₃₀₃, $7,2 \cdot 10^5$ CFU/mL *S. aureus*₁₀₂₇, sowie $4,6 \cdot 10^4$ CFU/mL *Sc. uberis*_{0140J} über 6 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Inkubation erfolgte in LB- Medium sowohl ohne Zusatz (*E. coli*₁₃₀₃; *S. aureus*₁₀₂₇; *Sc. uberis*_{0140J}) als auch mit den verschiedenen Überständen kultivierter MAC-T: Medium = reines Kulturmedium; MAC-T = unstimulierte MAC-T in Kulturmedium; MAC-T+EC = MAC-T stimuliert mit $1 \cdot 10^8$ CFU hitzeinaktivierte *E. coli*; MAC-T+SA = MAC-T stimuliert mit $1 \cdot 10^8$ CFU hitzeinaktivierte *S. aureus*; MAC-T+SU = MAC-T stimuliert mit $1 \cdot 10^8$ CFU hitzeinaktivierte *Sc. uberis*; MAC-T+LPS = MAC-T stimuliert mit 5 µg/mL LPS.

1.4 Etablierung einer durchflusszytometrischen Methode zur Bestimmung lebender und abgetöteter Bakterien *in vitro*

Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine Methode etabliert werden, mit welcher es möglich war, lebende und tote Bakterien aus Suspensionen mittels Durchflusszytometrie zu detektieren. Damit sollte es möglich gemacht werden, eine potentielle antimikrobielle Wirkung von Kulturüberständen gegenüber *E. coli*₁₃₀₃ und *S. aureus*₁₀₂₇ zu untersuchen.

Der unter III.3.7.2 beschriebene Versuchsansatz wurde auf verschiedene bekannte

Mischungsverhältnisse lebender und toter Bakterien angewendet. Dabei ergaben sich die unter Abbildung 10 beispielhaft für *S. aureus*₁₀₂₇ dargestellten Ergebnisse (Daten für *E. coli* nicht gezeigt). Es konnte gezeigt werden, dass die bekannten eingesetzten Verhältnisse lebender und toter Bakterien sich überwiegend mit den durchflusszytometrisch ermittelten Werten deckten. Hierbei ergab sich aber weiterhin, dass der Anteil vitaler Bakterien bei den durchflusszytometrisch erhobenen Werten konsistent ca 5-20 % höher lag als ursprünglich eingesetzt. Möglicherweise sind die Verluste bei den toten Bakterien mit dem Prozess der Hitzeinaktivierung zu erklären. Da im Rahmen der vorliegenden Arbeit auf eine weitere Verwendung dieser Methode verzichtet wurde, wurden diesbezüglich keine weiteren Untersuchungen unternommen.

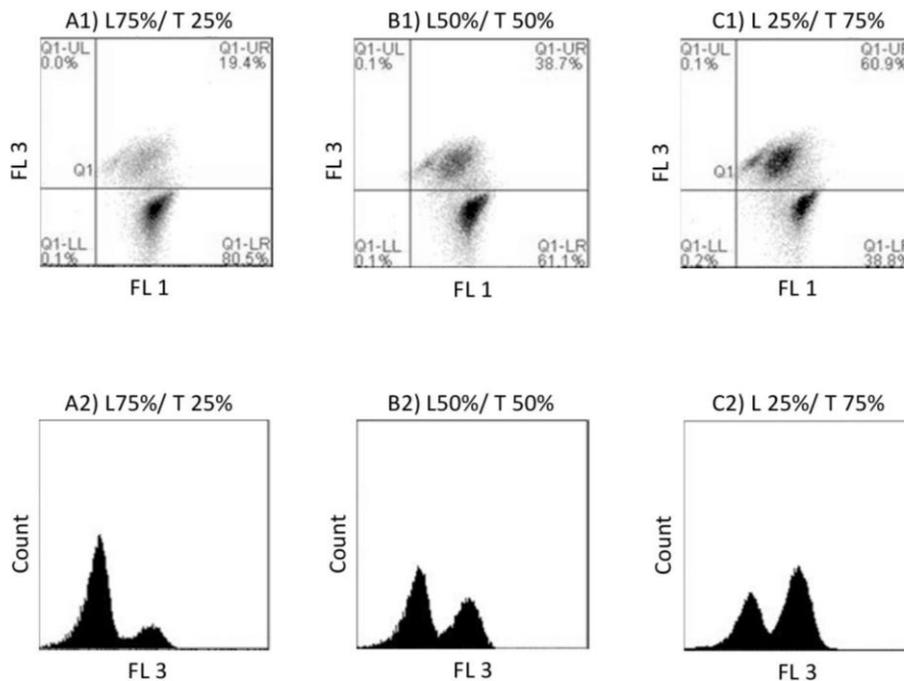


Abbildung 10 Durchflusszytometrische Erfassung vitaler und nicht vitaler Partikel von *S. aureus*₁₀₂₇

In der Grafik sind lebende (L) und tote (T) Populationen von *S. aureus*₁₀₂₇ in unterschiedlichen Mischungsverhältnissen mit SYTO9 (lebende Partikel) und PJ (tote Partikel) gefärbt dargestellt. Die Messungen sind als Dotplot in der Grünfluoreszenz (FL1) gegen Rotfluoreszenz (FL3) dargestellt (obere Reihe). In der unteren Reihe ist die Rotfluoreszenz (FL3) gegenüber Anzahl Ereignisse (Count) als Histogramm aufgetragen. Vorgegebene Konzentrationen von links nach rechts: B1/B2: 75 % lebend+25 % tot; B1/B2: 50 % lebend+50 % tot; C1/C2 25 % lebend+75 % tot. Die jeweils tatsächlich gemessenen Werte sind innerhalb des jeweiligen Plots dargestellt.

2 Antimikrobielle Aktivität ausgewählter Peptide und neutrophiler Granulozyten gegenüber Mastitiserregern

Ziel dieser Versuchsreihe war es, die antimikrobielle Wirkung der Peptide LAP und Indolicidin gegenüber Mastitiserregern zu untersuchen. Ergänzt wurden diese Untersuchungen durch Koinkubation der Mastitiserreger mit PMN und Kulturüberständen immortalisierter Milchdrüsenepithelzellen (MAC-T). Geprüft wurde die antimikrobielle Aktivität über 6 h *in vitro* an den Mastitiserregern *E. coli*₁₃₀₃, *S. aureus*₁₀₂₇ und *Sc. uberis*_{O140J}.

2.1 Lingual antimicrobial Peptide (LAP)

Die antimikrobielle Aktivität von LAP gegenüber den Mastitiserregern *E. coli*₁₃₀₃, *S. aureus*₁₀₂₇ und *Sc. uberis*_{O140J} *in vitro* wurde wie unter III.3.7.1.3 beschrieben photometrisch über 6 h ermittelt. Als Positivkontrolle einer antimikrobiellen Wirkung wurde Polymyxin B eingesetzt. Als Negativkontrolle wurden sowohl Bakterien ohne wachstumshemmenden Zusatz als auch Medium ohne Zusatz von Bakterien inkubiert.

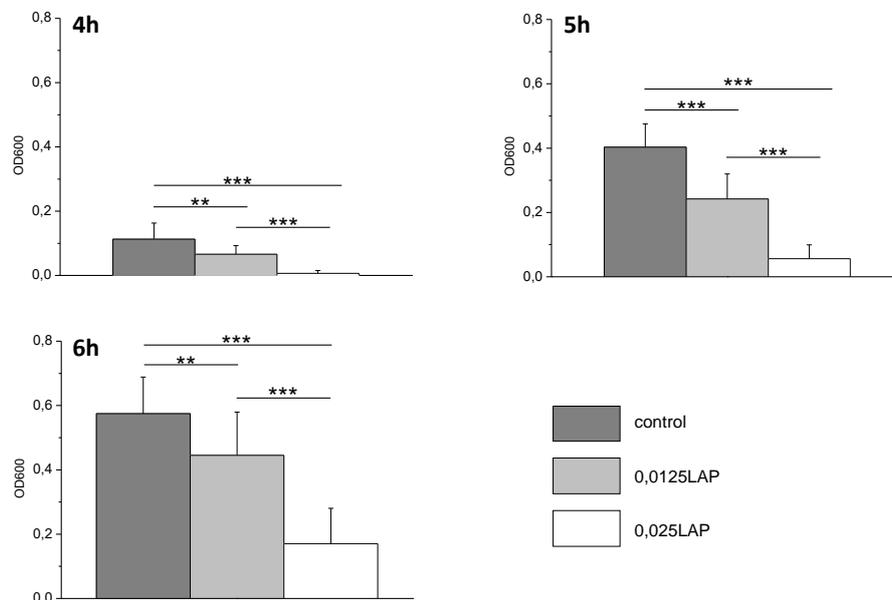


Abbildung 11 Einfluss von Lingual Antimicrobial Peptide (LAP) auf das Wachstum von *E. coli*₁₃₀₃ *in vitro*

Dargestellt sind die Differenzen (nach 4,5 und 6 h) der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD 600) zu den Ausgangswerten (n = 4). Es wurden jeweils $1,02 \cdot 10^5$ CFU/mL *E. coli*₁₃₀₃ über 6 h bei 37°C inkubiert. Die Inkubation erfolgte sowohl ohne Zusatz (control) als auch mit 0,0125 mg und 0,025 mg LAP. Statistisch signifikante Unterschiede sind gekennzeichnet wie folgt: ** = P < 0,01; *** = P < 0,001.

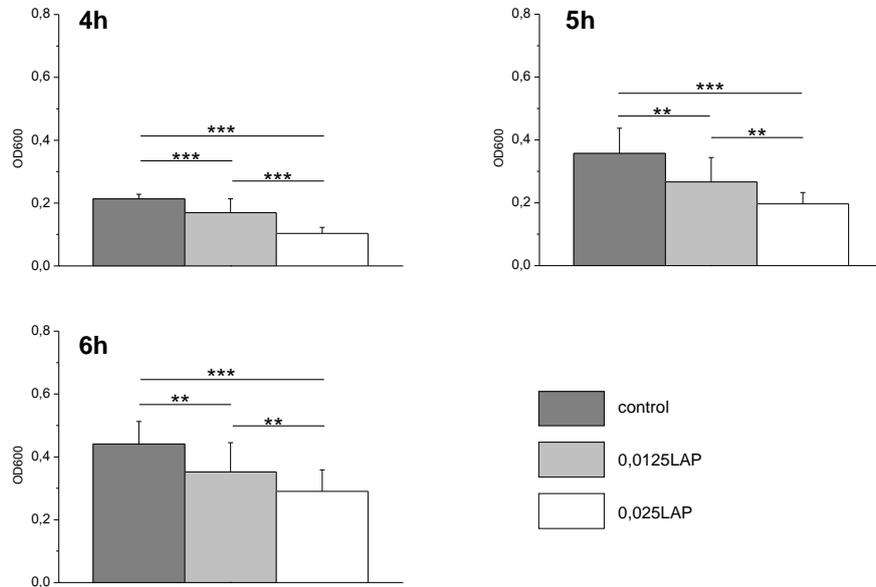


Abbildung 12 Einfluss von Lingual Antimicrobial Peptide (LAP) auf das Wachstum von *S. aureus*₁₀₂₇ in vitro

Dargestellt sind die Differenzen (nach 4,5 und 6 h) der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD 600) zu den Ausgangswerten (n = 3). Es wurden jeweils $7,2 \cdot 10^5$ CFU/mL *S. aureus*₁₀₂₇ über 6 h bei 37°C inkubiert. Die Inkubation erfolgte sowohl ohne Zusatz (control) als auch mit 0,0125 mg und 0,025 mg LAP. Statistisch signifikante Unterschiede sind gekennzeichnet wie folgt: ** = P < 0,01; *** = P < 0,001.

Es wurden $1,02 \cdot 10^5$ CFU/mL *E. coli*₁₃₀₃, $7,2 \cdot 10^5$ CFU/mL *S. aureus*₁₀₂₇ sowie $4,6 \cdot 10^4$ CFU/mL *Sc. uberis*_{O140J} mit jeweils 0,0125 mg LAP/well und einmal 0,025 mg LAP/well in Triplikatanalysen inkubiert. Zum Zeitpunkt 0-3 h nach Inkubationsbeginn war in keinem der Ansätze eine signifikante Zunahme der OD zu verzeichnen (Daten nicht gezeigt).

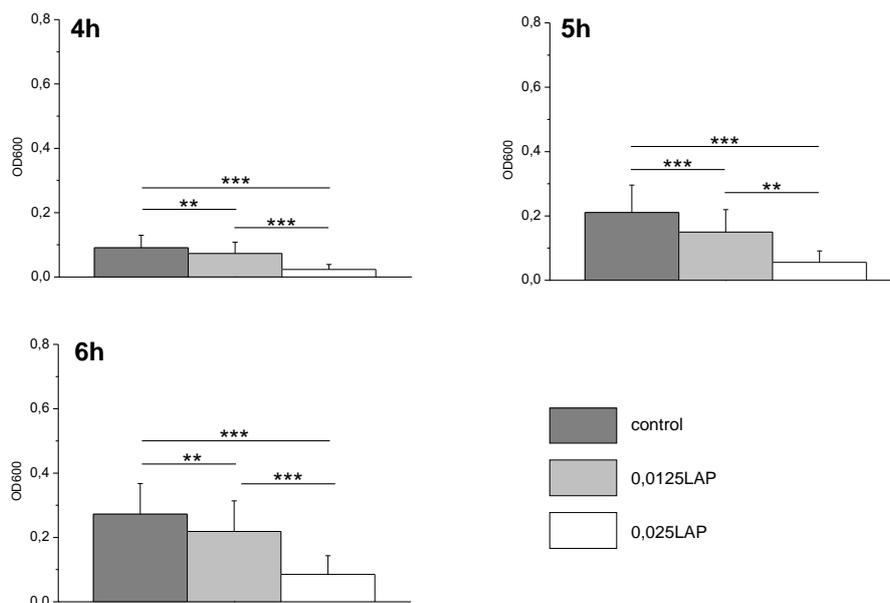


Abbildung 13 Einfluss von Lingual Antimicrobial Peptide (LAP) auf das Wachstum von *Sc. uberis*_{O140J} *in vitro*

Dargestellt sind die Differenzen (nach 4,5 und 6 h) der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD 600) zu den Ausgangswerten ($n = 3$). Es wurden jeweils $4,6 \cdot 10^4$ CFU/mL *Sc. uberis*_{O140J} über 6 h bei 37°C inkubiert. Die Inkubation erfolgte sowohl ohne Zusatz (control) als auch mit 0,0125 mg LAP und 0,025 mg LAP. Statistisch signifikante Unterschiede sind gekennzeichnet wie folgt: ** = $P < 0,01$; *** = $P < 0,001$.

Die 4-6 h nach Inkubationsbeginn erfassten Daten wurden zur Auswertung herangezogen. Trotz Zusatz von LAP zeigten alle drei untersuchten Pathogene eine signifikante Vermehrung (Zunahme der OD) über 6 h. Verglichen zu den Kontrollansätzen konnte LAP jedoch das Wachstum aller drei untersuchten Pathogene zu den Zeitpunkten 4-6 h nach Inkubationsbeginn signifikant hemmen (siehe Abbildung 11 bis Abbildung 13). Der wachstumshemmende Effekt von LAP war signifikant konzentrationsabhängig gegenüber allen drei untersuchten Mastitisserregern. Eine Konzentration von 0,025 mg LAP/Well (0,083 mg/mL) zeigte hierbei invariant einen signifikant stärkeren hemmenden Effekt als eine Konzentration von 0,0125 mg LAP/Well (0,041 mg/mL).

2.2 Indolicidin (Cathelicidin 4, CATHL4)

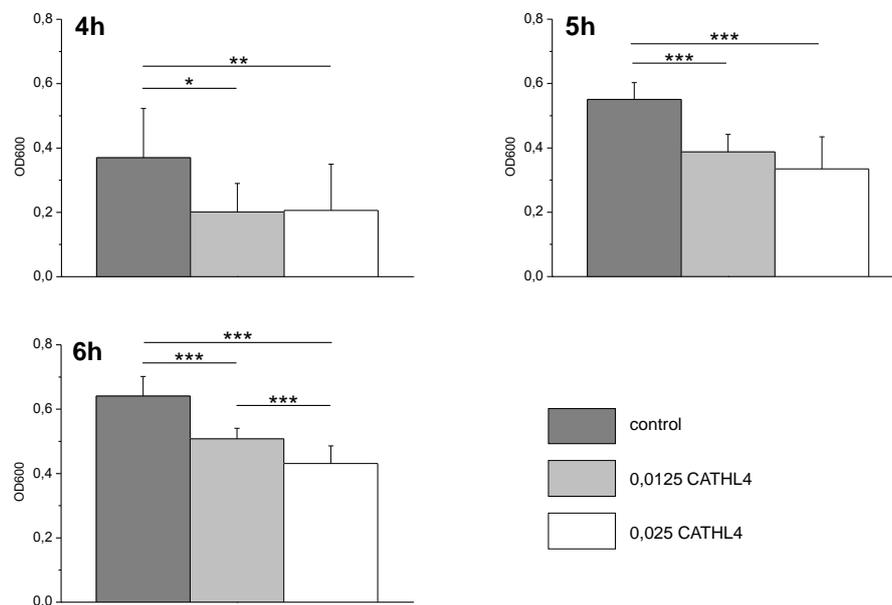


Abbildung 14 Einfluss von Indolicidin (Cathelicidin 4, CATHL4) auf das Wachstum von *E. coli*₁₃₀₃ *in vitro*

Dargestellt sind die Differenzen (nach 4,5 und 6 h) der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD 600) zu den Ausgangswerten (n = 6). Es wurden jeweils $1,02 \cdot 10^5$ CFU/mL *E. coli*₁₃₀₃ über 6 h bei 37°C inkubiert. Die Inkubation erfolgte sowohl ohne Zusatz (control) als auch mit 0,0125 mg CATHL4 und 0,025 mg CATHL4. Statistisch signifikante Unterschiede sind gekennzeichnet wie folgt: * = P < 0,05; ** = P < 0,01; *** = P < 0,001.

