

**Untersuchungen zur Wirksamkeit antimikrobieller Peptide gegen  
bovine Mastitispathogene *in vitro* und zu Komponenten des  
angeborenen Immunsystems in einem bovinen mammären Explantmodell**

von Julia Katharina Schneider

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

**Untersuchungen zur Wirksamkeit antimikrobieller Peptide gegen  
bovine Mastitispathogene *in vitro* und zu Komponenten des  
angeborenen Immunsystems in einem bovinen mammären Explantmodell**

von Julia Katharina Schneider  
aus Marktoberdorf

München 2023



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. Wolfram Petzl



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

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

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Wolfram Petzl

Korreferentin: Priv.-Doz. Dr. Andrea Stockmaier-Didier

Tag der Promotion: 22.07.2023

Gefördert durch ein Promotionsstipendium der  
H. Wilhelm Schaumann Stiftung



Für meine Familie





## INHALTSVERZEICHNIS

<b>I.</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT .....</b>	<b>3</b>
<b>1.</b>	<b>Bedeutung der bovinen Mastitis in der Milchviehwirtschaft.....</b>	<b>3</b>
<b>2.</b>	<b>Angeborene Abwehrmechanismen bei der Mastitis des Rindes - Immunantwort und antimikrobielle Peptide.....</b>	<b>4</b>
2.1.	Ablauf der Immunantwort nach Erregereintritt ins Euter .....	4
2.2.	Antwort des angeborenen Immunsystems .....	4
2.3.	Die Rolle der Zytokine bei der Infektionsabwehr.....	6
2.4.	Antimikrobielle Peptide bei der Infektionsabwehr .....	7
2.5.	Antimikrobielle Peptide im Euter .....	9
<b>3.</b>	<b>Explantmodelle als Ersatzverfahren zur Untersuchung früher Wirt- Pathogen-Interaktion .....</b>	<b>14</b>
<b>4.</b>	<b>Endotoxintoleranz .....</b>	<b>16</b>
<b>III.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>19</b>
<b>1.</b>	<b>Geräte .....</b>	<b>19</b>
1.1.	Verwendete Geräte für den Time Kill Assay .....	19
1.2.	Verwendete Geräte für das Explant-Modell.....	19
1.3.	Verwendete Geräte für den Chemotaxisassay.....	19
1.4.	Verwendete Geräte für die molekularbiologische Untersuchungen .....	20
<b>2.</b>	<b>Material .....</b>	<b>20</b>
2.1.	Laborbedarf für den Time Kill Assay .....	20
2.2.	Laborbedarf für die Explantnahme .....	21
2.3.	Material für den Chemotaxisassay .....	22
2.4.	Material für molekularbiologische Untersuchungen.....	22
2.5.	Kulturmedien, Puffer und Lösungen.....	23
2.5.1.	Antimikrobielle Peptide und Kulturmedium für den Time-Kill-Assay ....	23
2.5.2.	Puffer, Zusätze und Kulturmedien für das Explantmodell.....	24
2.5.3.	Puffer und Reagenzien für die Durchflusszytometrie .....	25
2.5.4.	Lösungen, Puffer und Reagenzien für die molekularbiologischen Untersuchungen.....	26

---

2.6.	Primer für die quantitative-real-time PCR .....	27
2.7.	Spendertiere für das Explantmodell .....	27
2.8.	Versuchstiere für den Chemotaxisassay.....	29
<b>3.</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>29</b>
3.1.	Time-Kill-Assay.....	29
3.1.1.	Vorbereitung der Bakteriensuspensionen.....	29
3.1.2.	Plattenprotokoll und verwendete antimikrobielle Peptide .....	30
3.2.	Explant-Modell.....	32
3.2.1.	Herstellung hitzeinaktivierter <i>E. coli</i> und <i>S. aureus</i> .....	32
3.2.2.	Vorbereitung der Explantgewinnung .....	33
3.2.3.	Auswahl der Spendertiere .....	33
3.2.4.	Gewinnung der Explants .....	34
3.2.5.	Inkubation der Explants .....	35
3.2.6.	Stoffwechselaktivität der Explants.....	38
3.3.	Chemotaxisassay .....	38
3.3.1.	Entnahme von venösem Blut.....	39
3.3.2.	Isolierung neutrophiler Granulozyten aus dem Blut .....	39
3.3.3.	Durchführung des Chemotaxisassays.....	40
3.3.4.	Auswertung und Messprinzip im Durchflusszytometer.....	40
3.4.	Molekularbiologische Untersuchung .....	41
3.4.1.	mRNA- Isolation .....	42
3.4.2.	Kontrolle der mRNA Qualität .....	43
3.4.3.	cDNA-Synthese.....	43
3.4.4.	Quantitative real-time PCR .....	44
3.5.	Statistische Auswertung der Daten .....	45
<b>IV.</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>47</b>
<b>1.</b>	<b>Untersuchungen zum Einfluss rekombinanter antimikrobieller Peptide/Proteine auf das Wachstum ausgewählter Mastitiserreger (Time Kill Assay).....</b>	<b>47</b>
1.1.	Rekombinantes bovines beta-Defensin-1 (rbDEFB1).....	48
1.2.	Rekombinantes bovines CC-Chemokin 20 (rbCCL20) .....	48
1.3.	Linguales antimikrobielles Peptid (LAP).....	50
1.4.	Rekombinantes humanes S100-Protein A8/A9 (rhS100A8/A9).....	53
1.5.	Rekombinantes bovines S100-Protein A9 (rbS100A9) .....	55

---

1.6.	Rekombinantes bovines S100-Protein A12 (rbS100A12) .....	56
1.7.	Rekombinante humane Antileukoproteinase (rhSLPI) .....	59
<b>2.</b>	<b>Untersuchungen zum Einfluss einer bakteriellen Restimulation auf die Reaktivität mammären Gewebes (Explantmodell) .....</b>	<b>61</b>
2.1.1.	Chemotaxisassay .....	61
2.1.2.	Expression ausgewählter Kandidatengene (RT-qPCR) .....	63
2.1.3.	Festlegung der Sauerstoffkonzentration bei der Überprüfung der Stoffwechselaktivität .....	71
2.1.4.	Stoffwechselaktivität der Explants .....	73
<b>V.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>75</b>
<b>1.</b>	<b>Einfluss rekombinanter antimikrobieller Peptide/Proteine auf das Wachstum ausgewählter Mastitiserreger .....</b>	<b>75</b>
<b>2.</b>	<b>Untersuchungen zum Einfluss einer bakteriellen Restimulation auf die Reaktivität mammären Gewebes (Explantmodell) .....</b>	<b>83</b>
2.1.	Einfluss der Explantstimulation auf die Reaktivität von PMN .....	85
2.2.	Expressionssteigerung von Zytokinen und antimikrobiellen Peptiden nach wiederholter Stimulation .....	86
<b>VI.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>93</b>
<b>VII.</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>97</b>
<b>VIII.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>100</b>
<b>IX.</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>121</b>

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

1-Methoxy-PMS	1-Methoxyphenazinmethosulfat
AMP	Antimikrobielle Peptide
<i>Aqua dest.</i>	destilliertes Wasser
BCS	Body Condition Score
BHI	Brain Heart Infusion
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CFU	colony forming units
CMT	California Mastitis Test
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CSB	Columbia-Schafblut
ct	Cycle Threshold
DAMPs	Damage-associated molecular patterns
DEFB1	β-Defensin-1
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dsDNA	Doppelstrang-Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EP	Euterparenchym
FSC	Vorwärtsstreuung
h	Stunde(n)
IL-1β	Interleukin -1β
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
KBE	Koloniebildende Einheit
KCl	Kaliumchlorid
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
LAP	Linguales antimikrobielles Peptid
LB	Luria/Miller, Luria/Miller-Bouillon
LPS	Lipopolysaccharide
MAC-T-Zelllinie	Mammäre Alveolare T-Zelllinie
MHK	minimale Hemmkonzentration
min	Minuten