Die antimikrobielle Aktivität von Indolicidin gegenüber den Mastitiserregern *E. coli*₁₃₀₃, *S. aureus*₁₀₂₇ und *Sc. uberis*_{O140J} wurde wie unter III.3.7.1.3 beschrieben photometrisch über 6 h ermittelt. Dabei wurde stündlich die optische Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen. Als Positivkontrolle einer antimikrobiellen Wirkung wurde Polymyxin B eingesetzt. Als Negativkontrolle wurden sowohl Bakterien ohne wachstumshemmenden Zusatz als auch Medium ohne Zusatz von Bakterien inkubiert. Es wurden $1,02 \cdot 10^5$ CFU/mL *E. coli*₁₃₀₃, $7,2 \cdot 10^5$ CFU/mL *S. aureus*₁₀₂₇, sowie $4,6 \cdot 10^4$ CFU/mL *Sc. uberis*_{O140J} jeweils mit 0,0125 mg Indolicidin/Well (0,041 mg/mL) und einmal 0,025 mg Indolicidin/Well (0,083 mg/mL) in Triplikatanalysen inkubiert. Zum Zeitpunkt 0-3 h nach Inkubationsbeginn war in keinem der Ansätze eine signifikante Zunahme der OD zu verzeichnen (Daten nicht gezeigt).

Die 4-6 h nach Inkubationsbeginn erfassten Daten wurden zur Auswertung herangezogen. Trotz Zusatz von Indolicidin zeigten alle drei untersuchten Pathogene eine

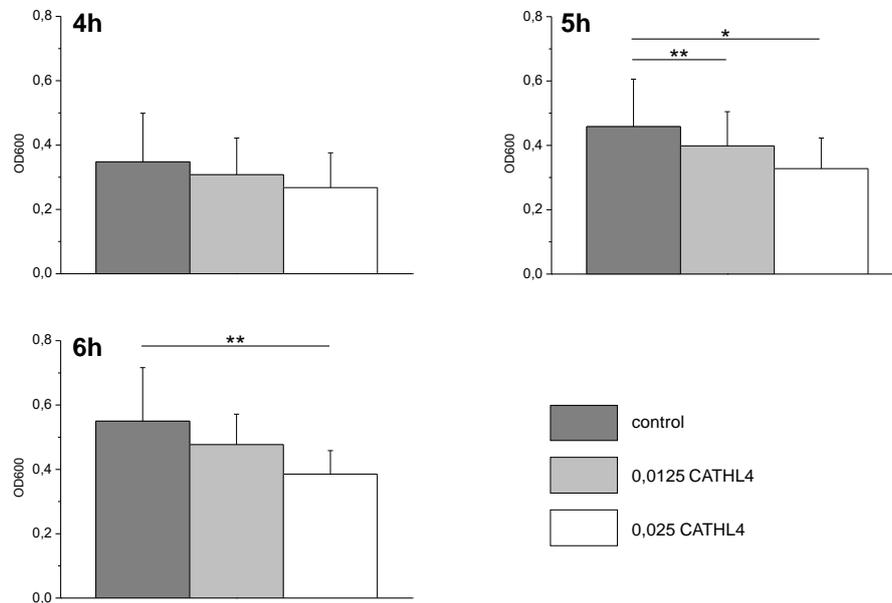


Abbildung 15 Einfluss von Indolicidin (Cathelicidin 4; CATHL4) auf das Wachstum von *S. aureus*₁₀₂₇ *in vitro*

In der Graphik sind jeweils die Differenzen (nach 4,5 und 6 h) der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD 600) zu den Ausgangswerten dargestellt (n = 6). Es wurden jeweils $7,2 \cdot 10^5$ CFU/mL *S. aureus*₁₀₂₇ über 6 h bei 37°C inkubiert. Die Inkubation erfolgte sowohl ohne Zusatz (control) als auch mit 0,0125 mg CATHL4 und 0,025 mg CATHL4. Statistisch signifikante Unterschiede sind gekennzeichnet wie folgt: * = P < 0,05; ** = P < 0,01.

signifikante Vermehrung (Zunahme der OD) über 6 h. Abhängig von der Indolicidin-Konzentration wurde jedoch das Wachstum aller drei untersuchten Pathogene zu den Zeitpunkten 4-6 h nach Inkubationsbeginn signifikant gehemmt: Eine Konzentration von 0,025 mg Indolicidin/Well zeigte hierbei nicht zu jedem untersuchten Zeitpunkt einen stärkeren hemmenden Effekt als 0,0125 mg Indolicidin/Well. Das Wachstum von *E. coli*₁₃₀₃ wurde zu den Zeitpunkten 4-6 h nach Inkubationsbeginn signifikant gehemmt (siehe Abbildung 14). Ein signifikant konzentrationsabhängiger Unterschied konnte jedoch nur 6 h nach Inkubationsbeginn verzeichnet werden. In den Versuchsansätzen, in denen *S. aureus*₁₀₂₇ und Indolicidin koinkubiert wurden, konnte nur für die Zeitpunkte 5-6 h nach Inkubationsbeginn eine signifikante Wachstumshemmung gezeigt werden (siehe Abbil-

dung 15). Hierbei zeigte sich zum Zeitpunkt 5 h nach Inkubationsbeginn eine unterschiedlich signifikante Wachstumshemmung für beide eingesetzten Konzentrationen von Indolicidin, während 6 h nach Inkubation nur die höher eingesetzte Konzentration signifikant das Wachstum hemmte.

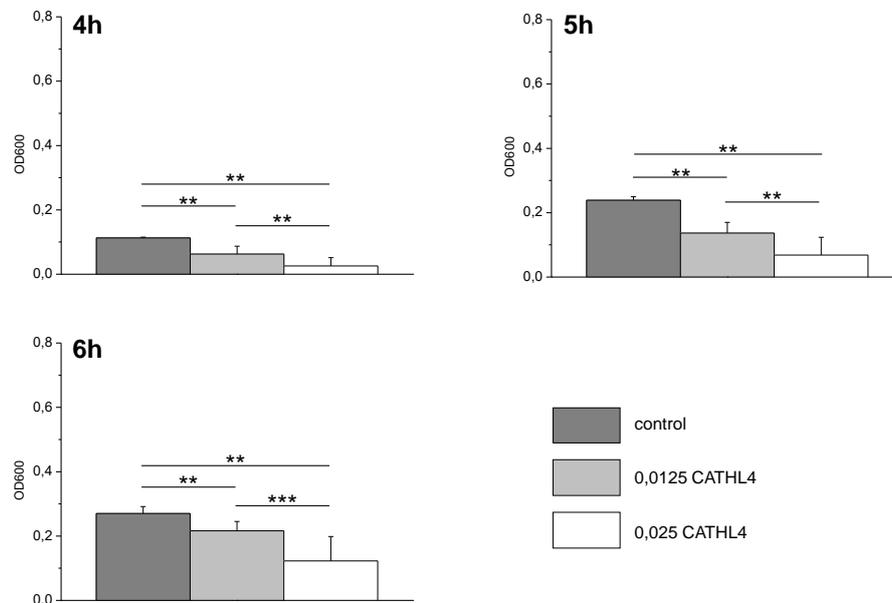


Abbildung 16 Einfluss von Indolicidin (Cathelicidin 4; CATHL4) auf das Wachstum von *Sc. uberis*_{O140J} *in vitro*

Dargestellt sind die Differenzen (nach 4,5 und 6 h) der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD₆₀₀) zu den Ausgangswerten (n= 6). Es wurden jeweils $4,6 \cdot 10^4$ CFU/mL *Sc. uberis*_{O140J} über 6 h bei 37°C inkubiert. Die Inkubation erfolgte sowohl ohne Zusatz (control) als auch mit 0,0125 mg Indolicidin und 0,025 mg Indolicidin. Statistisch signifikante Unterschiede sind gekennzeichnet wie folgt: ** = P < 0,01; *** = P < 0,001.

In den Inkubationsansätzen mit *Sc. uberis*_{O140J} wurde im Gegensatz zu den Ansätzen mit *E. coli*₁₃₀₃ und *S. aureus*₁₀₂₇ bei allen ausgewerteten Zeitpunkten eine signifikante Wachstumshemmung festgestellt die überdies sich zu jedem Zeitpunkt signifikant konzentrationsabhängig verhielt (siehe Abbildung 16).

2.3 Polymorphkernige Neutrophile Granulozyten (PMN)

Die antimikrobielle Aktivität von PMN gegenüber den Modellpathogenen *E. coli*₁₃₀₃, *S. aureus*₁₀₂₇ und *Sc. uberis*_{O140J} wurde wie unter III.3.7.1.2 beschrieben ermittelt. Dabei wurde stündlich die optische Dichte bei einer Wellenlänge

von 600 nm gemessen. Als Positivkontrolle einer antimikrobiellen Wirkung wurde Polymyxin B eingesetzt. Als Negativkontrolle wurden sowohl Bakterien ohne wachstumshemmenden Zusatz als auch Medium ohne Zusatz von Bakterien inkubiert. Es wurden $1,02 \cdot 10^5$ CFU/mL *E. coli*₁₃₀₃, $7,2 \cdot 10^5$ CFU/mL *S. aureus*₁₀₂₇, sowie $4,6 \cdot 10^4$ CFU/mL *Sc. uberis*_{O140J} mit jeweils $1,6 \cdot 10^2$, $1,6 \cdot 10^3$, $1,6 \cdot 10^4$, $1,6 \cdot 10^5$ und $1,6 \cdot 10^6$ PMN/Well (=300 μ L) in Triplikatanalysen inkubiert. Zum Zeitpunkt 0-2 h nach Inkubationsbeginn war in keinem der Ansätze eine signifikante Zunahme der OD zu verzeichnen (Daten nicht gezeigt). Die 3-6 h (*S. aureus*₁₀₂₇, *Sc. uberis*_{O140J}) bzw. 5-6 h (*E. coli*₁₃₀₃) nach Inkubationsbeginn erfassten Daten wurden zur Auswertung herangezogen. Trotz Zusatz der PMN zeigten alle drei untersuchten Pathogene eine signifikante Vermehrung (Zunahme der OD) über den Inkubationszeitraum von 6 Stunden. Abhängig von der PMN-Konzentration wurde jedoch das Wachstum aller drei untersuchten Pathogene zu den Zeitpunkten 3-6 h (*S. aureus*₁₀₂₇, *Sc. uberis*_{O140J}) bzw. 6 h (*E. coli*₁₃₀₃) nach Inkubationsbeginn signifikant gehemmt.

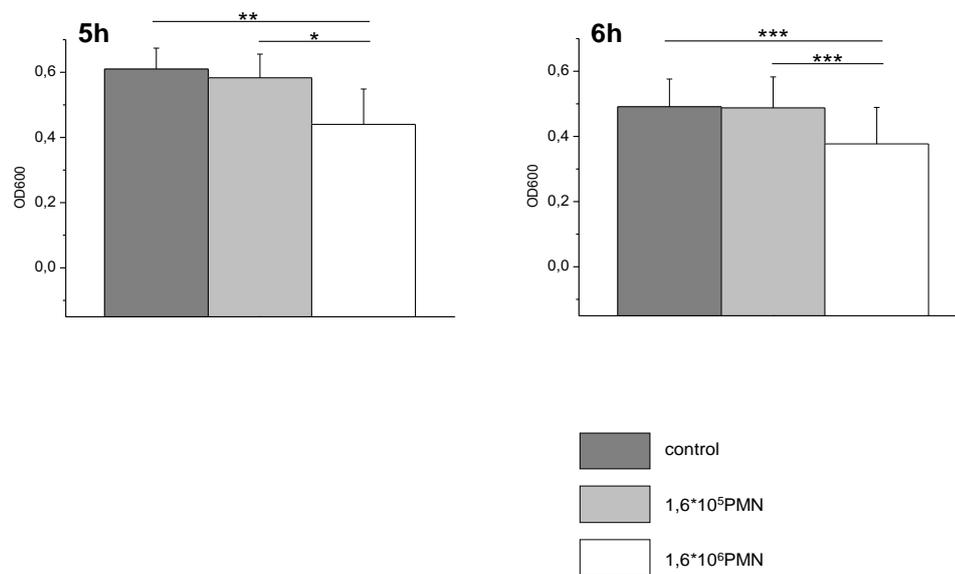


Abbildung 17 Einfluss Polymorphkerniger Neutrophiler Granulozyten (PMN) auf das Wachstum von *E. coli*₁₃₀₃ *in vitro*

Dargestellt sind die Differenzen (nach 5 und 6 h) der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD 600) zu den Ausgangswerten (n = 11). Es wurden jeweils $1,02 \cdot 10^5$ CFU/mL *E. coli*₁₃₀₃ über 6 h bei 37°C inkubiert. Die Inkubation erfolgte sowohl ohne Zusatz (control) als auch mit $1,6 \cdot 10^5$ und $1,6 \cdot 10^6$ PMN/300 μ L. Statistisch signifikante Unterschiede sind gekennzeichnet wie folgt: * = P < 0,05; ** = P < 0,01; *** = P < 0,001.

Der wachstumshemmende Effekt der PMN stieg signifikant mit zunehmender Konzentration. Das Wachstum von *E. coli*₁₃₀₃ wurden den Zeitpunkten 5-6 h nach Inkubationsbeginn nur durch die höchste Konzentration ($1,6 \cdot 10^6$ PMN/Well) signifikant gehemmt (siehe Abbildung 17). Für *S. aureus*₁₀₂₇ und *Sc. uberis*_{O140J} konnten für die Zeitpunkte 3-6 h nach Inkubationsbeginn für PMN-Konzentrationen zwischen $1,6 \cdot 10^4$ bis $1,6 \cdot 10^6$ PMN/Well signifikante Wachstumshemmung gezeigt werden (siehe Abbildung 18 und Abbildung 19).

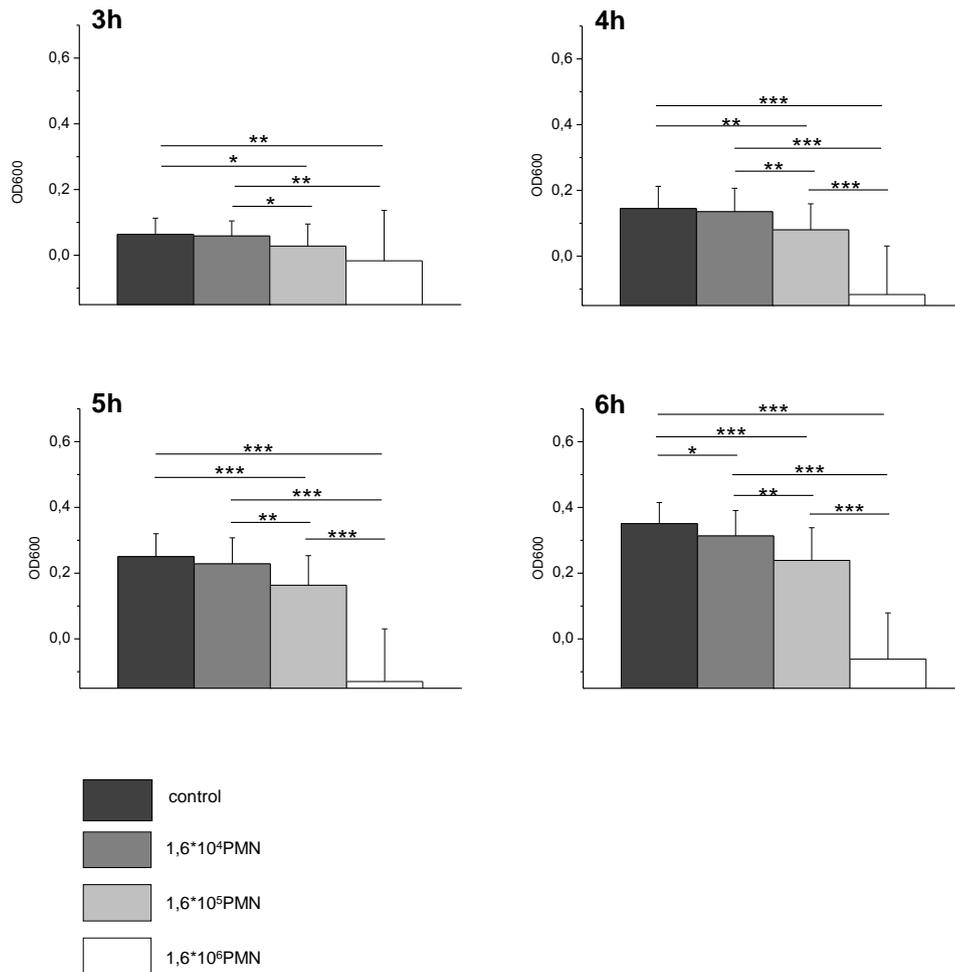


Abbildung 18 Einfluss Polymorphkerniger Neutrophiler Granulozyten (PMN) auf das Wachstum von *S. aureus*₁₀₂₇ *in vitro*

Dargestellt sind die Differenzen (nach 3, 4, 5 und 6 h) der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD 600) zu den Ausgangswerten (n = 11). Es wurden jeweils in Triplikation-Ansätzen $7,2 \cdot 10^5$ CFU/mL *S. aureus*₁₀₂₇ über 6 h bei 37°C inkubiert. Die Inkubation erfolgte sowohl ohne Zusatz (control) als auch mit $1,6 \cdot 10^4$ bis $1,6 \cdot 10^6$ PMN/300 µL. Statistisch signifikante Unterschiede sind gekennzeichnet wie folgt: * = P < 0,05; ** = P < 0,01; *** = P < 0,001.