---

mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NADH	reduzierte Form von Nicotinamidadeninindinukleotid
NADPH	reduzierte Form von Nicotinamidadeninindinukleotidphosphat
NET	neutrophile extrazelluläre Fallen
NTC	Negativkontrolle der RT-qPCR
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
OD	Optische Dichte
PAMPs	Pathogen-associated molecular patterns
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PBS x 2	Phosphat-gepufferte Salzlösung zweifach konzentriert
PCBUS	Precision cut bovine udder slices
PGN	Peptidoglykan
PMN	Polymorphkernige neutrophile Granulozyten
PRR	Pathogen-Recognition-Rezeptoren
PVP	Polyvinylpyrrolidon
R <sub>2</sub>	Bestimmtheitsmaß
RAGE	Receptor for advanced glycation endproducts
rbLAP	rekombinantes bubalines linguales antimikrobielles Peptid
rbCCL20	rekombinantes bovines CC-Chemokin 20
rbDEFB1	rekombinantes bovines β-Defensin-1
rbLAP	rekombinantes bovines linguales antimikrobielles Peptid
rbS100A12	rekombinantes bovines S100-Protein A12
rbS100A9	rekombinantes bovines S100-Protein A9
rhS100A8/A9	rekombinantes humanes S100-Protein A8/A9
rhSLPI	rekombinante humane Antileukoproteinase
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNasin	Ribonuklease Inhibitor
RQI	RNA quality indicator
RT	Reverse Transkriptase
RT-qPCR	quantitative-real-time PCR
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
S100A12	Calgranulin C
S100A7	Psoriasin

---

S100A8	Calgranulin A
S100A8/A9	Calprotektin
S100A9	Calgranulin B
<i>Sc. uberis</i>	<i>Streptococcus uberis</i>
SD	Standardabweichung
SIRS	systemisches inflammatorisches Response Syndrom
SLPI	Antileukoproteinase
SSC	Seitwärtsstreuung
ssDNA	Einzelstrang-Desoxyribonukleinsäure
TLR	Toll-like-Rezeptoren
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
TSB	Tryptic Soy Broth
<i>V. jugularis</i>	<i>Vena jugularis</i>
VRB	Kristallviolett-Galle-Laktose
WST-8	wasserlösliche Tetrazoliumfärbung 8
ZZ	Zitzenzisterne

## I. EINLEITUNG

In der Milchviehhaltung ist die Mastitis nicht nur eine der häufigsten und kosten-aufwendigsten Erkrankungen, sondern sie ist auch einer der häufigsten Gründe für den Einsatz von Antibiotika (HALASA et al., 2007; PETERSSON-WOLFE et al., 2018; SCHRAG et al., 2020). Neben hohen Behandlungskosten und der finanziellen Belastung durch vorzeitige Abgänge aus der Herde nimmt die Verringerung der Milchproduktion durch die Einhaltung von Wartezeiten und der Rückgang der Milchmenge den größten Anteil der Kosten ein. (HEIKKILÄ et al., 2012; LIANG et al., 2017). Beim betroffenen Tier führt eine Mastitis zu einer lokalen Entzündung mit Schmerzen und zur Verringerung des allgemeinen Wohlbefindens, wie von PETERSSON-WOLFE et al. (2018) und VACCIN et al. (2021) zusammengefasst wurde. Infektionen mit gramnegativen und grampositiven Bakterien sind die häufigste Ursache für den Ausbruch der Erkrankung (CRESSIER & BISSONNETTE, 2011). Zur Behandlung von Mastitiden werden standardmäßig lokal und systemisch Antibiotika und häufig Nicht-steroidale Antiphlogistika eingesetzt (KUIPERS et al., 2016; VAN SOEST et al., 2018). Präventiv kommen vor allem antibiotische Trockensteller und Zitzenversiegler zum Einsatz (WILSON et al., 2009; GOLDER et al., 2016; ZHYLKAIDAR et al., 2021). Das Ausbringen tierischer Exkremente kann zu einer Belastung umliegender Gewässer und des Grundwassers mit antibiotischen Rückständen führen, was aktuelle Daten aus China verdeutlichen (HUANG et al., 2020a). Sowohl die Erkrankung, als auch die antibiotische Behandlung einer Mastitis können außerdem die Lebensmittelsicherheit gefährden (AALIPOUR et al., 2013; HARJANTI & SAMBODHO, 2020). Da innerhalb der letzten Jahrzehnte auch im Zusammenhang mit der Nutztierhaltung ein besorgniserregender Anstieg antibiotikaresistenter Erreger beobachtet wurde, soll deren Einsatz in Zukunft weiter stark reduziert werden, wie durch HARBARTH et al. (2015) und TANG et al. (2017) zusammenfassend festgestellt wurde (TOT et al., 2021). Eine Möglichkeit den Antibiotikaeinsatz in der Milchviehhaltung zu minimieren ist die Prävention von Mastitiden. Neben der Verbesserung der Stall- und Melkhygiene können z. B. Impfungen oder die Stärkung der körpereigenen Immunabwehr dazu beitragen, dass weniger Antibiotika verwendet werden (WILSON et al., 2009). Die Ausprägung einer Mastitis ist Pathogen-spezifisch: Je nach beteiligtem Erreger orchestriert die Expression unterschiedlicher Zytokinmuster den klinischen Verlauf der



Erkrankung (GÜNTHER et al., 2011). Die ausgeschütteten proinflammatorischen Zytokine führen vordergründig zu einer weiteren Alarmierung des Immunsystems und somit gleichzeitig zu einer Intensivierung der Entzündung. Eine andere Gruppe an früh regulierten Abwehrfaktoren, die bei Mastitiden verstärkt sezerniert werden, sind Antimikrobielle Peptide (AMP) (PETZL et al., 2016; AKHTAR et al., 2020). Neben ihrer teilweise chemotaktischen und antiinflammatorischen Aktivität sind AMP unter anderem durch unterschiedliche Mechanismen dazu fähig, Erreger direkt abzutöten, wie bei VALDEZ-MIRAMONTES et al. (2021) zusammengefasst wurde. Sie stellen daher potente Bausteine des Immunsystems dar, um intramamären Infektionen vorzubeugen und signifikant zu ihrer Bekämpfung beizutragen (ZHANG et al., 2007). Eine Steigerung endogener antimikrobieller Mechanismen kann mit Hilfe einer Endotoxintoleranz erreicht werden. Kommen Euterepithelzellen (MEC) 24 h (Stunden) vor einer experimentellen Infektion in Kontakt mit bakteriellen Bestandteilen (z. B. Endotoxin), wird die Expression wichtiger proinflammatorische Zytokine im Vergleich zu nicht prästimulierten MEC herabreguliert und gleichzeitig die Expression antimikrobieller Peptide heraufreguliert (GÜNTHER et al., 2012). Klinisch wirkt sich dieser Effekt *in vivo* durch eine signifikante Linderung der Mastitissymptomatik aus (PETZL et al., 2012).

In dieser Arbeit sollte zum einen untersucht werden, in wieweit ausgesuchte AMP, deren Expression bei der bovinen Mastitis typischerweise heraufreguliert wird, direkt antimikrobiell auf das Wachstum häufiger Mastitispathogene einwirken können. Zum anderen sollte anhand eines bereits etablierten Explantmodells der Zitzenzisterne und der Euterparenchyms überprüft werden, ob mit dieser Methodik die Induktion einer Endotoxintoleranz *in vitro* simulierbar ist. Ein Ziel war es, durch eine Prästimulation mit Lipopolysaccharid (LPS) und eine anschließende Restimulation mit Mastitispathogenen eine Verringerung der Expression inflammatorischer Zytokine und die gleichzeitige Steigerung von AMP zu erreichen. Ebenso wurde untersucht, wie sich eine wiederholte Stimulation auf das Vorhandensein chemotaktisch aktiver Moleküle auswirkt. Mit der Auswahl des Explantmodells sollte sowohl eine möglichst realistische Annäherung an die Gegebenheiten im Tier geschaffen werden, als auch das Konzept der 3R umgesetzt werden.

## II. LITERATURÜBERSICHT

### 1. Bedeutung der bovinen Mastitis in der Milchviehwirtschaft

Die wichtigsten bakteriellen Erreger der bovinen Mastitis sind unter anderem *Escherichia coli* (*E. coli*), *Streptococcus uberis* (*Sc. uberis*) und *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) (HEIKKILÄ et al., 2018; KRISHNAMOORTHY et al., 2021). Während die Infektion mit dem Umwelterreger *Sc. uberis* nachweislich zu einer Verringerung der Bewegung und zu einem Rückgang der Milchmenge führt (KESTER et al., 2015) hat eine Infektion mit *E. coli* häufig eine massive systemische Erkrankung mit Symptomen wie Fieber, Verringerung der Futteraufnahme und der Pansenaktivität zur Folge (ZIMOV et al., 2011; FOGSGAARD et al., 2012). Eine Infektion mit dem kuhassozierten Erreger *S. aureus* kann je nach Stamm nur zu einer Erhöhung der somatischen Zellzahl, aber auch zu einer starken klinischen Erkrankung führen (HOEKSTRA et al., 2020). Zudem bereitet dessen Fähigkeit im Euter zu persistieren und Biofilme zu bilden, die unter anderem zu Resistenzen gegen eingesetzte Antibiotika führen können, große Schwierigkeiten in der Bekämpfung (OLSON et al., 2002; BROUILLETTE et al., 2004b; FELIPE et al., 2017). Auf Grund steigender Resistenzen von Erregern gegenüber Antibiotika wird in der Europäischen Union durch die Verordnung (EU) 2019/6 eine weitere Verringerung des Einsatzes von Antimikrobiellen Wirkstoffen in der Tiermedizin angestrebt (EU, 2019; SORGE et al., 2021). Die Verbreitung multiresistenter Keime stellen sowohl für die Tierhaltung, als auch für den Menschen eine große Gefahr dar (PRICE et al., 2012). Auch bei der Bekämpfung von Mastitiden treten Resistenzen auf (SORGE et al., 2021). Ein alarmierendes Beispiel ist hierfür die steigende Resistenz von *E. coli* gegenüber den Cephalosporinen der dritten Generation, welche von der Weltgesundheitsorganisation als „kritische“ Antibiotika mit besonderer Bedeutung für die Humanmedizin eingestuft werden (COLLIGNON et al., 2016; BOIREAU et al., 2018). In der Forschung werden viele unterschiedliche alternative Ansätze zur Prävention oder Behandlung gegen Mastitiden verfolgt, wie zum Beispiel der Einsatz von Bakteriophagen, pflanzlichen Stoffen, von Nanopartikeln oder auch der Einsatz von Antimikrobiellen Peptiden (SILVA et al., 2019; TITZE et al., 2020; WIELAND et al., 2021).

## **2. Angeborene Abwehrmechanismen bei der Mastitis des Rindes - Immunantwort und antimikrobielle Peptide**

### **2.1. Ablauf der Immunantwort nach Erregereintritt ins Euter**

Der Erregereintritt in das Euter erfolgt meist apikal über den Strichkanal der Zitze. Diese ist zur Umwelt mechanisch durch einen Keratinpfropfen (Laktosebum), und den *Musculus sphincter papillae* verschlossen. Zusätzlich befinden sich in der Zitenzisterne keratinisierte Epithelzellen, welche ein Eindringen der Erreger verhindern sollen und außerdem antimikrobielle Peptide enthalten (CAPUCO et al., 1992; SMOLENSKI et al., 2015). Vor dem Übergang des Strichkanals der Zitze zum Euter bildet die Fürstenberg'sche Rosette durch die longitudinale Aneinanderreihung enger Schleimhautfalten eine Barriere zwischen der Zitenzisterne und dem Strichkanal. (VESTERINEN et al., 2015; KOSKENNIEMI & LAAKKONEN, 2020). Durch den eingegliederten Venenring dringen Leukozyten in das Lumen der Zitenzisterne. Die Schleimhaut der Zitenzisterne wirkt außerdem als physische Barriere und produziert antimikrobielle Stoffe und Enzyme (PETZL et al., 2016). Werden diese physiologischen Abwehrmaßnahmen überwunden, dringen die Erreger in die Zitzen- und Drüsenzisterne ein und können sich von dort aus weiter an das Epithel der Milchgänge und der Drüsenalveolen anlagern.

### **2.2. Antwort des angeborenen Immunsystems**

Nach Kontakt mit den Milchdrüsenepithelzellen (MEC), welche als funktionelle Milchbildner den größten Zellanteil des Euterparenchyms stellen, wird, wie im Übersichtsartikel von OVIEDO-BOYSO et al. (2007) dargestellt, durch das Immunsystem eine Reaktionskaskade in Gang gesetzt (GÜNTHER et al., 2017b). Zunächst wird das angeborene Immunsystem aktiviert. MEC, Phagozytierende Zellen, wie Makrophagen, dendritische Zellen und polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN) können Pathogen-associated molecular patterns, (PAMPs) über Pathogen-Recognition-Rezeptoren (PRR), z.B. Toll-like-Rezeptoren (TLR) erkennen (MCDONALD et al., 1999; PETZL et al., 2008; THOMAS & SCHRODER, 2013; ISLAM et al., 2020). TLR1 und TLR2 erkennen grampositive Bestandteile wie Lipopeptide, während TLR4 gramnegative Zellbestandteile wie LPS erkennt (POLTORAK et al., 1998; LOTZ et al., 2004). Je nach beteiligtem TLR werden Pathogen-abhängig intrazelluläre Signalkaskaden unter Beteiligung von MAP-Kinasen und dem Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B in Gang gesetzt. Daraufhin wird ein

bestimmtes inflammatorisches Chemokin- und Zytokinprofil orchestriert, welches aktiv die Einwanderung von Leukozyten fördert, die Blutzufuhr ins Euter erhöht und lokal für eine gesteigerte Permeabilität des Endothels sorgt (HAIDER et al., 2006; AKHTAR et al., 2020). Gleichzeitig wird das Komplementsystem aktiviert, dessen Faktoren, wie z. B. der Komplementfaktor C5a, chemotaktisch für Phagozyten wirken oder diesen durch Opsonisierung die Erregererkennung erleichtert (SHUSTER et al., 1997). Dadurch werden neben anderen Phagozyten vor allem PMN angelockt, welche bei einer Euterentzündung den bedeutendsten Anteil an Immunzellen darstellen. Über Diapedese wandern PMN durch das veränderte Endothel aus dem Blutkreislauf in das infizierte Gewebe. Durch die ausgeschütteten reaktiven Sauerstoffmetaboliten und Enzyme der PMN können sowohl Erreger, als auch körpereigene Epithelzellen angegriffen und in Folge eine starke Entzündungsreaktion ausgelöst werden (MEHRZAD et al., 2004). Über die Sezernierung von Proteinen, wie Defensine oder Laktoferrin, haben PMN einen direkten antimikrobiellen Einfluss (KOSCIUCZUK et al., 2014). Migrierte Makrophagen sind sowohl für die weitere Produktion von Zytokinen, reaktiver Sauerstoffverbindungen und Stickstoffmonoxid, sowie für die Phagozytose von Erregern und zu Grunde gegangenen PMN, als auch für die Unterstützung der Gewebeheilung verantwortlich, wie von PAAPE et al. (2003) zusammenfassend dargestellt wurde. Natürliche Killerzellen zählen ebenso zu den Zellen des angeborenen Immunsystems und können im infizierten Euter Zielzellen durch unterschiedliche Mechanismen lysieren. Dazu gehören Zell-mediierte oder Rezeptor-mediierte Antigenerkennung, welche zu Exozytose von Granula und Ausscheidung von zytolytischen Faktoren führt. Die Granula enthalten unter anderem Perforin und sezernieren zusätzlich toxische Moleküle, wie den Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), der in veränderten Zellen zur Apoptose führen kann (LEE et al., 1996; DOTIWALA et al., 2016; SIPKA et al., 2016). Sowohl die Erregergattung, als auch deren spezifische Abstammung nimmt großen Einfluss auf die Art der ausgeschütteten Botenstoffe und steuert somit auch den Verlauf der Mastitis (klinisch oder subklinisch). MURPHY et al. (2019) konnten nachweisen, dass *S. aureus*-Stämme nach der *in vitro* Infektion einer Mammären Alveolaren T-Zelllinie (MAC-T-Zelllinie) auch in Abwesenheit des TLR2-Rezeptors zur Expression von CCL20, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 und TNF- $\alpha$  führen. Es existieren aber auch *S. aureus*-Stämme, die nur sehr schwach an diesen Rezeptor binden und somit nur eine sehr schwache Immunantwort hervorrufen oder aber nach erfolgreicher Bindung die weitere Signalverarbeitung über eine Blockade von