Der stärkste wachstumshemmende Effekt konnte in Koinkubationsansätzen von PMN mit *S. aureus*₁₀₂₇ verzeichnet werden (siehe Abbildung 18). Bereits 3 h nach Inkubationsbeginn waren für drei unterschiedliche Konzentrationen von PMN eine signifikante, konzentrationsabhängige Wachstumshemmung zu verzeichnen. Zum Zeitpunkt 6 h nach Inkubationsbeginn waren sogar konzentrationsabhängige Unterschiede bei allen eingesetzten Konzentrationen vorhanden.

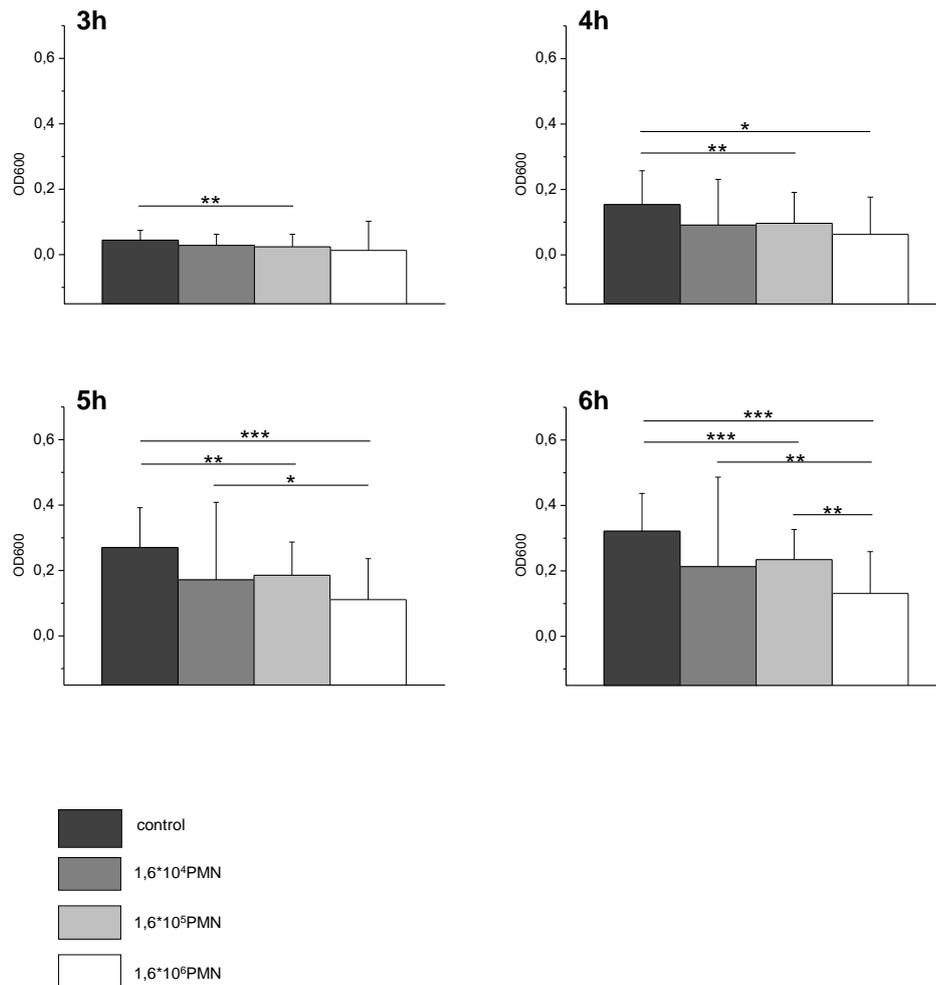


Abbildung 19 Einfluss Polymorphkerniger Neutrophiler Granulozyten (PMN) auf das Wachstum von *Sc. uberis*_{0140J} *in vitro*

Dargestellt sind die Differenzen (nach 3, 4, 5 und 6 h) der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD 600) zu den Ausgangswerten (n = 11). Es wurden jeweils $4,6 \cdot 10^4$ CFU/mL *Sc. uberis*_{0140J} über 6 h bei 37°C inkubiert. Die Inkubation erfolgte sowohl ohne Zusatz (control) als auch mit $1,6 \cdot 10^4$ bis $1,6 \cdot 10^6$ PMN/300 µL. Statistisch signifikante Unterschiede sind gekennzeichnet wie folgt: * = P < 0,05; ** = P < 0,01; *** = P < 0,001.

3 Einfluss einer intramammären LPS-Behandlung auf die Expression ausgesuchter antimikrobieller Peptide *in vivo*

Eine intramammäre Vorbehandlung mit LPS kann nachweislich eine experimentelle Mastitis mit *E. coli* verhindern oder abmildern und die Anzahl von *E. coli* in der Milch betroffener Kühe signifikant reduzieren (PETZL et al., 2012). In diesem Teil der Arbeit sollte geprüft werden, ob eine intramammäre Vorbehandlung mit 1 µg LPS/Euterviertel die Transkriptabundanzen ausgesuchter antimikrobieller Peptide moduliert.

3.1 Lingual Antimicrobial Peptide (LAP)

Das antimikrobiell wirksame LAP ist das am stärksten exprimierte Defensin in der bovinen Milchdrüse und wird im Rahmen von Mastitiden stark heraufreguliert. Es konnte zunächst gezeigt werden, dass LAP im mammären Gewebe eutergesunder Kühe konstitutiv nur sehr schwach exprimiert wird (siehe Abbildung 20, Gruppe „GS“). Eine experimentelle Infektion in einem Euterviertel mit *E. coli*₁₃₀₃ über 24 h führte invariant zu einer moderaten bis schweren klinischen Mastitis (WALDMÜLLER, 2012). Im Eutergewebe dieser Versuchstiere konnte eine durchschnittlich 37-fach höhere Expression für LAP gemessen werden gegenüber der Basisexpression (siehe Abbildung 20, Gruppe „EC“). Waren die Versuchstiere 72 h vor der experimentellen Infektion intramammär mit LPS vorbehandelt worden (Gruppe LPS/EC) so ließ sich eine 32-fache Expressionssteigerung für LAP gegenüber der Gruppe EC konstatieren. Dies entsprach einer >3000-fachen Expressionssteigerung gegenüber der Basisexpression (siehe Abbildung 20, Gruppe „LPS/EC“ vs. „GS“).

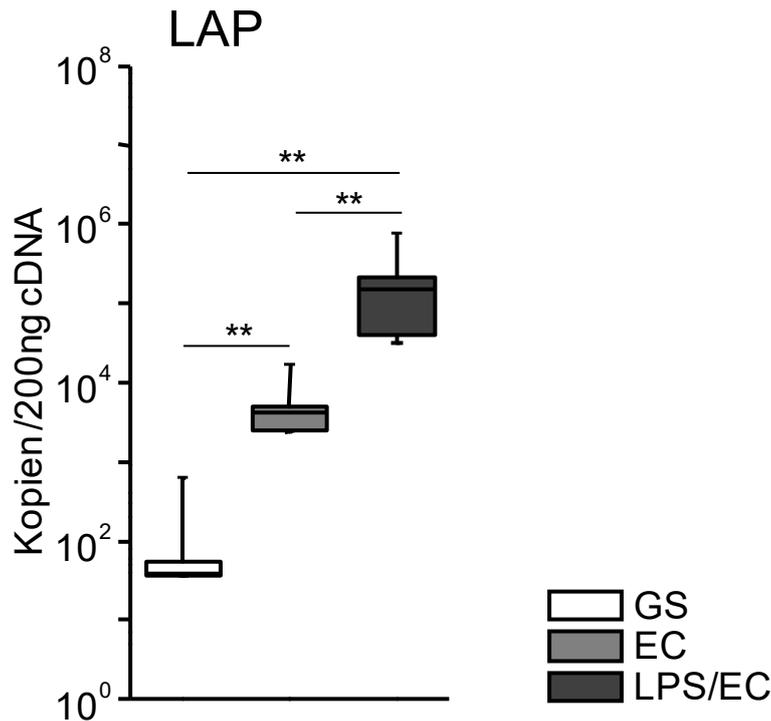


Abbildung 20 Einfluss einer intramammären LPS-Vorbehandlung auf die Expression von Lingual Antimicrobial Peptide (LAP) im Eutergewebe nach experimenteller Infektion mit *E. coli*₁₃₀₃

Dargestellt als Boxplots ist die mRNA-Expression von LAP im Eutergewebe unbehandelter Tiere (GS, n = 4) und 24 h nach experimenteller intramammärer *E. coli*-Infektion. Die experimentelle Infektion erfolgte 72 h nach intramammärer Vorbehandlung mit 1 µg LPS/Euterviertel (LPS/EC, n = 5) oder ohne Vorbehandlung (EC, n = 4). Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind wie folgt gekennzeichnet: ** = P < 0,01.

3.2 Calgranulin (S100A9)

Das antimikrobiell wirksame Calgranulin S100A9 zählt zu den in Euter und Zitze am frühesten und stärksten regulierten Faktoren bei der bovinen Mastitis (RINALDI et al., 2010; PETZL et al., 2016). Die Dynamik der Expressionsmodulation durch eine experimentelle Mastitis mit *E. coli*₁₃₀₃ mit und ohne LPS-Vorbehandlung entsprach in etwa den Beobachtungen bei LAP (vgl. 3.1). Es konnte gezeigt werden, dass S100A9 im mammären Gewebe eutergesunder Kühe zunächst nur sehr schwach exprimiert wird (siehe Abbildung 20, Gruppe „GS“). Nach einer experimentellen Mastitis über 24 h mit *E. coli*₁₃₀₃ konnte im Eutergewebe dieser Versuchstiere eine >1000-fach höhere Expression für S100A9 gemessen werden gegenüber der Basisexpression (siehe Abbildung 21, Gruppe

„EC“). Waren die Versuchstiere 72 h vor der experimentellen Infektion intramammär mit LPS vorbehandelt worden (Gruppe LPS/EC) so ließ sich eine 57-fache Expressionssteigerung für LAP gegenüber der Gruppe EC konstatieren (siehe Abbildung 21). Dies entsprach einer >50.000-fachen Expressionssteigerung gegenüber der Basisexpression (siehe Abbildung 20, Gruppe „LPS/EC“ vs. „GS“).

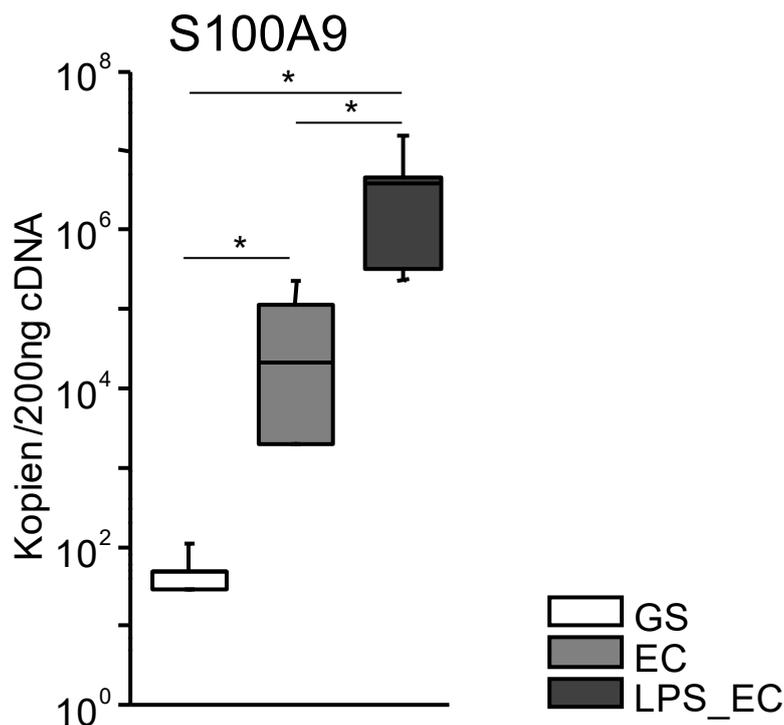


Abbildung 21 Einfluss einer intramammären LPS-Vorbehandlung auf die Expression von S100A9 im Eutergewebe nach experimenteller Infektion mit *E. coli*₁₃₀₃

Dargestellt als Boxplots ist die mRNA-Expression von S100A9 im Eutergewebe un behandelter Tiere (GS, n = 4) und 24 h nach experimenteller intramammärer *E. coli*-Infektion. Die experimentelle Infektion erfolgte 72 h nach intramammärer Vorbehandlung mit 1 µg LPS/Euterviertel (LPS/EC, n = 5) oder ohne Vorbehandlung (EC, n = 4). Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind wie folgt gekennzeichnet: * = $P < 0,05$.

3.3 β -Chemokin-Ligand-20 (CCL20; MIP-3-Alpha)

Das Chemokin CCL20 wird früh und stark nach Pathogen-Kontakt in Milchdrüsenepithelzellen, im Eutergewebe und in der Zitze heraufreguliert (RINALDI et al., 2010; GUNTHER et al., 2011; PETZL et al., 2016) und besitzt antibakterielle

Eigenschaften gegenüber *E. coli* und *S. aureus in vitro* (YANG et al., 2003). Nach einer experimentellen Mastitis über 24 h mit *E. coli*₁₃₀₃ konnte im Eutergewebe eine >13-fach höhere Expression für CCL20 gemessen werden gegenüber der Basisexpression (siehe Abbildung 22, Gruppe „GS“ und „EC“). Im Gegensatz zu LAP und S100A9 hatte eine intramammäre Vorbehandlung LPS keinen Einfluss auf die CCL20-Expression (siehe Abbildung 22, Gruppe „EC“ und „LPS_EC“).

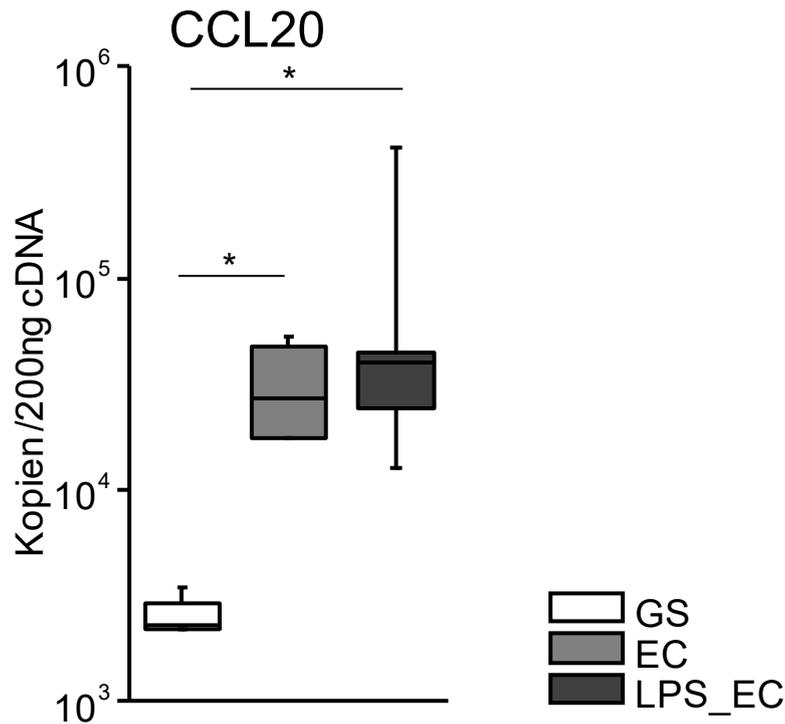


Abbildung 22 Einfluss einer intramammären LPS-Vorbehandlung auf die Expression von CCL20 im Eutergewebe nach experimenteller Infektion mit *E. coli*₁₃₀₃

Dargestellt als Boxplots ist die mRNA-Expression von CCL20 im Eutergewebe unbehandelter Tiere (GS, n = 4) und 24 h nach experimenteller intramammärer *E. coli*-Infektion. Die experimentelle Infektion erfolgte 72 h nach intramammärer Vorbehandlung mit 1 µg LPS/Euterviertel (LPS/EC, n = 5) oder ohne Vorbehandlung (EC, n = 4). Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind wie folgt gekennzeichnet: * = P < 0,05.