NF- $\kappa$ B verursachen können. (YANG et al., 2008; MURPHY et al., 2019). GÜNTHER et al. (2011) stellten außerdem fest, dass MEC *in vitro* nach Kontakt zu einem hitzeinaktivierten *E. coli*-Stamm zwar ein ähnliches Zytokin- und Chemokinemuster exprimieren, jedoch signifikant früher, umfangreicher und um ein Vielfaches stärker, als nach Kontakt mit einem hitzeinaktivierten *S. aureus*-Stamm. Häufig sind die Folgen einer *S. aureus*- Infektion deshalb subklinische Mastitiden, während *E. coli*-Mastitiden oft eine akute klinische Erkrankung auslösen, wobei die Schwere der Erkrankung immer auch von tierindividuellen Faktoren und dem Bakterienstamm abhängt, wie in der Zusammenfassung von BURVENICH et al. (2003) deutlich wird. Während BLUM et al. (2017) nach 12 – 24 h nach der Infektion mit *E. coli* bereits eine signifikante Herabregulation von TLR4-Rezeptoren messen konnten, konnten PETZL et al. (2008) zum selben Zeitpunkt eine Steigerung der mRNA des Rezeptors messen. Bisher ist immer noch ungeklärt, ob eine Zunahme der Rezeptoren und die somit gesteigerte Bindung an die Erreger zu einer schnelleren Eliminierung und damit zur schnelleren Ausheilung der Mastitis führt, oder in der Folge eine schwere generalisierte Entzündung ausgelöst wird, die bis zum Tod führen kann.

### 2.3. Die Rolle der Zytokine bei der Infektionsabwehr

Proinflammatorische Zytokine führen zu einer Vielzahl von entzündungsfördernden Reaktionen bei der bovinen Mastitis. Sie wirken unter anderem als Chemokine und rekrutieren Leukozyten, wie PMN und Makrophagen, zum Entzündungsgeschehen (PERSSON et al., 1993). Für die Akute-Phase Antwort einer Mastitis sind vor allem IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF- $\alpha$  verantwortlich (HEINRICH et al., 1990; STEEL et al., 1993). Sie lösen Fieber, eine Leukozytose und einen Anstieg der Serumproteine aus (GRÖNLUND et al., 2003). Die am Entzündungsort sezernierten Zytokine gelangen vom Euter über das Blut in die Leber, wo sie die Hepatozyten zur Sekretion von akute Phase Proteinen, wie Haptoglobin, Serum Amyloid A und Laktoferin anregen (CASTELL et al., 1990; YOSHIOKA et al., 2002; THOMAS et al., 2018). MEC sind außerdem Pathogen-abhängig selbst in der Lage diese Proteine lokal zu synthetisieren (GRIESBECK-ZILCH et al., 2008; ZALEWSKA et al., 2020). Liegt eine Mastitis vor kann eine gesteigerte Konzentration dieser Proteine in der Milch gemessen werden (ZALEWSKA et al., 2020; RAJ et al., 2021). Haptoglobin bindet freies Hämoglobin, welches zelltoxisch wirkt und dessen Eisenmoleküle von Bakterien zu ihrer Vermehrung genutzt werden können (DIARRA et al.,

2002; SCHAER et al., 2013). Die Zellen des Immunsystems werden durch Serum Amyloid A chemotaktisch angezogen und zur Adhäsion animiert. Durch die Bindung an TLR besitzt es wie Laktoferrin die Fähigkeit, die Sekretion weiterer Chemokine und Zytokine anzuregen (DE BUCK et al., 2015). Weiterhin kann es Endothelzellen zur Proliferation anregen (CONNOLLY et al., 2010). Als Protein mit direkter antibakterieller Wirksamkeit spielt Laktoferrin eine wichtige Rolle. Weitere früh regulierte akute Phase Proteine bei der bovinen Mastitis sind: C-reaktives Protein, Fibrinogen, Ferritin, Ceruloplasmin und das Lipopolysaccharid-bindende-Protein (ZALEWSKA et al., 2020). Über die Aktivierung der NF- $\kappa$ B – Kaskade führt TNF- $\alpha$  zu einer signifikanten Steigerung der IL-8-Sekretion, welches durch seine starken chemotaktischen Eigenschaften gegenüber PMN eine große Rolle für den weiteren Verlauf einer Mastitis spielt (s. II.2) (BARBER & YANG, 1998; FITZGERALD et al., 2007). Der Einfluss von IL-6 führt zur Differenzierung von zytotoxischen T-Zellen (CD-8-Zellen) und fördert die Antikörperproduktion durch B-Zellen und übt somit stimulierende Wirkung auf das erworbene Immunsystem aus (OKADA et al., 1988; MAEDA et al., 2010). Fibroblasten reagieren auf die Anwesenheit von IL-6 mit einer Erhöhung der Kollagenproduktion und der Gefäßpermeabilität, was zur Heilung, aber auch zur Fibrosierung des Eutergewebes führen kann. (DUNCAN & BERMAN, 1991; ZHANG et al., 2016). IL-1 $\beta$  schwächt den Zellverband von MEC, indem es die „Tight Junctions“ durch strukturelle Veränderungen zerstört. Auch IL-6 und TNF- $\alpha$  führen zur Auflösung der „Tight Junctions“, was eine Permeabilität der Blut-Euter-Schranke zur Folge hat. Hierdurch können Immunzellen leichter in das betroffene Gewebe migrieren (XU et al., 2018; KOBAYASHI et al., 2021). Während vor allem IL-1 $\alpha$  und TNF- $\alpha$  die Entzündung bei einer *E. coli*-Infektion vorantreiben, spielen für eine *S. aureus*-Infektion vor allem IFN- $\beta$  und IL-6, das auch unabhängig von TLR2 synthetisiert werden kann eine Rolle für den weiteren Verlauf (GÜNTHER et al., 2011). Die Ausschüttung von Zytokinen führt somit sowohl auf zellulärer, als auch auf humoraler Ebene zu einer gesteigerten Entzündungsreaktion des Euters, die sich gegen den eingedrungenen Erreger richtet, aber auch im Gewebe des Wirtes großen Schaden anrichten kann.

#### **2.4. Antimikrobielle Peptide bei der Infektionsabwehr**

Antimikrobielle Peptide können in allen Organismen gefunden werden (MOERMAN et al., 2002; OARD & ENRIGHT, 2006; LIND et al., 2015;

RAMACHANDER TURAGA, 2020; NAKATSUJI et al., 2021). Sie werden in Säugetieren vor allem von Epithelzellen und Zellen des angeborenen Immunsystems (v. a. PMN) exprimiert und durch diese sezerniert (RYAN et al., 1998; CAVERLY et al., 2001). Wie EL-DIRANY et al. (2021) und MAHLAPUU et al. (2016) zusammenfassend dargestellt haben, handelt es sich um strukturell vielfältige kationische Peptide mit einer Sequenz von fünf bis hundert Aminosäuren. Räumlich getrennt zur geladenen Region befindet sich eine hydrophobe Region, welche mit den Lipiden der bakteriellen Zellmembranen interagieren kann. Aufgrund der negativ geladenen Zellmembranen und des hohen Lipidanteils von Bakterien im Vergleich zu neutral geladenen Säugetierzellmembranen wirken AMP z. B. selektiv auf Bakterienzellen. Es kann eine direkte antimikrobielle Wirksamkeit gegenüber diversen grampositiven und gramnegativen Bakterien, Pilzen, Viren und Einzellern nachgewiesen werden (DE LUCCA et al., 1998; BELAID et al., 2002; ALBEROLA et al., 2004; BRAFF et al., 2005). AMP führen zu einer Erhöhung der Permeabilität bakterieller Zellmembranen und somit zum Tod des Bakteriums, die spezifische Funktionsweise ist dabei Peptid-abhängig (MANGONI et al., 2004). Beispielsweise können AMP in großer Zahl an anionische Moleküle in der Bakterienmembran binden und die Membranoberfläche somit wie einen Teppich umhüllen, um anschließend ähnlich eines Detergens die Lipidmembran zu zerstören (FERNANDEZ et al., 2012). Des Weiteren kommt es z.B. durch Porenbildung, Verdrängung der divalenten Kationen der Membranen, Störung der Zellmembransynthese oder intrazellulärer Inhibition der Proteinsynthese zur Destabilisierung der Zellhomöostase und schließlich zum Untergang des Bakteriums (CHRISTENSEN et al., 1988; CHAN & GALLO, 1998; LAM et al., 2014). Als Signalmoleküle können sie weiterhin aktiv die Immunantwort modulieren, indem sie z. B. als Chemokine auf das angeborene Immunsystem wirken oder durch antiinflammatorische Eigenschaften einer überschießenden Immunreaktion vorbeugen (YANG et al., 2000; SUN & SHANG, 2015). Durch die vielen unterschiedlichen teilweise synergistischen Wirkungsweisen sind AMP gut gegen Resistenzbildung geschützt (ZASLOFF, 2002). Die Effektivität der Wirkung ist vermutlich auch von der Peptidkonzentration, vom Wirkungsort, von der Bakterienspezies und von der Entwicklungsphase des Bakteriums abhängig (SCHONWETTER et al., 1995; LUTZOW et al., 2008). Bei einer vorherrschenden Entzündung findet sowohl eine direkte Ausschleusung der AMP über gespeicherte Granula statt, als auch deren indirekte Expressionsanregung durch die Bindung von PAMPs (s. II.2.2) oder durch Zytokine

(DORSCHNER et al., 2001; DAVIES et al., 2008).

## 2.5. Antimikrobielle Peptide im Euter

Bei der Milchdrüse handelt es sich ontogenetisch um eine apokrine Drüse der Haut (Hautanhangsdrüse), weshalb mammäre Epithelzellen, ähnlich den dermalen Zellen, in der Lage sind eine große Bandbreite an AMP zu bilden, wie BISWAS et al. (2022) zusammenfassend darstellen. An unterschiedlichen Lokalisationen, wie im Strichkanal, in der Zitzen- und der Euterzisterne und in den Drüsenaleveolen werden unterschiedliche AMP als Teil der Primärkeimabwehr in verschiedenen Konzentrationen sezerniert (TETENS et al., 2010).

### *β-Defensine*

Bei den  $\beta$ -Defensinen handelt es sich um amphiphatische kationische AMP mit einer  $\beta$ -Faltblattstruktur, die über Disulfidbrücken verbunden sind. Sie werden im bovinen Euter durch Zellen der Milchdrüse, sowie durch Granulozyten in der Milch gebildet. Nach der Aktivierung von TLR wird ihre Expression über den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B gesteigert. Sie sind somit Teil der ersten Abwehrmechanismen der bovinen Milchdrüse, wie von GURAO et al. (2017) zusammengefasst wurde. Sie besitzen eine direkte antimikrobielle Wirkung gegen eine Vielzahl von Bakterien, Pilzen und Viren (DAS et al., 2008; KANG et al., 2015; MATTAR et al., 2016; OGUIURA et al., 2021). Zu der Gruppe der  $\beta$ -Defensine lassen sich unter anderem das linguale antimikrobielle Peptid (LAP) und  $\beta$ -Defensin-1 (DEFB1) zuordnen. LAP wird vor allem im regionalen Lymphknoten des Euters, aber auch in der Drüsenzisterne und im Euterparenchym exprimiert. Die Expression von DEFB1 ist verglichen mit LAP sehr viel geringer und findet vor allem in den distalen Bereichen der Mamma in der Drüsenzisterne und in unmittelbarer Nähe der Fürstenberg'schen Rosette statt (TETENS et al., 2010). Die durchschnittliche Basiskonzentration von LAP in der Milch einer gesunden Kuh betrug nach ISOBE et al. (2009) 1  $\mu$ g/ml. Sowohl im Tierversuch, als auch bei der Inkubation von MEC wird die Expression von LAP und DEFB1 nach einer Infektion bzw. Stimulation mit *E. coli* oder LPS signifikant heraufreguliert (GÜNTHER et al., 2009; KWEH et al., 2019). KOSCIUCZUK et al. (2014) konnten bei einer Infektion des Euters mit Staphylokokken eine Expressionssteigerung messen, während PETZL et al. (2008) nach einer *S. aureus*-Infektion keine signifikante Expressionssteigerung erzielen konnten. Auch bei Versuchen mit bovinen Endothelzellen konnte eine Steigerung der



Expression von  $\beta$ -Defensinen nach Zugabe von *E. coli* bzw. *S. aureus* erreicht werden, was einen Hinweis auf eine Infektionsbeteiligung in verschiedenen Geweben liefert (ALVA-MURILLO et al., 2012). Im Gegensatz zu LAP variierte die Expression von DEFB1 bei einer Mastitis stark, weshalb kein Zusammenhang mit einer Infektion nachgewiesen werden konnte. Gleichzeitig konnte eine antibakterielle Wirksamkeit dieses synthetisch generierten Peptids gegenüber einem Mastitisisolat von *E. coli* nachgewiesen werden (AONO et al., 2006). Es kann ein Konzentrationsanstieg von  $\beta$ -Defensinen in der Milch von Tieren gemessen werden, die an einer Mastitis erkrankt sind. Für LAP wurde eine antimikrobielle Wirksamkeit gegen *E. coli* und *S. aureus* beschrieben (SCHONWETTER et al., 1995; KRENITZ, 2018). DAS et al. (2008) isolierten bubaline neutrophile  $\beta$ -Defensine (BND1-4) aus den PMN gesunder Büffel und konnten anhand eines MTT-Assays eine dosis- und Zeit-abhängige Verringerung der KBE und somit eine antimikrobielle Wirksamkeit bei der Zugabe von *E. coli*, *S. aureus*, *Streptococcus pyogenes* und *Candida albicans* messen. Die minimal hemmenden Konzentrationen (minimale Hemmkonzentration, MHK) der Peptide lagen hier zwischen 3,83  $\mu\text{g/ml}$  bei BND-4 für *Candida albicans* und 28,14  $\mu\text{g/ml}$  bei *Streptococcus pyogenes*. In zirkulierenden Leukozyten konnte nach einer *E. coli*-Mastitis ein Anstieg von DEFB1 gemessen werden (CHENG et al., 2022). Die antimikrobielle Wirksamkeit von LAP gegenüber *E. coli* wurde anhand eines radialen Diffusionsassays nachgewiesen (ISOBE et al., 2009). KRENITZ (2018) konnte nach einer Inkubationszeit von sechs Stunden eine signifikante, Dosis-abhängige Wachstumshemmung von *E. coli* und *S. aureus* durch rekombinantes bovines LAP in Konzentrationen von 41  $\mu\text{g/ml}$  und 83  $\mu\text{g/ml}$  nachweisen.