3.4 Einfluss einer intramammären LPS-Vorbehandlung auf die Keimzahl in der Milch nachfolgender experimenteller Infektion mit *E. coli*.

Neben der unter (III.3.1) und (III.3.2) beschriebenen gesteigerten Expression antimikrobieller Peptide sollte *in vivo* überprüft werden, ob eine intramammäre LPS-Vorbehandlung ebenfalls zu einer signifikanten Reduktion der Keimzahl führte. Zum Zeitpunkt unmittelbar vor *E. coli*-Infektion waren alle Euterviertel bakteriologisch negativ (Daten nicht gezeigt). Bei den Tieren ohne LPS-Vorbehandlung („EC“) war nach experimenteller Infektion die Keimzahl für *E. coli* im Milchsekret durchweg höher als bei LPS-vorbehandelten Kühen (siehe Abbildung 23). Tiere, die 72 h vor experimenteller Infektion mit *E. coli* mit LPS vorbehandelt wurden, zeigten eine signifikante Reduktion der Keimzahl zwischen den Zeitpunkten 12 h und 24 h *post infectionem*. Hierin unterschieden sie sich zum Zeitpunkt 24 h *post infectionem* signifikant gegenüber Tieren die vor der Infektion keine LPS-Vorbehandlung erfahren hatten (siehe Abbildung 23).

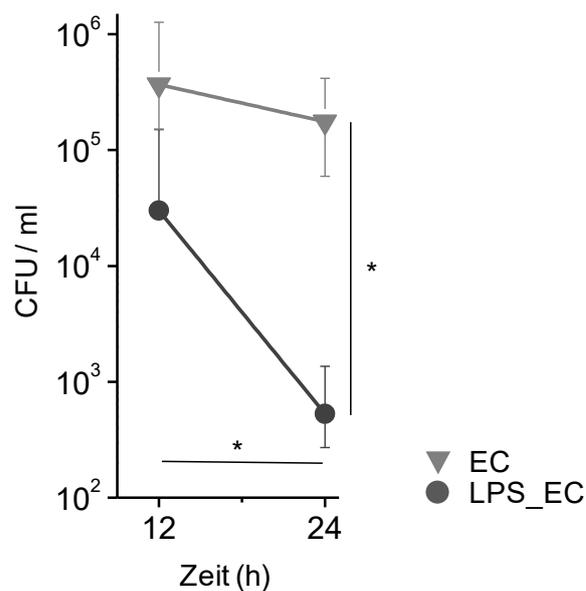


Abbildung 23 Einfluss einer intramammären LPS-Vorbehandlung auf die kulturelle Reisolierung nach experimenteller Infektion mit *E. coli*₁₃₀₃

Dargestellt ist die Anzahl aus Milch reisolierter *E. coli* (Median ± IQR CFU/mL) 12 h und 24 h nach experimenteller Infektion. Die experimentelle Infektion erfolgte 72 h nach intramammärer Vorbehandlung mit 1 µg LPS/Euterviertel (LPS/EC, n = 5) oder ohne Vorbehandlung (EC, n = 4). Unmittelbar vor der Infektion mit 500 CFU *E. coli* (zum Zeitpunkt 0 h) war die Milch aller Euterviertel bakteriologisch negativ. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind wie folgt gekennzeichnet: * = P < 0,05.

V. DISKUSSION

Antimikrobielle Peptide stellen eine wichtige Komponente des angeborenen Immunsystems in der Milchdrüse dar. Ihr Potential, eingedrungene Mikroorganismen in der Milchdrüse abzutöten, verleiht den AMP eine große Bedeutung in der initialen Erregerabwehr im Euter (LAI und GALLO, 2009; TAKAGI et al., 2012).

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein geeignetes Testverfahren für den funktionellen Nachweis von AMP gegen Mastitis-Pathogene *in vitro* zu etablieren. Weiterhin sollte untersucht werden, ob es mit gezielter Stimulation von Milchdrüsenepithelzellen in einem Kultursystem möglich ist, die Ausschüttung von AMP zu induzieren. Dies sollte zum einen auf funktioneller und zum anderen auf transkriptioneller Ebene untersucht werden. Das Vorliegen von Transkripten ausgewählter AMP in gezielt stimulierten *ex vivo* gewonnenen Eutergewebeproben sollte mittels RT-qPCR erfolgen.

Methodische Einschränkungen verhindern den funktionellen Nachweis antimikrobiell und chemotaktisch wirksamer Produkte in Zellkulturüberständen

Zu Beginn dieser Arbeit traten nicht unerhebliche methodische Schwierigkeiten mit der Kultivierung einer immortalisierten Milchdrüsenepithelzelle (MAC-T) auf. Es handelt sich hier um ein häufig verwendetes Zellmodell beim Rind, vor allem für molekularbiologische Untersuchungen (HUYNH et al., 1991; ALMEIDA et al., 1996; IBEAGHA-AWEMU et al., 2008; KALIVODA, 2010; GUNTHER et al., 2011; JIN et al., 2014). Im Rahmen dieser Arbeit sollen bewusst die methodischen Schwierigkeiten mit MAC-T erläutert werden.

Es sollte zunächst *in vitro* untersucht werden, ob die Pathogen-spezifische Stimulation der MAC-T zur Bildung und Sekretion chemotaktischer und antimikrobiell wirksamer Produkte führt. Im Chemotaxis-Assay wurden die Zellkulturüberstände auf das Vorhandensein chemotaktischer Produkte geprüft. Dieses Testverfahren war bereits im Vorfeld wiederholt erfolgreich eingesetzt worden (KALIVODA, 2010; LIND, 2011). Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Überstände der MAC-T 24 h nach Stimulation mit hitzeinaktivierten *E. coli*, *S. aureus*, *Sc. uberis* und LPS eine vergleichsweise hohe chemotaktische Wirkung auf PMN *in vitro* aufwiesen (siehe Tabelle 6). Es stellte sich hierbei jedoch wiederholt her-

aus, dass auch die Überstände unstimulierter MAC-T, sowie inkubiertes Kulturmedium ohne Anwesenheit von MAC-T eine vergleichsweise hohe chemotaktische Wirkung auf PMN ausübten und sich statistisch nicht signifikant von stimulierten Ansätzen unterschieden. Folglich konnte keine Aussage getroffen werden, inwieweit eine Bildung und Sekretion durch die vorgenommene Stimulation der Zellen ausgelöst wurde. Dies veranlasste uns im Rahmen der methodischen Vorarbeiten zu untersuchen, ob Komponenten des eingesetzten Kulturmediums eine direkte chemotaktische Wirkung entfalteten. Es zeigte sich, dass mehrere verwendete Kulturmedien chemotaktisch aktive Komponenten enthielten. Zunächst wurde angenommen, dass vor allem der Zusatz von fetalem Kälberserum (FCS) hierfür verantwortlich war. FCS ist chargenabhängig in der Lage, die Zellproliferation, Differenzierung und Chemotaxis zu steigern (BOXBERGER, 2013). Um dem entgegen zu wirken wurden die MAC-T-Zellen vor Versuchsbeginn über 24 h in FCS-freiem Medium kultiviert und vorher mehrfach gewaschen. Dieser methodische Schritt führte zu keiner Abnahme chemotaktischer Wirkung in Negativkontrollen. Wurden die MAC-T über den gesamten Versuchszeitraum hingegen in FCS-freiem Medium kultiviert, starben sie bereits vor der Anheftung an die Zellkulturflaschen ab. Alle anderen getesteten Substanzen (DMEM-F12, Penicillin-Streptomycin, Glutamin, PBS, Trypsin) zeigten einzeln eingesetzt keine chemotaktische Wirkung in der Transmigrationskammer. Eine Kultivierung der MAC-T ohne die entsprechenden Medium-Zusätze erwies sich somit als methodisch nicht durchführbar. Im Gegensatz zu dem bei LIND (2011) etablierten Verfahren mit Explantaten der bovinen Zitze, war es leider nicht möglich, im Rahmen dieser Arbeit verlässliche Daten zur Fragestellung zu erzielen, ob die MAC-T chemotaktisch aktive Faktoren nach Stimulation mit hitzeinaktivierten Mastitis-Pathogen und mit LPS sezerniert. Auf transkriptioneller Ebene konnte jedoch bereits gezeigt werden, dass diese immortalisierte Zelllinie erhöhte mRNA-Abundanzen für CXCL8 nach Stimulation mit LPS aufweist (STRANDBERG et al., 2005).

In der Literatur wurde bereits gezeigt, dass eine Stimulation der MAC-T mit hitzeinaktivierten *E. coli* bzw. mit *S. aureus* eine gesteigerte Expression auf mRNA- und Proteinebene von Cathelicidin 1, -2 und -4 führte (IBEAGHA-AWEMU et al., 2008). Auch für LAP liegen bereits Daten vor, die zeigen, dass dieses Defensin nach einer Vorbehandlung mit hitzeinaktivierten *E. coli*₁₃₀₃ bzw. LPS in

Euterepithelzellen vermehrt exprimiert wird (GUNTHER et al., 2011). In einem hierauf aufbauenden Versuchsteil sollte ermittelt werden, ob die MAC-T Pathogen-induziert antimikrobiell wirksame Faktoren bildet und in das Kulturmedium sezerniert. Dabei sollte die antimikrobielle Aktivität von Zellkulturüberständen gegenüber *E. coli*₁₃₀₃, *S. aureus*₁₀₂₇ und *Sc. uberis*_{O140J} getestet werden. Da sich wiederholt eine Kultivierung der MAC-T ohne antibiotischen Zusatz wegen Verkeimung als erfolglos herausstellte, wurden diese Versuchsansätze nicht weiterverfolgt. Der Zusatz eines Antibiotikums (Penicillin/Streptomycin) im Kulturmedium der MAC-T verhinderte zwar eine Verkeimung, verhinderte jedoch auch nach sechs Stunden immer noch das Wachstum der zugesetzten Modellpathogene (Abbildung 9).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sich die MAC-T für die vorliegende Arbeit als ungeeignetes Zellmodell zur Untersuchung einer Pathogen-induzierten Steigerung chemotaktisch und antimikrobiell aktiver Substanzen erwies. Um jedoch im Rahmen dieser Arbeit auch zelluläre Faktoren bei den Untersuchungen einbinden zu können, wurde in einem weiteren Ansatz die antimikrobielle Wirksamkeit von PMN *in vitro* untersucht (siehe IV.2.3). PMN gelten als wichtigste Effektorzellen bei der bovinen Mastitis (M. PAAPE et al., 2002; OVIEDO-BOYSO et al., 2007; GRIESBECK-ZILCH et al., 2008) und zeigen nachweislich einen hohen Gehalt an AMP (SORDILLO et al., 1997; GANZ, 2003).

1 Wachstumsverhalten eingesetzter Mastitis-Pathogene *in vitro*

Die Mastitis-Pathogene *E. coli*₁₃₀₃, *S. aureus*₁₀₂₇ und *Sc. uberis*_{O140J} gelten als die häufigsten bakteriellen Verursacher von Euterentzündungen (LEIGH et al., 2004; SCHUKKEN et al., 2011; THOMPSON-CRISPI et al., 2014), weshalb sie im Rahmen dieser Arbeit als Modellpathogene verwendet wurden. Um methodisch eine reproduzierbare Infektionsdosis der drei Modellpathogene herstellen zu können, wurde zunächst das Wachstumsverhalten jedes Keimes *in vitro* charakterisiert (siehe IV.1.1). Nach orientierenden Vorversuchen mit TSB- und BHI-Medium (Daten nicht gezeigt), wie in anderen Studien angegeben (PETZL et al., 2008; ZBINDEN et al., 2014), wurde dazu übergegangen, alle drei Modellpathogene ausschließlich in LB-Medium zu kultivieren. Dies vereinheitlichte die Me-

thodik der Kultivierung und zeigte bezüglich des Wachstumsverhaltens keinen Unterschied zu TSB und BHI.

Es konnte unter Laborbedingungen wiederholt gezeigt werden, dass nach einer Inkubation über 18 h *E. coli*₁₃₀₃ eine Keimzahl von etwa $8 \cdot 10^8$ CFU/mL und *S. aureus*₁₀₂₇ von $4 \cdot 10^8$ CFU/mL erreichte (siehe IV.1.1). Dies deckt sich in etwa mit Angaben aus anderen Studien, wo Werte von $3,1 \cdot 10^8$ CFU/mL für *E. coli*₁₃₀₃ und $1,4 \cdot 10^8$ CFU/mL für *S. aureus*₁₀₂₇ nach 14-stündiger Inkubation genannt sind (MÜHLBAUER, 2012). Dem gegenüber zeigte *Sc. uberis*_{O140J} mit $5 \cdot 10^7$ CFU/mL niedrigere Werte als *E. coli* und *S. aureus*. In der Literatur konnten keine Angaben zu erreichten Wachstumsmaxima des Stammes *Sc. uberis*_{O140J} *in vitro* gefunden werden. Leigh et al. (2010) machen allerdings Angaben über erreichte Maximalwerte *in vivo* von 10^6 - 10^8 CFU/mL.

Für alle drei untersuchten Modellpathogene konnte ein reproduzierbar arttypisches Wachstumsverhalten gezeigt werden. Dadurch war die Möglichkeit gegeben, einen reproduzierbaren Einsatz an Bakterienkolonien für die Versuchsdurchführung herzustellen.

2 Wirksamkeit antimikrobieller Peptide gegenüber Mastitis-Pathogenen *in vitro*

Antimikrobielle Peptide stellen eine sehr wichtige Komponente des angeborenen Immunsystems und damit bei der Erregerabwehr in der bovinen Milchdrüse dar (LAI und GALLO, 2009; TAKAGI et al., 2012). Defensine und Cathelicidine sind beim Rind die zwei wichtigsten Gruppen der AMP (ROOSEN et al., 2004; ZANETTI, 2005; TOMASINSIG et al., 2010). In der vorliegenden Arbeit sollte ein geeignetes Testverfahren für den funktionellen Nachweis von AMP gegen Mastitis-Pathogene *in vitro* etabliert werden. Darauf basierend wurden als Stellvertreter das Defensin LAP sowie das Cathelicidin Indolicidin (CATHL4) für die Versuchsdurchführung ausgewählt. Die Testkonzentration für Indolicidin wurde nach Anhaltspunkten aus der Literatur gewählt. Diese lagen zwischen 20 µg/mL (FRIEDRICH et al., 2001) und 100 µg/mL (SUBBALAKSHMI und SITARAM, 1998). Da für LAP keine Erfahrungsberichte über bereits eingesetzte Konzentrationen gefunden werden konnten, wurden zunächst orientierend identische Kon-

zentrationen wie für Indolicidin verwendet. Die Konzentrationen für beide AMP lagen bei jeweils 83 µg/mL und 41 µg/mL.

Es konnte sowohl für LAP als auch für Indolicidin in den verwendeten Konzentrationen gezeigt werden, dass sie das bakterielle Wachstum aller drei untersuchten Pathogene signifikant hemmten (siehe IV.2.1 und IV.2.2). Dabei konnte außerdem eine konzentrationsabhängige Hemmung des Wachstums von *E. coli*₁₃₀₃, *S. aureus*₁₀₂₇ und *Sc. uberis*_{O140J} beobachtet werden.

LAP und Indolicidin wirken antimikrobiell gegenüber E. coli, S. aureus und Sc. uberis

In der Literatur sind die antimikrobiellen Eigenschaften von LAP gegenüber Mikroorganismen wiederholt beschrieben (SCHONWETTER et al., 1995; KOHLGRAF et al., 2010; KAWAI et al., 2013). Es ist ebenfalls mehrfach erwähnt, dass im Falle einer intramammären Infektion eine Heraufregulation der Genexpression für LAP in mammären Zellen stattfindet. Dies gilt sowohl für Infektionsmodelle *in vivo* (PETZL et al., 2008; GUNTHER et al., 2017) als auch *in vitro* (LIU et al., 2011). Bisher fehlte jedoch der direkte Nachweis einer antimikrobiellen Wirkung von LAP gegenüber Mastitiserregern *in vitro*. Dieser Nachweis konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit erbracht werden. In der durchgeführten Versuchsreihe konnten sich die Pathogene *E. coli*₁₃₀₃, *S. aureus*₁₀₂₇ und *Sc. uberis*_{O140J} unter Zusatz der gewählten Konzentrationen von LAP (83 µg/mL und 41 µg/mL) zwar weiterhin signifikant vermehren. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass der Zusatz von LAP das bakterielle Wachstum signifikant gegenüber dem Kontrollansatz verlangsamt (siehe IV.2.1). Weiterhin konnte ausnahmslos beobachtet werden, dass die höhere Konzentration von LAP einen signifikant stärker hemmenden Effekt zeigte als die geringere Konzentration.

Auch für Indolicidin ist eine antimikrobielle Wirksamkeit eingehend beschrieben worden (ZANETTI, 2005; TOMASINSIG et al., 2010; TOMASINSIG et al., 2012). Hierbei sind vor allem experimentelle Ansätze bekannt, in welchen ausgesuchte Pathogene in Anwesenheit von Indolicidin kultiviert wurden. Viele dieser Studien zielten überwiegend auf die Untersuchungen des genauen Wirkmechanismus von Indolicidin ab (FALLA et al., 1996; SUBBALAKSHMI und SITARAM, 1998; FRIEDRICH et al., 2001). FRIEDRICH et al (2001) verfolgten

das Ziel, den Tötungsmechanismus von Indolicidin zu untersuchen, wofür unter anderem *S. aureus* mit einem Derivat von Indolicidin kultiviert wurde (in 2- und 10-facher Menge der festgestellten minimalen Hemmkonzentration). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass das Protein die Zellmembran durchdringt, um an intrazelluläre Zielstrukturen zu gelangen. Diese Beobachtung deckt sich mit Aussagen anderer Untersuchungen (SUBBALAKSHMI und SITARAM, 1998): Sie inkubierten *E. coli* mit verschiedenen Konzentrationen von Indolicidin. Die Fähigkeit zur Lyse des Pathogens durch Indolicidin sollte mittels Optischer Dichte (OD₅₅₀)-Messung dargestellt werden. Interessanterweise zeigte die Bakterienkultur keine Verringerung der Trübung, wenn 10⁸ CFU *E. coli* mit Konzentrationen von 20 und 30 µg/mL Indolicidin behandelt wurde. Die Kultur ohne Zusatz von Indolicidin zeigte über die gesamte Messdauer die geringste optische Dichte. Diese Beobachtung wurde dadurch erklärt, dass ein Zusatz von Indolicidin die Bildung von Filamenten bei *E. coli* förderte, welches sich auf die optische Dichte der Suspension auswirkte. Um einen erkennbaren hemmenden Effekt auf die RNA-Synthese zu erreichen, musste eine Indolicin-Konzentration 50 und 100 µg/mL gewählt werden. Diese genannte Studie veranlasste uns, in der vorliegenden Arbeit vergleichbar hohe Konzentrationen von Indolicidin einzusetzen (41 µg/mL und 83 µg/mL). Auf das Anfertigen einer Dosis-Wirkungskinetik in höheren Konzentrationen musste aus Kostengründen verzichtet werden. Es konnte jedoch ein signifikanter und konzentrationsabhängiger antimikrobieller Effekt gegenüber *E. coli* gezeigt werden (siehe Abbildung 14).

Ähnliche Ergebnisse konnten für *S. aureus* erzielt werden. Die Peptide LAP und Indolicidin zeigten durchweg signifikante wachstumshemmende Effekte. Für LAP konnte im Gegensatz zu Indolicidin eine signifikante Konzentrationsabhängigkeit für die gesamte Versuchsdauer dargestellt werden (siehe Abbildung 12). Die höhere Konzentration (83 µg/mL) von Indolicidin zeigte lediglich für die letzten zwei gemessenen Stunden einen stärker hemmenden Effekt als die niedrigere Konzentration von 41 µg/mL (siehe Abbildung 15). Dennoch deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die beiden untersuchten Peptide durch die antimikrobiellen Eigenschaften gegen *S. aureus* zur Erregerabwehr beitragen können.

Die Wirkung von Indolicidin und LAP auf das bakterielle Wachstum von *Sc. uberis* wurde hier erstmals in dieser Form *in vitro* untersucht. Die Ergebnisse

zeigen auf, dass sich *Sc.uberis*_{0140J} in Anwesenheit von LAP und Indolicidin zwar signifikant vermehren kann, dennoch konnte sowohl für LAP als auch für Indolicidin eine signifikante wachstumshemmende Wirkung nachgewiesen werden (siehe Abbildung 16). Die Ergebnisse lassen vermuten, dass die gesteigerte Expression von LAP und Indolicidin während einer Mastitis (PETZL et al., 2008; SMOLENSKI et al., 2011) auch gegenüber *Sc. uberis* antimikrobielle Eigenschaften entfalten und so maßgeblich zur lokalen Erregerabwehr im Euter beitragen kann. Der genaue Wirkungsmechanismus ist bislang nicht bekannt, und seine Aufklärung bedürfte weiterer Untersuchungen.

3 Neutrophile Granulozyten zeigen antimikrobielle Wirksamkeit gegenüber Mastitis-Pathogenen *in vitro*

Polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN) sind ein unverzichtbarer Bestandteil bei der Mastitisabwehr und gelten als die effektivsten Faktoren gegenüber intramammären bakteriellen Infektionen (M. J. PAAPE et al., 2003; GRIESBECK-ZILCH et al., 2008). Ihnen stehen dabei verschiedene Wirkungsmechanismen zur Verfügung. Hierbei gilt die Phagozytose Komplement- oder Antikörper-opsonisierter Erreger als die effektivste Art und Weise der Bekämpfung. In Phagolysosomen findet daraufhin eine Abtötung der Pathogene statt (MAYER-SCHOLL et al. 2004; AMULIC et al. 2012). In Milch können PMN jedoch deutlich schlechter phagozytieren als im Blut, da sie auch in großer Zahl Fette und Kaseine aufnehmen (RAINARD und RIOLLET, 2003). Phagozytose-unabhängige Mechanismen könnten somit vor allem in der Milch eine wichtige Rolle spielen: PMN können mittels Degranulation ihrer verschiedenen Granula antimikrobielle Aktivität entfalten (GULLBERG et al., 1999; SORDILLO und STREICHER, 2002; AMULIC et al., 2012). Hauptbestandteile dieser Granula sind unter anderem antimikrobielle Peptide wie Defensine und Cathelicidine (GANZ, 2003; TAKAGI et al., 2012). Im Rahmen dieser Arbeit sollte bewusst eine zelluläre Komponente mituntersucht werden, die ihre antimikrobielle Wirksamkeit mittels AMP entfaltet. Da wie ursprünglich geplant, die Untersuchungen der Induktion von AMP in Milchdrüsenepithelzellen nicht gelang (siehe IV.1.2), sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit der Einfluss von *ex vivo* gewonnenen PMN auf *E. coli*₁₃₀₃, *S. aureus*₁₀₂₇ und *Sc. uberis*_{0140J} *in vitro* untersucht werden.

Fünf unterschiedliche Konzentrationen von PMN wurden jeweils mit den entsprechenden Modellpathogenen kokultiviert (siehe III.3.7.1.2.). Zur Eingrenzung interindividueller Schwankungen hinsichtlich der funktionellen Kapazität von PMN wurde ausschließlich nur ein Spendertier verwendet. Unsere Ergebnisse zeigten auf, dass sich *E. coli*, *S. aureus* und *Sc. uberis* in Anwesenheit von PMN weiterhin vermehren konnten. Allerdings wurde das bakterielle Wachstum aller drei untersuchten Pathogene in Abhängigkeit von der PMN-Konzentration zu verschiedenen Zeitpunkten signifikant gebremst (siehe IV.2.3). Dieser Effekt war jedoch Pathogen-abhängig unterschiedlich stark: Es konnte dabei festgestellt werden, dass *E. coli*₁₃₀₃ erst fünf Stunden nach Inkubationsbeginn und nur durch die höchste eingesetzte Konzentration der PMN ($1,6 \cdot 10^6$ PMN/Well) ein signifikant geringeres Wachstum zeigte. Bei *S. aureus*₁₀₂₇ und *Sc. uberis*_{O140J} zeigte sich die wachstumshemmende Wirkung der PMN bereits drei Stunden nach Inkubationsbeginn und auch schon bei einer geringeren Konzentration der PMN ($1,6 \cdot 10^4$ PMN/Well, siehe Abbildung 18 und Abbildung 19).

In einer Studie von LEIJH et al. (1979) wurde die Kinetik der Phagozytose von *E. coli* (Stamm O54) und *S. aureus* (Type 42D) durch humane PMN untersucht. Ein Teilergebnis demonstrierte, dass vor allem das Verhältnis der Bakterienkonzentration zu der PMN-Konzentration ausschlaggebend ist sowie das „Rütteln“ der Suspension während der Inkubationszeit um die Wahrscheinlichkeit eines Aufeinandertreffens von PMN mit den Pathogenen zu erhöhen. Bei einem Verhältnis von 1:1 ($5 \cdot 10^6$ PMN bzw. CFU/mL) waren nach 30 Minuten Inkubationszeit bei 37°C die Anzahl extrazellulär messbarer Bakterien um 80 % verringert. Ohne die kontinuierliche Bewegung der Suspension (4 rpm) wurden jedoch keine Erreger phagozytiert. In unseren Versuchen wurden die Suspensionen lediglich vor der stündlichen Messung der optischen Dichte aufgerüttelt, was eventuell mit ein Grund für die erst nach 4 Stunden sichtbaren Effekte sein könnte. Das Pathogen-PMN Verhältnis bewegte sich in unseren Versuchen in einem Verhältnis von ca. 1:0,1 bis 1:50. Dennoch konnten signifikante Effekte bereits ab einem Verhältnis von 1:0,1 dargestellt werden. Die gewählten Konzentration sollten 10^{10} CFU/mL für die Bakterien sowie 10^8 PMN/mL nicht überschreiten, da es sonst zu Zellagglutinationen kommen kann (LEIJH et al., 1979).

4 Induktion antimikrobieller Peptide in mammärem Gewebe bei Pathogen-spezifischer Mastitis

Antimikrobielle Faktoren werden nach intramammärer E. coli-Infektion in vivo heraufreguliert

Zelluläre Faktoren gelten als die wichtigsten Komponenten bei der Infektionsabwehr im Euter (M. J. PAAPE et al., 2003). Die Rolle von AMP im Euter ist bisher bei Rindern jedoch noch wenig untersucht. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass während einer durch *E. coli* hervorgerufenen Mastitis das Defensin LAP, das Calgranulin S100A9 und das Chemokin CCL20 stark heraufreguliert werden (siehe IV.3). Allen drei Faktoren wird eine antimikrobielle Aktivität zugeschrieben (YANG et al., 2003; ISOBE et al., 2009; DONATO et al., 2013). Sie wurden zudem wiederholt auf Transkriptebene im Rahmen experimenteller Mastitiden und stimulierter Milchdrüsenepithelzellen nachgewiesen (RINALDI et al., 2010; GUNTHER et al., 2011; PETZL et al., 2016). Aufgrund technischer Schwierigkeiten gelang der geplante Nachweis von Transkripten für CATHL4 nicht, da die dafür in der Literatur angegebenen Primerpaare (TOMASINSIG et al., 2010) nach mehreren Optimierungsschritten nicht verlässlich einsetzbar waren (Daten nicht gezeigt). Auch in verfügbaren Daten transkriptomweiter Untersuchungen zur Genregulation bei der Mastitis konnte bisher keine Regulation für CATHL4 aufgezeigt werden (MITTERHUEMER et al., 2010; JENSEN et al., 2013).

Eine gezielte intramammäre Vorbehandlung mit LPS („Priming“) steigert die Expression von AMP bei einer nachfolgenden intramammären E. coli-Infektion

In Vorläuferstudien konnte aufgezeigt werden, dass eine intramammäre Vorbehandlung mit LPS eine experimentelle Mastitis mit *E. coli* verhindern konnte oder abmilderte sowie die Anzahl von *E. coli* in der Milch betroffener Kühe signifikant reduzierte (PETZL et al., 2012; WALDMÜLLER, 2012). Dieses Phänomen beruht auf einer transient induzierten Endotoxintoleranz (BISWAS und LOPEZ-COLLAZO, 2009). Die Endotoxin-Toleranz besitzt eine duale Kernfunktion: Neben der beschriebenen fehlenden Induktion inflammatorischer Gene werden endogene antimikrobielle Faktoren signifikant verstärkt und verlängert exprimiert (FOSTER et al., 2007). Dies wird als ein Mechanismus angesehen, erneute bakte-

rielle Infektion zu verhindern. In dieser Arbeit sollte geprüft werden, ob eine intramammäre LPS-Vorbehandlung („Priming“) die Transkriptabundanz ausgesuchter antimikrobieller Peptide bei einem wiederholten Pathogenkontakt steigert. Dies ist bisher nur von Milchdrüsenepithelzellen bekannt (GUNTHER et al., 2012). Es konnte im Rahmen dieser Arbeit erstmals gezeigt werden, dass die Gene LAP und S100A9 signifikant stärker während einer *E. coli*-Mastitis exprimiert wurden, wenn vorher eine intramammäre LPS-Behandlung durchgeführt worden war (siehe IV.3). Diese neue Erkenntnis wurde umso stärker unterstrichen durch die Tatsache, dass die vorbehandelten Tiere mit gesteigerter Expression antimikrobieller Gene gleichzeitig schneller in der Lage waren, die Keimzahl von *E. coli* in der Milch zu reduzieren (siehe IV.3.4) und klinisch weniger stark an einer Mastitis erkrankten (WALDMÜLLER, 2012). Interessanterweise konnte diese Beobachtung für das antimikrobiell wirksame Chemokin CCL20 nicht bestätigt werden (siehe IV.3.3). Es wurde jedoch im Sinne einer Endotoxintoleranz auch nicht vermindert exprimiert, wie dies z.B. in einer anderen Studie gezeigt werden konnte (PETZL et al., 2012). Diese unterschiedlichen Beobachtungen könnten dadurch begründet sein, dass sich die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Tiere alle ca. fünf Tage post partum befanden und alle eine klinische Mastitis entwickelten (WALDMÜLLER, 2012), während es sich bei der anderen Studie um Tiere in der Mitte der Laktation handelte, die keine Mastitis entwickelten. Bekanntermaßen wird die Ausprägung klinischer *E.-coli*-Mastitiden wesentlich durch den Zeitpunkt relativ zur Kalbung beeinflusst (BURVENICH et al., 2003).

Insgesamt ist es möglich, durch eine intramammäre Vorbehandlung mit LPS die Induzierbarkeit ausgesuchter AMP im Euter bei einer anschließenden experimentellen *E. coli*-Mastitis zu steigern. Dies ist als ein potentieller Mechanismus anzusehen, zukünftig intramammäre Infektionen zu verhindern oder klinisch abzumildern.

5 Schlussbetrachtung

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass neben den bekannten zellulären Mechanismen auch AMP eine Rolle in der Infektionsabwehr in der Milchdrüse spielen (LAI und GALLO, 2009). Für das β -Defensin LAP und das Cathelicidin Indolicidin konnte mit dem etablierten Verfahren zum Nachweis antimikro-

bieller Aktivität ihre wachstumshemmende Wirkung gegen die drei wichtigsten Mastitiserreger *E. coli*, *S. aureus* und *Sc. uberis* *in vitro* gezeigt werden. Ein wachstumshemmender Effekt auf die Modellpathogene konnte ebenfalls durch die Anwesenheit von PMN erreicht werden, welche eine Vielzahl an AMP in ihren Granula enthalten (SORDILLO et al., 1997). Mittels molekularbiologischer Untersuchungen von stimulierten Eutergewebeproben konnte außerdem gezeigt werden, dass AMP im Eutergewebe durch bestimmte Reize verstärkt induzierbar sind bzw. eine Vorbehandlung des Euters mit dem Toll-like-Rezeptor-Liganden LPS zu einer gesteigerten Expression von AMP während einer folgenden intramamären Infektion mit *E. coli* führt.

Diese Arbeit ist als ein Teilprojekt eines Gesamtkonzepts zur Mastitisforschung in der Arbeitsgruppe zu betrachten. Es gilt sich im Weiteren darauf zu konzentrieren, wie die Expression und Sekretion von AMP gezielt gesteigert werden kann, um die Infektionsabwehr in der Milchdrüse zu beeinflussen. Dabei wäre es vielversprechend, epigenetische Regulationsmuster von AMP in PMN und epithelialen Zellen genauer zu untersuchen, wie dies bereits in einem assoziierten Teilprojekt für Monozyten und Makrophagen gezeigt werden konnte (RAUTMANN, 2015). Die Erforschung dieser Zusammenhänge eröffnet die Möglichkeit, neue Therapie- und Prophylaxe-Konzepte für die Mastitisbekämpfung zu entwickeln, um langfristig der Forderung einer Antibiotikareduktion gerecht zu werden. Neue Ansätze sollten somit insbesondere darauf abzielen, selektiv das angeborene Immunsystem in eine erhöhte Alarmbereitschaft versetzen zu können, um die Etablierung von Mastitiden zu verhindern.

Da die Produktionskosten für rekombinante AMP jedoch nach wie vor sehr hoch sind, ist ihr breiter Einsatz in der Nutztiermedizin bisher noch nicht abzusehen. Die direkte Applikation scheint somit für die Prophylaxe und Therapie der Mastitis beim Rind keine Alternative darzustellen. Darum sollte vor allem das Ziel verfolgt werden, die natürliche Verfügbarkeit von AMP im betroffenen Organsystem zu fördern, so wie bereits für die Humanmedizin vorgeschlagen (PRADO MONTES DE OCA, 2013).