### *S100-Proteine*

Die Molekularstruktur von S100-Proteinen besteht aus zwei EF-Hand-Motiven, die durch Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ )-Bindung ihre aktive Form annehmen kann. Eine Wechselwirkung mit unterschiedlichen Proteinen, wie die Bindung an Rezeptoren, wird dadurch ermöglicht. Sie sind unter anderem an der Regulation der Zellapoptose, der  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase, der Migration und der Proliferation verschiedener Zellen beteiligt. Im Kontext von Entzündungen können S100-Proteine, ähnlich wie Zytokine oder Endotoxine durch Bindung an TLR oder an den Receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) als Damage-associated molecular patterns (DAMPs) wirken und über den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B die Expression proinflammatorischer

Zytokine hochregulieren, wie GONZALEZ et al. (2020) zusammenfassend beschreiben. Neben ihrer Wirkung als Signalmoleküle üben S100 Proteine eine direkte antimikrobielle Wirksamkeit gegen Mikroorganismen aus. Zu den S100-Proteinen, die im Euter vorkommen gehören unter anderem Calprotektin (S100A8/A9), Calgranulin B (S100A9) und Calgranulin C (S100A12). Sie werden vor allem in Monozyten, Makrophagen und PMN, aber auch in epidermalen Keratinozyten exprimiert (BENEDYK et al., 2007; HSU et al., 2009; WANG et al., 2018). Im Epithel des Strichkanals der bovinen Milchdrüse werden durch Keratinozyten Psoriasin (S100A7), Calgranulin A (S100A8), S100A9 und S100A12 exprimiert (SMOLENSKI et al., 2015). S100A8/A9 bildet bei einem neutralen pH-Wert mit Metallionen des Gewebes oder des umliegenden Nährmediums Chelatkomplexe (NAKASHIGE et al., 2015; ROSEN & NOLAN, 2020). Bakterien, welche ebenfalls Metallionen für ihre Zellentwicklung benötigen, werden folglich in ihrem Wachstum eingeschränkt. Es konnte *in vitro* eine Dosis-abhängige, hemmende Wirkung von humanem S100A8/A9 auf das Wachstum von *S. aureus*, *E. coli* und *Sc. agalactiae* nachgewiesen werden (CORBIN et al., 2008; PIRR et al., 2017). Der wachstumshemmende Effekt auf Pathogen-spezifische Mikroorganismen von humanem S100A12 (Calgranulin C) beruht ebenso auf der Bindung von Zink- und Kupferionen (MOROZ et al., 2003; CUNDEN et al., 2016). Die Unterdrückung von S100A9 führt in PMN zu einer deutlich gesteigerten Überlebensrate von Pathogenen (PENG et al., 2020). Bei einer bovinen Mastitis wird S100A12 verstärkt exprimiert und kann somit bei subklinischen Mastitiden als Biomarker verwendet werden (BOEHMER et al., 2008; LUTZOW et al., 2008; ZHONG et al., 2018). Auch die Proteine S100A7, S100A8 und S100A9 werden bei einer Infektion mit *E. coli* in der Zitze stärker heraufreguliert (REGENHARD et al., 2010; LIND et al., 2015; PETZL et al., 2016; BRAND et al., 2021). Nach einer *E. coli*-Infektion der bovinen Milchdrüse lässt sich ein Anstieg von S100A8 und S100A9 in Blut-Leukozyten messen (CHENG et al., 2022).

### *CC-Chemokine*

Chemokine sind Proteine, die sich durch ihre unterschiedlichen Cysteinreste unterscheiden. Eine Hauptaufgabe von Chemokinen ist die chemotaktische Anlockung von Entzündungszellen, wobei sie auch großen Einfluss auf deren Differenzierung, Adhäsion und die Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies ausüben. Bei Entzündungen oder anderen Erkrankungen, wie tumorösen Veränderungen werden im

betroffenen Gewebe verstärkt Chemokine gebildet und freigesetzt. Nach der Bindung von Glykosaminoglykanen aus der extrazellulären Matrix können Chemokine an G-Protein-gekoppelte Chemokinrezeptoren binden und auf der Endotheloberfläche präsentiert werden oder durch das Gewebe diffundieren. Dadurch entsteht ein chemotaktischer Gradient, der die Migration von Leukozyten auslöst. Es wurde außerdem eine direkte antimikrobielle Wirkung einiger Chemokine beschrieben, wie HUGHES and WATSON (2018) zusammenfassend darstellen. Zur Gruppe der CC-Chemokine gehört das Chemokin CCL20, welches unter anderem von Epithelzellen, Endothelzellen, Makrophagen und PMN ausgeschüttet wird (SCAPINI et al., 2001). Bei einer Entzündung kann dieses Peptid bei der Maus und beim Menschen durch Chemotaxis weitere Gedächtnis-T-Zellen anlocken, welche den Rezeptor CCR6 exprimieren. Durch die exklusive Aktivierung dieses Rezeptors übt CCL20 direkt positiven Einfluss auf die nachfolgende Ausschüttung des proinflammatorischen Interleukins-17 (IL-17) aus. Im Zusammenhang mit tumorösen und autoimmunen Veränderungen kann CCL20 die Migration und Proliferation von Zellen mit Hilfe dieses Rezeptors maßgeblich steigern (RANASINGHE & ERI, 2018; SAMANIEGO et al., 2018). Derselbe Effekt konnte auch für Endometrium-Stroma-Zellen im Rahmen der Endometritis der Frau nachgewiesen werden (TAN et al., 2022). YANG et al. (2003) konnten eine direkte, Dosis-abhängige antimikrobielle Aktivität von CCL20 *in vitro* gegenüber mehreren Pathogenen, wie *E. coli*, *S. aureus*, *Candida albicans* und *Pseudomonas aeruginosa* nachweisen. Die orale Gabe von CCL20 konnte die Menge an Oozysten im Darm mit *Cryptosporidium parvum* infizierter Mäuse außerdem signifikant verringern (GUESDON et al., 2015). CCL20 tritt bei unterschiedlichen humanen Erkrankungen wie Uveitis, Psoriasis oder Multipler Sklerose auf und könnte bei diesen in Zukunft als Biomarker verwendet werden (ABU EL-ASRAR et al., 2019; HUANG et al., 2020b; ELNABAWI et al., 2021). Bei der bovinen Mastitis wird die Transkription von CCL20 mitunter als eines der ersten Gene heraufreguliert (PETZL et al., 2016). SHARIFI et al. (2018) konnten nach einer Analyse mehrerer Studien, die sich mit dem Transkriptionsprofil von Eutergewebe während einer *E.-coli*-Infektion beschäftigten, CCL20 den Schlüsselgenen zuordnen, die sich in Zuge dessen verändern. Auch im Rahmen einer *S. aureus*-bedingten Mastitis können erhöhte CCL20-Werte gemessen werden (WANG et al., 2020). Diese Veränderung lässt sich im mammären Gewebemodell nachvollziehen (FILOR et al., 2022).

*Antileukoproteinase (SLPI, secretory leukocyte protease inhibitor, Antileukoproteinase)*

Die Expression und die Funktion von SLPI wurde bisher vor allem beim Menschen und im Mausmodell untersucht (NAKAMURA et al., 2003; SVENSSON et al., 2017). Nachgewiesen wurde es in der Haut und an Schleimhautbarrieren. Epithelzellen, Mastzellen, PMN und Makrophagen geben im Atemtrakt, im Gastrointestinaltrakt und im Urogenitaltrakt hohe Konzentrationen an SLPI in deren Sekrete, wie Speichel, Bronchialsekret oder Darmsekret ab (HEINZEL et al., 1986; SALLENAVE et al., 1994; BERGENFELDT et al., 1996; OHLSSON et al., 2001; SKOTT et al., 2002). Eine Hauptaufgabe von SLPI ist die Dämpfung der Immunreaktion und die Aufrechterhaltung der Homöostase bei Entzündungen und die Unterstützung der Geweberegeneration (ASHCROFT et al., 2000; TAGGART et al., 2005). Es kann intrazellulär Serinproteasen, wie die neutrophile Elastase unterdrücken, die durch Leukozyten zur Erregerabwehr sezerniert werden (ZHU et al., 2002). Des Weiteren unterbindet SLPI die Bildung von Matrix-Metalloproteinasen durch Monozyten und die Ausbreitung von neutrophilen extrazellulären Fallen (NET) (ZHANG et al., 1997; ZABIEGLO et al., 2015). Das Peptid ist zudem in der Lage, die Signaltransduktion von NF- $\kappa$ B zu blockieren und somit die Expression und Sekretion von Zytokinen einzudämmen (TAGGART et al., 2005). Neben seinen gewebesetzenden Eigenschaften wirkt SLPI direkt antimikrobiell gegen unterschiedliche Erreger, wie *E. coli*, *S. aureus*, *S. epidermidis* und *Candida albicans*. Für seine antimikrobiellen Eigenschaften ist vor allem das N-terminale Ende des Peptids verantwortlich (HIEMSTRA et al., 1996; WIEDOW et al., 1998). Über Bindung an die Erreger-DNA oder -mRNA wird vermutlich eine Vermehrung unterbunden und auf Grund seiner kationischen Eigenschaften kann es Bakterienzellmembranen zerstören (s. II.2.4) (MILLER et al., 1989). Die Expression von SLPI wird durch eine Art negative Rückkopplung über die Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , Chemokine und TLR-Liganden gesteigert. Sie kommen vor allem auf mukösen Oberflächen in großen Mengen vor, wie NUGTEREN and SAMSOM (2021) zusammenfassend feststellen konnten. Zur Aufgabe in mammärem Gewebe ist bisher wenig bekannt. Bei der pubertären Entwicklung der Milchdrüse im Mausmodell wird SLPI Östrogen-abhängig exprimiert (AYYANAN et al., 2011). Ebenso konnte eine gesteigerte Expression während der frühen Involution nach der Laktation bei dieser Spezies gemessen werden (CLARKSON et al., 2004). SEMBA et al. (1999)