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Die Mastitis stellt eine der bedeutendsten Erkrankungen beim Milchrind dar und ist für den überwiegenden Anteil des Antibiotika-Einsatzes in Milchviehherden verantwortlich. Antimikrobielle Peptide (AMP) eine wichtige Komponenten des angeborenen Immunsystems, und sie können Mikroorganismen in der Milchdrüse abtöten. Beim Rind sind vor allem die β -Defensine bekannt, wovon das LAP (lingual antimicrobial peptide) als wichtigster Vertreter gilt und in Milchdrüsenepithelzellen gebildet wird. Weiterhin sind beim Rind eine Vielzahl von Cathelicidinen bekannt, die einen Hauptbestandteil der azurophilen Granula polymorphkerniger neutrophiler Granulozyten (PMN) ausmachen. Die antimikrobielle Wirksamkeit dieser AMP gegenüber Mastitis-Pathogenen wurde bislang nicht untersucht.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein geeignetes Testverfahren für den funktionellen Nachweis der Wirksamkeit von AMP gegen Mastitis-Pathogene *in vitro* zu etablieren. Weiterhin sollte untersucht werden, ob Milchdrüsenepithelzellen und PMN antimikrobielle Aktivität gegenüber Mastitis-Erregern *in vitro* zeigen. Das Vorliegen von Transkripten ausgewählter AMP in gezielt stimulierten *ex vivo* gewonnenen Eutergewebeproben sollte mittels RT-qPCR erfolgen.

Um die antimikrobielle Wirkung von LAP und dem Cathelicidin 4 (Indolicidin) auf drei wichtige Vertreter der Mastitis-Pathogene (*E. coli*, *S. aureus*, *Sc. uberis*) untersuchen zu können, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Assay für antimikrobielle Aktivität entwickelt. Der Versuchsansatz entsprach einem Mikrodilutionstest. Die Untersuchungen ergaben, dass LAP und Indolicidin das Wachstum von *E. coli*, *S. aureus* und *Sc. uberis* signifikant verlangsamten ($P < 0,001$). Dabei zeigte sich für LAP, dass eine Konzentration von 83 $\mu\text{g/mL}$ einen signifikant stärkeren wachstumshemmenden Effekt gegenüber allen drei untersuchten Mastitiserregern zeigte als 41 $\mu\text{g/mL}$ ($P < 0,001$). Ein ähnliches Bild stellte sich für Indolicidin dar: Auch hier wurde das Wachstum aller drei untersuchten Pathogene signifikant gehemmt. Allerdings zeigten sich hier stärkere Pathogen-spezifische Unterschiede: Die deutlichste Wirkung entfaltete Indolicidin gegenüber *Sc. uberis*. Hierbei war der Effekt von 83 $\mu\text{g/mL}$ gegenüber 41 $\mu\text{g/mL}$ zu jedem untersuchten Zeitpunkt signifikant stärker ($P < 0,01$). Den geringsten Effekt zeigte Indolicidin

gegenüber *S. aureus*. Hierbei hemmte 6 h nach Inkubationsbeginn nur eine Konzentration von 83 µg/mL Indolicidin das bakterielle Wachstum.

Ergänzend sollte untersucht werden, ob zelluläre Faktoren des angeborenen Immunsystems ähnliche Effekte gegenüber Mastitis-Pathogen *in vitro* aufweisen wie AMP. Die Etablierung eines validen Zellmodells mit einer immortalisierten Milchdrüsenepithelzelle (MAC-T) bereitete nicht unerhebliche methodische Schwierigkeiten und konnte im Rahmen dieser Arbeit keine Verwendung finden. Daher wurde der weitere Fokus auf PMN gelegt. Die Ergebnisse zeigten, dass abhängig von der PMN-Konzentration das Wachstum aller drei untersuchten Pathogene signifikant gehemmt wurde. Während das Wachstum von *E. coli* erst 5-6 h nach Inkubationsbeginn und nur durch die höchste Konzentration der PMN ($1,6 \cdot 10^6$ PMN/mL) ein signifikant geringeres Wachstum zeigte ($P < 0,01$), konnte dies für *S. aureus* und *Sc. uberis* bereits nach 4 h und auch schon bei einer weit geringeren PMN-Konzentration ($1,6 \cdot 10^4$ PMN/mL) festgestellt werden.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde geprüft, ob eine intramammäre Vorbehandlung mit 1 µg LPS/Euterviertel die Transkriptabundanz ausgewählter antimikrobieller Peptide moduliert. Zunächst konnte mittels RT-qPCR aus *ex vivo* gewonnenen Proben gezeigt werden, dass während einer durch *E. coli* hervorgerufenen Mastitis LAP, das Calgranulin S100A9 und das Chemokin CCL20 signifikant heraufreguliert werden. Es ist bekannt, dass eine Vorbehandlung mit LPS eine experimentelle *E. coli*-Mastitis abmildern kann. Vor diesem Hintergrund sollte überprüft werden, ob basierend auf dem Phänomen einer induzierten Endotoxintoleranz die Transkriptabundanz für LAP, S100A9 und CCL20 bei wiederholtem Kontakt mit pathogenen Komponenten gesteigert nachweisbar sind. Es konnte im Rahmen dieser Arbeit erstmals gezeigt werden, dass für AMP kodierende Gene signifikant stärker während einer *E. coli*-Mastitis exprimiert wurden, wenn vorher eine intramammäre LPS-Behandlung durchgeführt worden war (LAP: 32-fache Steigerung, $P < 0,01$; S100A9: 57-fache Steigerung, $P < 0,05$). Für das antimikrobiell wirksame Chemokin CCL20 konnte weder eine vermehrte noch eine verringerte Expression gezeigt werden.

Die Untersuchungen zeigen, dass durch eine intramammäre Vorbehandlung mit einem Toll-like-Rezeptor-Agonisten die Induzierbarkeit ausgewählter AMP im Euter bei einer anschließenden experimentellen *E. coli*-Mastitis gesteigert werden

kann. Zudem konnte gezeigt werden, dass die beiden AMP LAP und Indolicidin *in vitro* ein antimikrobielles Potential für relevante Mastitiserreger aufweisen. Diese Ergebnisse sind als Basisdaten für die weitere Erprobung eines neuen Konzeptes zur Mastitisprävention anzusehen.

VII. SUMMARY

Endogenous antimicrobial peptides in the bovine mammary gland

Mastitis is one of the most important diseases affecting dairy cows. It is responsible for the predominant use of antibiotics in dairy production. Antimicrobial peptides (AMP) play an important role within the innate immune system and are able to kill microorganism in the bovine mammary gland. Beta-defensins represent the most acknowledged AMP in cattle. Lingual antimicrobial peptide (LAP) is synthesized in the epithelial cells of the mammary gland and is one of the most reviewed defensins. Furthermore, numerous cathelicidins have been reported in cattle. They represent a major component of the azurophilic granules of polymorphonuclear neutrophils (PMN). The antimicrobial properties of these AMP against major mastitis pathogens have not yet been investigated in detail up to now.

The aim of the study was to establish a suitable *in vitro* assay for the functional detection of the antimicrobial efficacy of AMP against major mastitis pathogens. Furthermore, it should be investigated whether epithelial cells of the mammary gland and PMN exhibit antimicrobial activity against mastitis pathogens *in vitro*. Using RT-qPCR, the presence of assorted AMP-transcripts should be measured in *ex vivo* derived mammary tissue samples from donor animals which had underwent experimental mastitis with or without intramammary pretreatment with the TLR ligand LPS.

In order to investigate the antimicrobial effect of LAP and cathelicidin 4 (indolicidin) towards the three most important mastitis pathogens (*E. coli*, *S. aureus*, *Sc. uberis*) an assay for antimicrobial activity was established. The experimental set-up related to a microdilution assay. The study showed, that LAP and indolicidin significantly inhibited the growth of *E. coli*, *S. aureus* and *Sc. uberis* ($P < 0.001$). Concentrations of 83 $\mu\text{g/mL}$ LAP inhibited the growth of all three tested mastitis pathogens more significantly than 41 $\mu\text{g/mL}$ ($P < 0.001$). Also indolicidin significantly inhibited the growth of all three pathogens. However, this effect showed to be more pathogen-specific: in comparison to *E. coli* and *S. aureus* indolicidin displayed the strongest antimicrobial effect towards *Sc. uberis*. Concentrations of 83 $\mu\text{g/mL}$ indolicidin inhibited the growth of all

three tested mastitis pathogens more significantly than 41 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($P < 0.01$). The weakest effect of indolicidin was detected against *S. aureus*. After incubating for 6 h incubation only a concentration of 83 $\mu\text{g}/\text{mL}$ inhibited *S. aureus* growth.

Another focus of this study was investigating whether cellular components of the innate immune system display comparable antimicrobial effects like AMP against mastitis pathogens *in vitro*. The establishment of a valid cell-model with an immortalised mammary epithelial cell line (MAC-T) caused significant methodological difficulties and could not be used within this work as primarily planned. Thus the focus was laid on PMN. The results showed that depending on the concentration of PMN the growth of all three mastitis pathogens was significantly inhibited. *E. coli* growth was only significantly inhibited 5-6 h after incubation started and only by the highest concentration of PMN ($5 \cdot 10^6$ PMN/mL). In contrast, PMN were able to inhibit *S. aureus* and *Sc. uberis* growth already after 4 h of incubation and also at lower PMN concentrations ($5 \cdot 10^4$ PMN/mL).

In an additional part of this study it was examined whether an intramammary pretreatment with 1 μg LPS per udder quarter modulates the transcript abundances of assorted AMPs. Using RT-qPCR from *ex vivo* derived samples it could be demonstrated, that LAP, the calgranulin S100A9 and the chemokine CCL20 were significantly up regulated during an experimentally induced *E. coli* mastitis. It is already known, that inducing an “endotoxin tolerance” by intramammary pretreatment with LPS can reduce the severity of an experimental *E. coli* mastitis. However, genes coding for antimicrobial action may be overexpressed in these animals. Within this study it should be investigated whether repeated contact with pathogen components induced increased transcript abundances of LAP, S100A9 and CCL20.

We could show for the first time, that the expression of genes coding for AMPs was significantly higher during *E. coli* mastitis when animals had received intramammary pretreatment with LPS 3 d prior to *E. coli* challenge (LAP: 32-fold increase, $P < 0.01$; S100A9: 57-fold increase, $P < 0.05$). *In vivo* these animals had also shown significantly ($P < 0.05$) fewer *E. coli* counts in milk. The expression of the antimicrobial chemokine CCL20 was not affected by LPS pretreatment. The results showed that intramammary pretreatment with a TLR agonist like LPS can increase the inducibility of specific AMP in the mammary gland in a subsequent

experimental *E. coli* mastitis. This may be a future approach to prevent or reduce the severity of mastitis and enhance resolution of intramammary infection.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

- ADDIS, M. F., PISANU, S., MAROGNA, G., CUBEDDU, T., PAGNOZZI, D., CACCIOTTO, C., CAMPESI, F., SCHIANCHI, G., ROCCA, S., UZZAU, S. (2013): Production and release of antimicrobial and immune defense proteins by mammary epithelial cells following *Streptococcus uberis* infection of sheep. *Infect Immun* 81, 9, 3182-3197.
- ALMEIDA, R. A., MATTHEWS, K. R., CIFRIAN, E., GUIDRY, A. J., OLIVER, S. P. (1996): *Staphylococcus aureus* invasion of bovine mammary epithelial cells. *J Dairy Sci* 79, 6, 1021-1026.
- AMULIC, B., CAZALET, C., HAYES, G. L., METZLER, K. D., ZYCHLINSKY, A. (2012): Neutrophil function: from mechanisms to disease. *Annu Rev Immunol* 30, 459-489.
- BARKEMA, H. W., SCHUKKEN, Y. H., ZADOKS, R. N. (2006): Invited Review: The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. *J Dairy Sci* 89, 6, 1877-1895.
- BERA, S., GHOSH, A., SHARMA, S., DEBNATH, T., GIRI, B., BHUNIA, A. (2015): Probing the role of Proline in the antimicrobial activity and lipopolysaccharide binding of indolicidin. *J Colloid Interface Sci* 452, 148-159.
- BISWAS, S. K., LOPEZ-COLLAZO, E. (2009): Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. *Trends Immunol* 30, 10, 475-487.
- BOWDISH, D. M., DAVIDSON, D. J., SCOTT, M. G., HANCOCK, R. E. (2005): Immunomodulatory activities of small host defense peptides. *Antimicrob Agents Chemother* 49, 5, 1727-1732.
- BOXBERGER, H. J., (2013): *Leitfaden für die Zell- und Gewebekultur: Einführung in Grundlagen und Techniken*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- BRENAUT, P., LEFEVRE, L., RAU, A., LALOE, D., PISONI, G., MORONI, P., BEVILACQUA, C., MARTIN, P. (2014): Contribution of mammary epithelial cells to the immune response during early stages of a bacterial infection to *Staphylococcus aureus*. *Vet Res* 45, 16.
- BURTON, J. L., ERSKINE, R. J. (2003): Immunity and mastitis. Some new ideas for an old disease. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 19, 1, 1-45, v.
- BURVENICH, C., VAN MERRIS, V., MEHRZAD, J., DIEZ-FRAILE, A., DUCHATEAU, L. (2003): Severity of *E. coli* mastitis is mainly determined by cow factors. *Vet Res* 34, 5, 521-564.
- CAMERON, M., MCKENNA, S. L., MACDONALD, K. A., DOHOO, I. R., ROY, J. P., KEEFE, G. P. (2014): Evaluation of selective dry cow treatment following on-farm culture: risk of postcalving intramammary infection and clinical mastitis in the subsequent lactation. *J Dairy Sci* 97, 1, 270-284.
- CHA, E., BAR, D., HERTL, J. A., TAUER, L. W., BENNETT, G., GONZALEZ,

- R. N., SCHUKKEN, Y. H., WELCOME, F. L., GROHN, Y. T. (2011): The cost and management of different types of clinical mastitis in dairy cows estimated by dynamic programming. *J Dairy Sci* 94, 9, 4476-4487.
- COLE, A. M., GANZ, T., LIESE, A. M., BURDICK, M. D., LIU, L., STRIETER, R. M. (2001): Cutting edge: IFN-inducible ELR- CXC chemokines display defensin-like antimicrobial activity. *J Immunol* 167, 2, 623-627.
- DE VliegHER, S., FOX, L. K., PIEPERS, S., MCDougALL, S., BARKEMA, H. W. (2012): Invited review: Mastitis in dairy heifers: nature of the disease, potential impact, prevention, and control. *J Dairy Sci* 95, 3, 1025-1040.
- DESSING, M. C., TAMMARO, A., PULSKENS, W. P., TESKE, G. J., BUTTER, L. M., CLAESSEN, N., VAN EIJK, M., VAN DER POLL, T., VOGL, T., ROTH, J., FLORQUIN, S., LEEMANS, J. C. (2014): The calcium-binding protein complex S100A8/A9 has a crucial role in controlling macrophage-mediated renal repair following ischemia/reperfusion. *Kidney Int*.
- DOANE, M., SARENBO, S. (2014): Antibiotic usage in 2013 on a dairy CAFO in NY State, USA. *Infect Ecol Epidemiol* 4.
- DODD, I. B., MICHEELSEN, M. A., SNEPPEN, K., THON, G. (2007): Theoretical analysis of epigenetic cell memory by nucleosome modification. *Cell* 129, 4, 813-822.
- DOHERTY, R., C, O. F., MEADE, K. G. (2014): Comparative epigenetics: relevance to the regulation of production and health traits in cattle. *Anim Genet* 45 Suppl 1, 3-14.
- DOHERTY, R., O'FARRELLY, C., MEADE, K. G. (2013): Epigenetic regulation of the innate immune response to LPS in bovine peripheral blood mononuclear cells (PBMC). *Vet Immunol Immunopathol* 154, 3-4, 102-110.
- DONATO, R. (1999): Functional roles of S100 proteins, calcium-binding proteins of the EF-hand type. *Biochim Biophys Acta* 1450, 3, 191-231.
- DONATO, R., CANNON, B. R., SORCI, G., RIUZZI, F., HSU, K., WEBER, D. J., GECZY, C. L. (2013): Functions of S100 proteins. *Curr Mol Med* 13, 1, 24-57.
- EGESTEN, A., ELIASSON, M., JOHANSSON, H. M., OLIN, A. I., MORGELIN, M., MUELLER, A., PEASE, J. E., FRICK, I. M., BJORCK, L. (2007): The CXC chemokine MIG/CXCL9 is important in innate immunity against *Streptococcus pyogenes*. *J Infect Dis* 195, 5, 684-693.
- ERSKINE, R. J., WAGNER, S., DEGRAVES, F. J. (2003): Mastitis therapy and pharmacology. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 19, 1, 109-138, vi.
- FALLA, T. J., KARUNARATNE, D. N., HANCOCK, R. E. (1996): Mode of action of the antimicrobial peptide indolicidin. *J Biol Chem* 271, 32, 19298-19303.
- FALVO, J. V., JASENOSKY, L. D., KRUIDENIER, L., GOLDFELD, A. E. (2013): Epigenetic control of cytokine gene expression: regulation of the TNF/LT locus and T helper cell differentiation. *Adv Immunol* 118, 37-128.

- FILIPP, D., ALIZADEH-KHIAVI, K., RICHARDSON, C., PALMA, A., PAREDES, N., TAKEUCHI, O., AKIRA, S., JULIUS, M. (2001): Soluble CD14 enriched in colostrum and milk induces B cell growth and differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 2, 603-608.
- FOELL, D., WITTKOWSKI, H., VOGL, T., ROTH, J. (2007): S100 proteins expressed in phagocytes: a novel group of damage-associated molecular pattern molecules. *J Leukoc Biol* 81, 1, 28-37.
- FOSTER, S. L., HARGREAVES, D. C., MEDZHITOV, R. (2007): Gene-specific control of inflammation by TLR-induced chromatin modifications. *Nature* 447, 7147, 972-978.
- FRIEDRICH, C. L., ROZEK, A., PATRZYKAT, A., HANCOCK, R. E. (2001): Structure and mechanism of action of an indolicidin peptide derivative with improved activity against gram-positive bacteria. *J Biol Chem* 276, 26, 24015-24022.
- FU, Y., ZHOU, E., LIU, Z., LI, F., LIANG, D., LIU, B., SONG, X., ZHAO, F., FEN, X., LI, D., CAO, Y., ZHANG, X., ZHANG, N., YANG, Z. (2013): Staphylococcus aureus and Escherichia coli elicit different innate immune responses from bovine mammary epithelial cells. *Vet Immunol Immunopathol* 155, 4, 245-252.
- GANZ, T. (2003): Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 3, 9, 710-720.
- GILBERT, F. B., CUNHA, P., JENSEN, K., GLASS, E. J., FOUCRAS, G., ROBERT-GRANIE, C., RUPP, R., RAINARD, P. (2013): Differential response of bovine mammary epithelial cells to Staphylococcus aureus or Escherichia coli agonists of the innate immune system. *Vet Res* 44, 40.
- GOLDAMMER, T., ZERBE, H., MOLENAAR, A., SCHUBERTH, H. J., BRUNNER, R. M., KATA, S. R., SEYFERT, H. M. (2004): Mastitis increases mammary mRNA abundance of beta-defensin 5, toll-like-receptor 2 (TLR2), and TLR4 but not TLR9 in cattle. *Clin Diagn Lab Immunol* 11, 1, 174-185.
- GOUWY, M., STRUYF, S., PROOST, P., VAN DAMME, J. (2005): Synergy in cytokine and chemokine networks amplifies the inflammatory response. *Cytokine Growth Factor Rev* 16, 6, 561-580.
- GOYETTE, J., GECZY, C. L. (2011): Inflammation-associated S100 proteins: new mechanisms that regulate function. *Amino Acids* 41, 4, 821-842.
- GRIESBECK-ZILCH, B., MEYER, H. H., KUHN, C. H., SCHWERIN, M., WELLNITZ, O. (2008): Staphylococcus aureus and Escherichia coli cause deviating expression profiles of cytokines and lactoferrin messenger ribonucleic acid in mammary epithelial cells. *J Dairy Sci* 91, 6, 2215-2224.
- GULLBERG, U., BENGTSSON, N., BULOW, E., GARWICZ, D., LINDMARK, A., OLSSON, I. (1999): Processing and targeting of granule proteins in human neutrophils. *J Immunol Methods* 232, 1-2, 201-210.
- GUNTHER, J., ESCH, K., POSCHADEL, N., PETZL, W., ZERBE, H., MITTERHUEMER, S., BLUM, H., SEYFERT, H. M. (2011): Comparative kinetics of Escherichia coli- and Staphylococcus aureus-

- specific activation of key immune pathways in mammary epithelial cells demonstrates that *S. aureus* elicits a delayed response dominated by interleukin-6 (IL-6) but not by IL-1A or tumor necrosis factor alpha. *Infect Immun* 79, 2, 695-707.
- GUNTHER, J., PETZL, W., BAUER, I., PONSUKSILI, S., ZERBE, H., SCHUBERTH, H. J., BRUNNER, R. M., SEYFERT, H. M. (2017): Differentiating *Staphylococcus aureus* from *Escherichia coli* mastitis: *S. aureus* triggers unbalanced immune-dampening and host cell invasion immediately after udder infection. *Sci Rep* 7, 1, 4811.
- GUNTHER, J., PETZL, W., ZERBE, H., SCHUBERTH, H. J., KOCZAN, D., GOETZE, L., SEYFERT, H. M. (2012): Lipopolysaccharide priming enhances expression of effectors of immune defence while decreasing expression of pro-inflammatory cytokines in mammary epithelia cells from cows. *BMC Genomics* 13, 17.
- HATAKEYAMA, T., OKADA, M., SHIMAMOTO, S., KUBOTA, Y., KOBAYASHI, R. (2004): Identification of intracellular target proteins of the calcium-signaling protein S100A12. *Eur J Biochem* 271, 18, 3765-3775.
- HEIKKILA, A. M., NOUSIAINEN, J. I., PYORALA, S. (2012): Costs of clinical mastitis with special reference to premature culling. *J Dairy Sci* 95, 1, 139-150.
- HEIZMANN, C. W., COX, J. A. (1998): New perspectives on S100 proteins: a multi-functional Ca(2+)-, Zn(2+)- and Cu(2+)-binding protein family. *Biomaterials* 19, 4, 383-397.
- HIESHIMA, K., OHTANI, H., SHIBANO, M., IZAWA, D., NAKAYAMA, T., KAWASAKI, Y., SHIBA, F., SHIOTA, M., KATOU, F., SAITO, T., YOSHIE, O. (2003): CCL28 has dual roles in mucosal immunity as a chemokine with broad-spectrum antimicrobial activity. *J Immunol* 170, 3, 1452-1461.
- HOFMANN, M. A., DRURY, S., FU, C., QU, W., TAGUCHI, A., LU, Y., AVILA, C., KAMBHAM, N., BIERHAUS, A., NAWROTH, P., NEURATH, M. F., SLATTERY, T., BEACH, D., MCCLARY, J., NAGASHIMA, M., MORSER, J., STERN, D., SCHMIDT, A. M. (1999): RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. *Cell* 97, 7, 889-901.
- HOGVEEN, H., HUIJPS, K., LAM, T. J. (2011): Economic aspects of mastitis: new developments. *N Z Vet J* 59, 1, 16-23.
- HSU, C. H., CHEN, C., JOU, M. L., LEE, A. Y., LIN, Y. C., YU, Y. P., HUANG, W. T., WU, S. H. (2005): Structural and DNA-binding studies on the bovine antimicrobial peptide, indolicidin: evidence for multiple conformations involved in binding to membranes and DNA. *Nucleic Acids Res* 33, 13, 4053-4064.
- HUME, D. A., ROSS, I. L., HIMES, S. R., SASMONO, R. T., WELLS, C. A., RAVASI, T. (2002): The mononuclear phagocyte system revisited. *J Leukoc Biol* 72, 4, 621-627.
- HUYNH, H. T., ROBITAILLE, G., TURNER, J. D. (1991): Establishment of bovine mammary epithelial cells (MAC-T): an in vitro model for bovine

- lactation. *Exp Cell Res* 197, 2, 191-199.
- IBEAGHA-AWEMU, E. M., IBEAGHA, A. E., MESSIER, S., ZHAO, X. (2010): Proteomics, genomics, and pathway analyses of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* infected milk whey reveal molecular pathways and networks involved in mastitis. *J Proteome Res* 9, 9, 4604-4619.
- IBEAGHA-AWEMU, E. M., LEE, J. W., IBEAGHA, A. E., BANNERMAN, D. D., PAAPE, M. J., ZHAO, X. (2008): Bacterial lipopolysaccharide induces increased expression of toll-like receptor (TLR) 4 and downstream TLR signaling molecules in bovine mammary epithelial cells. *Vet Res* 39, 2, 11.
- ISOBE, N., NAKAMURA, J., NAKANO, H., YOSHIMURA, Y. (2009): Existence of functional lingual antimicrobial peptide in bovine milk. *J Dairy Sci* 92, 6, 2691-2695.
- IVASHKIV, L. B. (2013): Epigenetic regulation of macrophage polarization and function. *Trends Immunol* 34, 5, 216-223.
- JENSEN, K., GUNTHER, J., TALBOT, R., PETZL, W., ZERBE, H., SCHUBERTH, H. J., SEYFERT, H. M., GLASS, E. J. (2013): *Escherichia coli*- and *Staphylococcus aureus*-induced mastitis differentially modulate transcriptional responses in neighbouring uninfected bovine mammary gland quarters. *BMC Genomics* 14, 36.
- JIN, S., PARK, C. O., SHIN, J. U., NOH, J. Y., LEE, Y. S., LEE, N. R., KIM, H. R., NOH, S., LEE, Y., LEE, J. H., LEE, K. H. (2014): DAMP molecules S100A9 and S100A8 activated by IL-17A and house-dust mites, are increased in atopic dermatitis. *Exp Dermatol*.
- KALIVODA, E. M. (2010). *Funktionelle Untersuchungen zur Endotoxintoleranz bei der Mastitis des Rindes*. Inaugural-Dissertation. München.
- KAWAI, K., AKAMATSU, H., OBAYASHI, T., NAGAHATA, H., HIGUCHI, H., IWANO, H., OSHIDA, T., YOSHIMURA, Y., ISOBE, N. (2013): Relationship between concentration of lingual antimicrobial peptide and somatic cell count in milk of dairy cows. *Vet Immunol Immunopathol* 153, 3-4, 298-301.
- KAWAI, K., KOREMATSU, K., AKIYAMA, K., OKITA, M., YOSHIMURA, Y., ISOBE, N. (2015): Dynamics of lingual antimicrobial peptide, lactoferrin concentrations and lactoperoxidase activity in the milk of cows treated for clinical mastitis. *Anim Sci J* 86, 2, 153-158.
- KOHLGRAF, K. G., PINGEL, L. C., DIETRICH, D. E., BROGDEN, K. A. (2010): Defensins as anti-inflammatory compounds and mucosal adjuvants. *Future Microbiol* 5, 1, 99-113.
- KUBISTA, M., ANDRADE, J. M., BENGTTSSON, M., FOROOTAN, A., JONAK, J., LIND, K., SINDELKA, R., SJOBACK, R., SJOGREEN, B., STROMBOM, L., STAHLBERG, A., ZORIC, N. (2006): The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* 27, 2-3, 95-125.
- LAGO, A., GODDEN, S. M., BEY, R., RUEGG, P. L., LESLIE, K. (2011): The selective treatment of clinical mastitis based on on-farm culture results: I. Effects on antibiotic use, milk withholding time, and short-term clinical and bacteriological outcomes. *J Dairy Sci* 94, 9, 4441-4456.

- LAI, Y., GALLO, R. L. (2009): AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends Immunol* 30, 3, 131-141.
- LEE, J. W., PAAPE, M. J., ELSASSER, T. H., ZHAO, X. (2003): Elevated milk soluble CD14 in bovine mammary glands challenged with *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *J Dairy Sci* 86, 7, 2382-2389.
- LEIGH, J. A., WARD, P. N., FIELD, T. R. (2004): The exploitation of the genome in the search for determinants of virulence in *Streptococcus uberis*. *Vet Immunol Immunopathol* 100, 3-4, 145-149.
- LEIJH, P. C., VAN DEN BARSELAAR, M. T., VAN ZWET, T. L., DUBBELDEMAN-REMPT, I., VAN FURTH, R. (1979): Kinetics of phagocytosis of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* by human granulocytes. *Immunology* 37, 2, 453-465.
- LEIMBACH, A., POEHLEIN, A., WITTEN, A., WELLNITZ, O., SHPIGEL, N., PETZL, W., ZERBE, H., DANIEL, R., DOBRINDT, U. (2016): Whole-Genome Draft Sequences of Six Commensal Fecal and Six Mastitis-Associated *Escherichia coli* Strains of Bovine Origin. *Genome Announc* 4, 4.
- LIND, M. (2011). *Etablierung und Anwendung einer Explantkultur der Zitze zur Analyse initialer Vorgänge bei der Mastitis des Rindes*. Inaugural-Dissertation, München.
- LIND, M., SIPKA, A. S., SCHUBERTH, H. J., BLUTKE, A., WANKE, R., SAUTER-LOUIS, C., DUDA, K. A., HOLST, O., RAINARD, P., GERMON, P., ZERBE, H., PETZL, W. (2015): Location-specific expression of chemokines, TNF-alpha and S100 proteins in a teat explant model. *Innate Immun* 21, 3, 322-331.
- LINGE, H. M., COLLIN, M., NORDENFELT, P., MORGELIN, M., MALMSTEN, M., EGESTEN, A. (2008): The human CXC chemokine granulocyte chemotactic protein 2 (GCP-2)/CXCL6 possesses membrane-disrupting properties and is antibacterial. *Antimicrob Agents Chemother* 52, 7, 2599-2607.
- LIU, S., SHI, X., BAUER, I., GUNTHER, J., SEYFERT, H. M. (2011): Lingual antimicrobial peptide and IL-8 expression are oppositely regulated by the antagonistic effects of NF-kappaB p65 and C/EBPbeta in mammary epithelial cells. *Mol Immunol* 48, 6-7, 895-908.
- LUTZOW, Y. C., DONALDSON, L., GRAY, C. P., VUOCOLO, T., PEARSON, R. D., REVERTER, A., BYRNE, K. A., SHEEHY, P. A., WINDON, R., TELLAM, R. L. (2008): Identification of immune genes and proteins involved in the response of bovine mammary tissue to *Staphylococcus aureus* infection. *BMC Vet Res* 4, 18.
- MEDZHITOV, R., HORNG, T. (2009): Transcriptional control of the inflammatory response. *Nat Rev Immunol* 9, 10, 692-703.
- MEHNE, D., DREES, S., SCHUBERTH, H. J., SAUTER-LOUIS, C., ZERBE, H., PETZL, W. (2010): Accurate and rapid flow cytometric leukocyte differentiation in low and high somatic cell count milk. *Milk Science International* 65, 3, 4.
- MITTERHUEMER, S., PETZL, W., KREBS, S., MEHNE, D., KLANNER, A.,

- WOLF, E., ZERBE, H., BLUM, H. (2010): *Escherichia coli* infection induces distinct local and systemic transcriptome responses in the mammary gland. *BMC Genomics* 11, 138.
- MODAK, R., DAS MITRA, S., KRISHNAMOORTHY, P., BHAT, A., BANERJEE, A., GOWSICA, B. R., BHUVANA, M., DHANIKACHALAM, V., NATESAN, K., SHOME, R., SHOME, B. R., KUNDU, T. K. (2012): Histone H3K14 and H4K8 hyperacetylation is associated with *Escherichia coli*-induced mastitis in mice. *Epigenetics* 7, 5, 492-501.
- MODAK, R., DAS MITRA, S., VASUDEVAN, M., KRISHNAMOORTHY, P., KUMAR, M., BHAT, A. V., BHUVANA, M., GHOSH, S. K., SHOME, B. R., KUNDU, T. K. (2014): Epigenetic response in mice mastitis: Role of histone H3 acetylation and microRNA(s) in the regulation of host inflammatory gene expression during *Staphylococcus aureus* infection. *Clin Epigenetics* 6, 1, 12.
- MOROZ, O. V., DODSON, G. G., WILSON, K. S., LUKANIDIN, E., BRONSTEIN, I. B. (2003): Multiple structural states of S100A12: A key to its functional diversity. *Microsc Res Tech* 60, 6, 581-592.
- MÜHLBAUER, K. (2012): Vergleichende Untersuchungen zu frühen Wirt-Pathogen-Interaktionen bei akuter und subklinischer Mastitis des Rindes, lmu.
- OLIVEIRA, L., RUEGG, P. L. (2014): Treatments of clinical mastitis occurring in cows on 51 large dairy herds in Wisconsin. *J Dairy Sci*.
- OVIEDO-BOYSO, J., VALDEZ-ALARCON, J. J., CAJERO-JUAREZ, M., OCHOA-ZARZOSA, A., LOPEZ-MEZA, J. E., BRAVO-PATINO, A., BAIZABAL-AGUIRRE, V. M. (2007): Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. *J Infect* 54, 4, 399-409.
- PAAPE, M., MEHRZAD, J., ZHAO, X., DETILLEUX, J., BURVENICH, C. (2002): Defense of the bovine mammary gland by polymorphonuclear neutrophil leukocytes. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 7, 2, 109-121.
- PAAPE, M. J., BANNERMAN, D. D., ZHAO, X., LEE, J. W. (2003): The bovine neutrophil: Structure and function in blood and milk. *Vet Res* 34, 5, 597-627.
- PAREEK, R., WELLNITZ, O., VAN DORP, R., BURTON, J., KERR, D. (2005): Immunorelevant gene expression in LPS-challenged bovine mammary epithelial cells. *J Appl Genet* 46, 2, 171-177.
- PETZL, W., GUNTHER, J., MUHLBAUER, K., SEYFERT, H. M., SCHUBERTH, H. J., HUSSEN, J., SAUTER-LOUIS, C., HAFNER-MARX, A., ZERBE, H. (2016): Early transcriptional events in the udder and teat after intra-mammary *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* challenge. *Innate Immun* 22, 4, 294-304.
- PETZL, W., GUNTHER, J., PFISTER, T., SAUTER-LOUIS, C., GOETZE, L., VON AULOCK, S., HAFNER-MARX, A., SCHUBERTH, H. J., SEYFERT, H. M., ZERBE, H. (2012): Lipopolysaccharide pretreatment of the udder protects against experimental *Escherichia coli* mastitis. *Innate Immun* 18, 3, 467-477.