konnten bei Frauen, die an einer Mastitis erkrankt waren im Durchschnitt eine erhöhte Menge (76 µg/l) im Vergleich zu gesunden Frauen (17 µg/l) an SLPI in der Muttermilch messen. Nach wiederholter Stimulation boviner-MEC *in vitro* mit LPS wurde das Gen für das Peptid SLPI zusammen mit weiteren antimikrobiellen Faktoren heraufreguliert (GÜNTHER et al., 2012).

### **3. Explantmodelle als Ersatzverfahren zur Untersuchung früher Wirt-Pathogen-Interaktion**

Viele Untersuchungen zur Pathophysiologie der bovinen Mastitis stützen sich nach wie vor auf *In-vivo*- Infektionsversuche. Häufig werden hierfür auch Mausmodelle verwendet (BROUILLETTE et al., 2004a; IWANO et al., 2018; NGASSAM-TCHAMBA et al., 2020), welche sich jedoch nur bedingt für die Erforschung der Pathogenese beim Rind eignen (HUGHES & WATSON, 2018). *In-vivo*-Infektionsversuche mit Kühen stellen den Goldstandard dar, sind jedoch aufwendig und teuer und erfordern bei kleiner Tierzahl oftmals eine bestmögliche Standardisierung (RYMAN et al., 2015; PETZL et al., 2016; PETZL et al., 2018). Werden die Tiere am Ende des Versuchs nicht getötet, können keine Gewebeproben untersucht werden und die Tiere müssen während der einsetzenden Mastitis Schmerzen und eventuelle Schäden erleiden (KHAZANDI et al., 2015; KERRO DEGO et al., 2020). Aus gesellschaftspolitischen Gründen und zur Verbesserung des Tierschutzes wurde das Prinzip der 3R eingeführt (Replacement - Ersatz, Reducement - Verringerung, Refinement - Verbesserung) und in der Verordnung 2010/63/EU (EU, 2010) verankert. Demnach sollen Versuche an lebenden Tieren verringert, der Versuchsaufbau verbessert und wenn möglich komplett durch andere Verfahren ersetzt werden. Um die Anzahl an Tierversuchen in der weiteren Erforschung pathophysiologischer Vorgänge im Euter zu reduzieren werden derzeit unterschiedliche Versuchsansätze *in vitro* verfolgt. Eine Möglichkeit bietet die zwei- oder dreidimensionale Zellkultur von MEC (SHANDILYA et al., 2016) oder MAC-T-Zellen, transformierte mamäre Epithelzellen mit SV-40 large T-Antigen (HUYNH et al., 1991). Ähnlich zur Situation *in vivo* konnten in diesen Systemen im Rahmen eines Stimulationsversuchs mit *E. coli* und LPS jeweils ein starker Anstieg der mRNA der Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  und ein geringer Anstieg von IL-1 $\beta$  nachgewiesen werden (MCCLENAHAN et al., 2005). Eine Zellkultur kann jedoch nicht den physiologischen Zellverband des Gewebes widerspiegeln, da nur eine Sorte der

funktionellen Zellen des jeweiligen Organs kultiviert werden können (JEDRZEJCZAK & SZATKOWSKA, 2014). Werden MEC mit *E. coli* stimuliert werden Faktoren heraufreguliert, die die Transkription von Komplementfaktoren steigern, welche unter anderem die Induktion der antikörperbasierten Abwehr und des Membranangriffskomplex als Auslöser der Zelllyse nach sich ziehen. Bei einer *E.-coli*-Mastitis hingegen werden diese herabreguliert und stattdessen der alternative Weg des Komplementsystems aktiviert, welcher vor allem zu einer Opsonierung des Pathogens beiträgt. Im Vergleich zum Tiermodell werden im Zellmodell außerdem verstärkt proinflammatorische Gene, wie *CXCL8* heraufreguliert (GÜNTHER et al., 2009). Während die Verwendung eines isoliert perfundierten Euters erlaubt, das komplette Organ zu untersuchen (BÄUMER & KIETZMANN, 2000), ist diese Methode durch einsetzende Zersetzungsprozesse auf einen Zeitraum von sechs bis maximal acht Stunden begrenzt und somit nicht für längere Infektionsversuche geeignet. Dieses Verfahren fordert außerdem hohen technischen und zeitlichen Einsatz (PINTO et al., 2017; WELLER et al., 2019). Bei der Gewinnung von Gewebestücken, z. B. in Form von Explants werden diese unter strengen Hygienemaßnahmen prozessiert und anschließend wie die Zellen einer Zellkultur in Kulturmedium inkubiert. Durch die erhaltene Gewebestruktur wird nicht nur die Reaktion der milchbildenden Zellen, sondern aller im Gewebe vorhandenen Zellen abgebildet. Es befinden sich demnach z. B. Makrophagen, Fibrozyten, Endothelzellen, Erythrozyten und Granulozyten in einem Explant. Mit dieser Methode ist es möglich, das Verhalten unter Einbeziehung des kompletten Gewebeverbands der Milchdrüse an einer Lokalisation zu untersuchen, was eine Annäherung des *In-vitro*-Versuchs an die physiologischen Gegebenheiten *in vivo* gestattet (MACÍAS LUACES, 2019; FILOR et al., 2021). Es existieren bereits mehrere Verfahren von bovinen Eutergewebekulturen, wobei die Gewinnung und die Prozessierung nicht einheitlich standardisiert sind. In den meisten Studien werden die Explants manuell mit dem Skalpell auf die gewünschte Größe zugeschnitten, was ihre Reproduzierbarkeit stark erschwert (WU et al., 2004). Um diese Ungenauigkeit auszugleichen wurden unter anderem Biopsiestanzen verwendet (LIND, 2011; FIORDALISI et al., 2016). LIND (2011) etablierte in Anlehnung an Mausmodelle ein Explantmodell für die Zitzenschleimhaut und die Fürstenberg'sche Rosette, welches durch MACÍAS LUACES (2019) auf das Euterparenchym ausgeweitet wurde. Hierbei wurden mit einer Biopsiestanze Eutergewebeproben einer frisch geschlachteten Kuh entnommen, in einer gepufferten Salzlösung transportiert und