- PETZL, W., ZERBE, H., GUNTHER, J., YANG, W., SEYFERT, H. M., NURNBERG, G., SCHUBERTH, H. J. (2008): *Escherichia coli*, but not *Staphylococcus aureus* triggers an early increased expression of factors contributing to the innate immune defense in the udder of the cow. *Vet Res* 39, 2, 18.
- POL, M., RUEGG, P. L. (2007): Treatment practices and quantification of antimicrobial drug usage in conventional and organic dairy farms in Wisconsin. *J Dairy Sci* 90, 1, 249-261.
- PRADO MONTES DE OCA, E. (2013): Antimicrobial peptide elicitors: new hope for the post-antibiotic era. *Innate Immun* 19, 3, 227-241.
- RADBRUCH, A. (2000): *Flow cytometry and cell sorting* (2nd ed.). Berlin ; New York. Springer.
- RAINARD, P., RIOLLET, C. (2003): Mobilization of neutrophils and defense of the bovine mammary gland. *Reprod Nutr Dev* 43, 5, 439-457.
- RAINARD, P., RIOLLET, C. (2006): Innate immunity of the bovine mammary gland. *Vet Res* 37, 3, 369-400.
- RAMSEY, S. A., KLEMM, S. L., ZAK, D. E., KENNEDY, K. A., THORSSON, V., LI, B., GILCHRIST, M., GOLD, E. S., JOHNSON, C. D., LITVAK, V., NAVARRO, G., ROACH, J. C., ROSENBERGER, C. M., RUST, A. G., YUDKOVSKY, N., ADEREM, A., SHMULEVICH, I. (2008): Uncovering a macrophage transcriptional program by integrating evidence from motif scanning and expression dynamics. *PLoS Comput Biol* 4, 3, e1000021.
- RAUTMANN, J. M. (2015). *Epigenetische Modulation boviner Monozyten und Makrophagen*. Bibliothek der Tierärztlichen Hochschule Hannover.
- RINALDI, M., LI, R. W., BANNERMAN, D. D., DANIELS, K. M., EVOCK-CLOVER, C., SILVA, M. V., PAAPE, M. J., VAN RYSSSEN, B., BURVENICH, C., CAPUCO, A. V. (2010): A sentinel function for teat tissues in dairy cows: dominant innate immune response elements define early response to *E. coli* mastitis. *Funct Integr Genomics* 10, 1, 21-38.
- RISSO, A. (2000): Leukocyte antimicrobial peptides: multifunctional effector molecules of innate immunity. *J Leukoc Biol* 68, 6, 785-792.
- ROBERT, A., SEEGER, H., BAREILLE, N. (2006): Incidence of intramammary infections during the dry period without or with antibiotic treatment in dairy cows--a quantitative analysis of published data. *Vet Res* 37, 1, 25-48.
- ROLLIN, E., DHUYVETTER, K. C., OVERTON, M. W. (2015): The cost of clinical mastitis in the first 30 days of lactation: An economic modeling tool. *Prev Vet Med* 122, 3, 257-264.
- ROOSEN, S., EXNER, K., PAUL, S., SCHRODER, J. M., KALM, E., LOOFT, C. (2004): Bovine beta-defensins: identification and characterization of novel bovine beta-defensin genes and their expression in mammary gland tissue. *Mamm Genome* 15, 10, 834-842.
- ROY, J. P., KEEFE, G. (2012): Systematic review: what is the best antibiotic treatment for *Staphylococcus aureus* intramammary infection of lactating cows in North America? *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 28, 1, 39-

50, viii.

- RUSS, B. E., PRIER, J. E., RAO, S., TURNER, S. J. (2013): T cell immunity as a tool for studying epigenetic regulation of cellular differentiation. *Front Genet* 4, 218.
- SCHERPENZEEL, C. G., DEN UIJL, I. E., VAN SCHAIK, G., OLDE RIEKERINK, R. G., KEURENTJES, J. M., LAM, T. J. (2014): Evaluation of the use of dry cow antibiotics in low somatic cell count cows. *J Dairy Sci* 97, 6, 3606-3614.
- SCHONWETTER, B. S., STOLZENBERG, E. D., ZASLOFF, M. A. (1995): Epithelial antibiotics induced at sites of inflammation. *Science* 267, 5204, 1645-1648.
- SCHUKKEN, Y. H., GUNTHER, J., FITZPATRICK, J., FONTAINE, M. C., GOETZE, L., HOLST, O., LEIGH, J., PETZL, W., SCHUBERTH, H. J., SIPKA, A., SMITH, D. G., QUESNELL, R., WATTS, J., YANCEY, R., ZERBE, H., GURJAR, A., ZADOKS, R. N., SEYFERT, H. M. (2011): Host-response patterns of intramammary infections in dairy cows. *Vet Immunol Immunopathol* 144, 3-4, 270-289.
- SMITH, K. L., TODHUNTER, D. A., SCHOENBERGER, P. S. (1985): Environmental pathogens and intramammary infection during the dry period. *J Dairy Sci* 68, 2, 402-417.
- SMOLENSKI, G. A., BROADHURST, M. K., STELWAGEN, K., HAIGH, B. J., WHEELER, T. T. (2014): Host defence related responses in bovine milk during an experimentally induced *Streptococcus uberis* infection. *Proteome Sci* 12, 19.
- SMOLENSKI, G. A., CURSONS, R. T., HINE, B. C., WHEELER, T. T. (2015): Keratin and S100 calcium-binding proteins are major constituents of the bovine teat canal lining. *Vet Res* 46, 113.
- SMOLENSKI, G. A., WIELICZKO, R. J., PRYOR, S. M., BROADHURST, M. K., WHEELER, T. T., HAIGH, B. J. (2011): The abundance of milk cathelicidin proteins during bovine mastitis. *Vet Immunol Immunopathol* 143, 1-2, 125-130.
- SNEPPEN, K., DODD, I. B. (2012): A simple histone code opens many paths to epigenetics. *PLoS Comput Biol* 8, 8, e1002643.
- SORDILLO, L. M., SHAFER-WEAVER, K., DEROSA, D. (1997): Immunobiology of the mammary gland. *J Dairy Sci* 80, 8, 1851-1865.
- SORDILLO, L. M., STREICHER, K. L. (2002): Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 7, 2, 135-146.
- STEENEVELD, W., VAN WERVEN, T., BARKEMA, H. W., HOGEVEEN, H. (2011): Cow-specific treatment of clinical mastitis: an economic approach. *J Dairy Sci* 94, 1, 174-188.
- STRANDBERG, Y., GRAY, C., VUOCOLO, T., DONALDSON, L., BROADWAY, M., TELLAM, R. (2005): Lipopolysaccharide and lipoteichoic acid induce different innate immune responses in bovine mammary epithelial cells. *Cytokine* 31, 1, 72-86.
- SUBBALAKSHMI, C., SITARAM, N. (1998): Mechanism of antimicrobial

- action of indolicidin. *FEMS Microbiol Lett* 160, 1, 91-96.
- SUOJALA, L., KAARTINEN, L., PYORALA, S. (2013): Treatment for bovine *Escherichia coli* mastitis - an evidence-based approach. *J Vet Pharmacol Ther* 36, 6, 521-531.
- SWANSON, K., GORODETSKY, S., GOOD, L., DAVIS, S., MUSGRAVE, D., STELWAGEN, K., FARR, V., MOLENAAR, A. (2004): Expression of a beta-defensin mRNA, lingual antimicrobial peptide, in bovine mammary epithelial tissue is induced by mastitis. *Infect Immun* 72, 12, 7311-7314.
- TAKAGI, S., HAYASHI, S., TAKAHASHI, K., ISOGAI, H., BAI, L., YONEYAMA, H., ANDO, T., ITO, K., ISOGAI, E. (2012): Antimicrobial activity of a bovine myeloid antimicrobial peptide (BMAP-28) against methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Anim Sci J* 83, 6, 482-486.
- TANG, D., KANG, R., COYNE, C. B., ZEH, H. J., LOTZE, M. T. (2012): PAMPs and DAMPs: signal 0s that spur autophagy and immunity. *Immunol Rev* 249, 1, 158-175.
- TENHAGEN, B. A., KOSTER, G., WALLMANN, J., HEUWIESER, W. (2006): Prevalence of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Brandenburg, Germany. *J Dairy Sci* 89, 7, 2542-2551.
- THOMPSON-CRISPI, K., ATALLA, H., MIGLIOR, F., MALLARD, B. A. (2014): Bovine mastitis: frontiers in immunogenetics. *Front Immunol* 5, 493.
- TIWARI, J. G., BABRA, C., TIWARI, H. K., WILLIAMS, V., DE WET, S., GIBSON, J., PAXMAN, A., MORGAN, E., COSTANTINO, P., SUNAGAR, R., ISLOOR, S., MUKKUR, T. (2013): Trends in therapeutic and prevention strategies for management of bovine mastitis: an overview *Journal of Vaccines & Vaccinations* 4, 2, 11.
- TOMASINSIG, L., DE CONTI, G., SKERLAVAJ, B., PICCININI, R., MAZZILLI, M., D'ESTE, F., TOSSI, A., ZANETTI, M. (2010): Broad-spectrum activity against bacterial mastitis pathogens and activation of mammary epithelial cells support a protective role of neutrophil cathelicidins in bovine mastitis. *Infect Immun* 78, 4, 1781-1788.
- TOMASINSIG, L., SCOCCHI, M., DI LORETO, C., ARTICO, D., ZANETTI, M. (2002): Inducible expression of an antimicrobial peptide of the innate immunity in polymorphonuclear leukocytes. *J Leukoc Biol* 72, 5, 1003-1010.
- TOMASINSIG, L., SKERLAVAJ, B., SCARSINI, M., GUIDA, F., PICCININI, R., TOSSI, A., ZANETTI, M. (2012): Comparative activity and mechanism of action of three types of bovine antimicrobial peptides against pathogenic *Prototheca* spp. *J Pept Sci* 18, 2, 105-113.
- TOMASINSIG, L., ZANETTI, M. (2005): The cathelicidins--structure, function and evolution. *Curr Protein Pept Sci* 6, 1, 23-34.
- VOGL, T., EISENBLATTER, M., VOLLER, T., ZENKER, S., HERMANN, S., VAN LENT, P., FAUST, A., GEYER, C., PETERSEN, B., ROEBROCK, K., SCHAFERS, M., BREMER, C., ROTH, J. (2014): Alarmin

- S100A8/S100A9 as a biomarker for molecular imaging of local inflammatory activity. *Nat Commun* 5, 4593.
- WALDMÜLLER, K. (2012). *Induktion einer mammären Endotoxintoleranz zur Mastitis-Prophylaxe bei der puerperalen Kuh*. Inaugural-Dissertation, München.
- WELLNITZ, O., BRUCKMAIER, R. M. (2012): The innate immune response of the bovine mammary gland to bacterial infection. *Vet J* 192, 2, 148-152.
- WELLNITZ, O., KERR, D. E. (2004): Cryopreserved bovine mammary cells to model epithelial response to infection. *Vet Immunol Immunopathol* 101, 3-4, 191-202.
- WIESNER, J., VILCINSKAS, A. (2010): Antimicrobial peptides: the ancient arm of the human immune system. *Virulence* 1, 5, 440-464.
- WOLF, C., KUSCH, H., MONECKE, S., ALBRECHT, D., HOLTFRETER, S., VON EIFF, C., PETZL, W., RAINARD, P., BROKER, B. M., ENGELMANN, S. (2011): Genomic and proteomic characterization of *Staphylococcus aureus* mastitis isolates of bovine origin. *Proteomics* 11, 12, 2491-2502.
- YAMAGUCHI, Y., OUCHI, Y. (2012): Antimicrobial peptide defensin: identification of novel isoforms and the characterization of their physiological roles and their significance in the pathogenesis of diseases. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 88, 4, 152-166.
- YANG, D., CHEN, Q., HOOVER, D. M., STALEY, P., TUCKER, K. D., LUBKOWSKI, J., OPPENHEIM, J. J. (2003): Many chemokines including CCL20/MIP-3alpha display antimicrobial activity. *J Leukoc Biol* 74, 3, 448-455.
- YUNG, S. C., MURPHY, P. M. (2012): Antimicrobial chemokines. *Front Immunol* 3, 276.
- ZANETTI, M. (2004): Cathelicidins, multifunctional peptides of the innate immunity. *J Leukoc Biol* 75, 1, 39-48.
- ZANETTI, M. (2005): The role of cathelicidins in the innate host defenses of mammals. *Curr Issues Mol Biol* 7, 2, 179-196.
- ZANETTI, M., LITTERI, L., GRIFFITHS, G., GENNARO, R., ROMEO, D. (1991): Stimulus-induced maturation of probactenecins, precursors of neutrophil antimicrobial polypeptides. *J Immunol* 146, 12, 4295-4300.
- ZASLOFF, M. (2002): Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415, 6870, 389-395.
- ZBINDEN, C., STEPHAN, R., JOHLER, S., BOREL, N., BUNTER, J., BRUCKMAIER, R. M., WELLNITZ, O. (2014): The inflammatory response of primary bovine mammary epithelial cells to *Staphylococcus aureus* strains is linked to the bacterial phenotype. *PLoS One* 9, 1, e87374.
- ZLOTNIK, A., YOSHIE, O. (2000): Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 12, 2, 121-127.

IX. DANKSAGUNG

Herzlichsten Dank an alle, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Als erstes möchte ich mich besonders bei Herrn Prof. Dr. Zerbe bedanken. Vielen Dank für die Überlassung des Themas und das in mich gesetzte Vertrauen. Danke für die stets verständnisvollen Reaktionen und die umfassende Betreuung.

Ein außerordentlich großes Dankeschön möchte ich an Herrn Dr. habil. Wolfram Petzl richten. Danke, Wolfram für die unzähligen Stunden deiner Zeit, die ständige Telefonbereitschaft für Anliegen jeglicher Art und die dazu passenden Antworten. Danke für dein Verständnis, deine Flexibilität und deine Unterstützung in jeder aufgetretenen Situation.

Sandra und Laura, auch ohne eure Hilfe und Unterstützung im Labor wäre ich hilflos gewesen. Ein herzliches Dankeschön für die unendlich lange Liste eurer Hilfsbereitschaft. Liebe Sandra, dir noch ein extra Danke für deine geduldige Einarbeitung im Labor, dein stets offenes Ohr für sämtliche Labor-Probleme und Hilfe bei sämtlichen zeitlichen Engpässen. Laura: Bei dir bedankt sich die Lotta noch für viele kleine Gassirunden während ich im Labor geschwitzt habe.

Vielen Dank Frau Anna Rieger für die Unterstützung bei der Berechnung der Statistik.

Ich möchte mich herzlich bei Katharina Waldmüller und Wolfram Petzl für die Mitnutzung der Gewebeproben aus eurem Projekt bedanken.

Bei meiner Freundin Chrissi und ihrer Tochter Lene möchte mich für die vielen Stunden bedanken, die ihr mit Hannes verbracht habt. Vielen Dank Chrissi, dass ich mir um seine liebevolle und einfühlsame Betreuung keine Sorgen machen musste und ich viele Stunden sorglos arbeiten konnte.

Außerdem gilt meinen Eltern und meiner Schwester ein riesen Dankeschön für alles was ihr unternommen habt, um mich bestmöglich begleiten und unterstützen zu können. Danke, dass ich Euch hinter mir stehen habe und Ihr an mich glaubt.

Liebe Mama, es ist geschafft!! Tausend Dank für all deine Stunden der Kinderbe-

treuungen und jedes spontane Einspringen, wenn ein Hilferuf am Telefon kam. Danke, dass du deine Termine immer hinten angestellt hast, wenn ich Zeit zum Schreiben gebraucht habe.

Lieber Papa, Du bist der allerbeste Korrekturleser. Danke, dass Du dir immer kurzfristig Zeit genommen hast um schnellstmöglich all meine Fehler zu finden.

Ein unbeschreibliches Dankeschön an meinen Mann Ralf. Ich denke, Du weißt so gut wie ich, welchen Weg wir zusammen geschafft haben. Danke Hannes und Frieda, dass ihr mir jeden Tag ein Lachen ins Gesicht zaubert.

Ein herzlicher Dank gilt auch der H. Wilhelm Schaumann Stiftung und der Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG PE 1495/2-1) für die Förderung dieser Arbeit.