anschließend manuell auf eine Größe von ca. 12 mm<sup>3</sup> zurechtgeschnitten (2 mm Länge x 1,38 mm Radius). Die Inkubation der so erzeugten/gewonnenen Explants erfolgte in einem Nährmedium angereichert mit einem Antibiotikum, Insulin und Prednisolon. Dieses Modell wurde in der vorliegenden Arbeit verwendet (s. III.3.2.4). Mit Hilfe eines Dermatoms verwendeten FILOR et al. (2021) „Precision cut bovine udder slices“ (PCBUS) für die Inkubation und Stimulation von lobuloalveolärem Euterparenchym. Bei der definierten und reproduzierbaren Gewebedicke von 250 µm und einem Durchmesser von 6 mm konnte die Versorgung der Zellen mit Nährstoffen und Sauerstoff gewährleistet werden. Es war hiermit möglich die Vitalität der Gewebeschnitte über einen Inkubationszeitraum von mindestens vier Tagen bei > 70 % zu erhalten, was durch einen MTT-Assay verifiziert wurde. Bei allen Modellen wurden mit den gewonnenen Geweben Stimulationsversuche mit LPS und bei FILOR et al. (2021) zusätzlich mit Peptidoglykan (PGN) durchgeführt, um die Reaktion der Zitze und des Eutergewebes *in vitro* auf eine Infektion mit den Erregern *S. aureus* und *E. coli* zu untersuchen und somit die initialen Abläufe einer Mastitis zu simulieren (BRAND et al., 2021). Die Ergebnisse der Stimulationsversuche *in vitro* gleichen den Erkenntnissen, die durch Transkriptomanalysen von Euterparenchym *in vivo* mit *S. aureus* und *E. coli* infizierter Kühe gewonnen wurden. Es konnte jeweils eine gesteigerte Expression von antimikrobiellen Peptiden, Zytokinen, Interleukinen oder deren Rezeptoren gemessen werden, die einen großen Anteil zur Entzündungsreaktion und akuten Immunantwort beisteuern (MITTERHUEMER et al., 2010; PETZL et al., 2016).

#### 4. Endotoxintoleranz

Während das Immunsystem nach dem ersten Kontakt mit einem Pathogen oder seiner Bestandteile oftmals eine vergleichbar starke Ausschüttung von Entzündungsmediatoren in Gang setzt, kann nach wiederholtem Kontakt ein transienter, refraktärer Zustand eintreten. Dieses Phänomen ist seit längerem unter dem Begriff der Endotoxintoleranz bekannt (BEESON et al., 1946). Bei der wiederholten Bindung von bakteriellen Liganden an Rezeptoren, wird hierbei vorübergehend die Expression bestimmter proinflammatorischer Zytokine und Chemokine herabreguliert, wobei die Bildung und Ausschüttung von antimikrobiellen Peptiden gegenüber dem ersten Kontakt gesteigert werden kann. Somit kann eine Überreaktion des Immunsystems z. B. in Form eines septischen Schockgeschehens beim Auftreten einer Sepsis vermieden werden, gleichzeitig werden dabei endogene antimikrobielle

Mechanismen erhalten oder gesteigert (FOSTER et al., 2007). Bindet z. B. LPS (Endotoxin) wiederholt an TLR4 wird die Produktion des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B unter anderem über Regulatoren, wie z. B. IRAKM und eine verringerte Rekrutierung des Adapterproteins MyD88 teilweise blockiert. Dies führt zu einer geringeren Expression inflammatorischer Faktoren, wie z. B. TNF- $\alpha$ , IL6 und IL-1 $\beta$ . Das Phänomen wurde bereits in zahlreichen Studien an Nagern und am Menschen untersucht, wobei die genauen Mechanismen des Ablaufs noch nicht abschließend geklärt sind (KOBAYASHI et al., 2002; MEDVEDEV et al., 2002; LIU et al., 2008; LEE et al., 2022). In der Humanmedizin konnte das Auftreten einer Endotoxintoleranz im Zusammenhang mit septischen Erkrankungen (LELIGDOWICZ et al., 2022), zystischer Fibrose (DEL CAMPO et al., 2011), akutem koronarem Syndrom (DEL FRESNO et al., 2007), Asthma und Krebserkrankungen (LIU et al., 2019) nachgewiesen werden. Beim Rind wurden bis jetzt vergleichsweise wenige Untersuchungen zu diesem Thema durchgeführt. Anhand von peripheren mononukleären Blutzellen konnten BOAM et al. (2019) nach zweifacher Stimulation von Kühen mit LPS in der Transitphase eine Endotoxintoleranz nachweisen. Bei der Stimulation von bovinen peripheren mononukleären Blutzellen konnten außerdem Hinweise auf eine gesteigerte Toleranz gegenüber Endotoxinen im postpartalen Zeitraum festgestellt werden (FILIPE et al., 2021). Da eine *E. coli*-Mastitis bei der Milchkuh oftmals eine überschießende Immunantwort hervorruft, kann es zu einem sehr schweren Krankheitsverlauf mit systemischem inflammatorischem Response Syndrom (SIRS) kommen (RIOLLET et al., 2000). Um einen möglichen positiven Effekt der Endotoxintoleranz zur Verhinderung schwerer klinischer Mastitiden auszunutzen, wurden von PETZL et al. (2012) mehrere Studien zur bovinen Mastitis durchgeführt. Das Konzept umfasst hierbei die duale Funktion der Endotoxintoleranz durch Inhibition der Induktion inflammatorischer Gene bei gleichzeitig gesteigerter Expression antimikrobieller Faktoren. Dies konnte sowohl in primären bovinen Milchdrüsenepithelzellen *in vitro* (GÜNTHER et al., 2012; GÜNTHER et al., 2017b), als auch *in vivo* nach intramammärer LPS-Vorbehandlung und anschließender experimenteller Infektion bei Milchkühen gezeigt werden (PETZL et al., 2012). Intramammär LPS-vorbehandelte Kühe unterlagen einem transienten Schutz, an einer *E. coli*-Mastitis zu erkranken. Ähnliche Beobachtungen zeigten sich bei Untersuchungen durch Applikation des in einem Impfstoff enthaltenen *E. coli*-Bakterins (J5). Hier konnte ebenfalls eine experimentelle Mastitis durch *E. coli* symptomatisch abgemildert werden, der Ansatz bot aber



---

keinen Schutz gegen eine neue Infektion (GONZÁLEZ et al., 1989). Inwieweit sich die komplexen molekularen Vorgänge bei der Endotoxintoleranz in bovinen *In-vitro*-Systemen simulieren lassen ist nur in einer sehr begrenzten Anzahl an Studien zu finden (GÜNTHER et al., 2012). Im Rahmen von Explant-Modellen konnte dies für die Spezies Rind bisher nicht gezeigt werden und sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden.

### III. MATERIAL UND METHODEN

#### 1. Geräte

##### 1.1. Verwendete Geräte für den Time Kill Assay

Gerät	Hersteller
Autoklav D-65	Systec, Linden
Brutschrank Incucell	MMM Medcenter, Planegg
Bunsenbrenner Gasprofi 2SCS	WLD-TEC, Göttingen
Dampfsterilisator Varioclav®	Varioclav, Oberschleißheim
Gefrierschrank Biocompact II	Gram, Barcelona, ESP
Kühl- und Gefrierschrankkombi Liebherr, Premium	Liebherr, Ochsenhausen
Orbitalschüttler SHO	Witeg Labortechnik, Wertheim
Multi-mode Plate Reader CLARIOstar Plus	BMG Labtech, Ortenberg
Schüttler Vortex Genius 3	IKA, Staufen
Spülmaschine Mielabor Automatic G7733	Miele, Gütersloh

##### 1.2. Verwendete Geräte für das Explant-Modell

Gerät	Hersteller
Autoklav D-65	Systec, Linden
Biopsiestanze BIP-EVOCORE® EC2215	BIP, Türkenfeld
Brutschrank HeracellVios 160	Thermo Scientific, Waltham, USA
Brutschrank Incucell	MMM Medcenter, Planegg
Bunsenbrenner Gasprofi 2SCS	WLD-TEC, Göttingen
Dampfsterilisator Varioclav®	Varioclav, Oberschleißheim
Eismaschine Model RF2266A	The Manitowoc Company, Manitowoc, USA
Eutertisch	ICKuh, Hambühren
Gefrierschrank Iridium 800, biomedical division	Angelatoni Industrie, Massa, IT
Laborkühlschrank- und Gefrierkombination Bosch KGE	Bosch, Gerlingen
Photometer CLARIOstar	BMG Labtech, Ortenberg
Schüttler Vortex Genius 3	IKA, Staufen
Sicherheitswerkbank Biowizard 130 GL	Kojair, Vilppula, FIN
Spülmaschine Mielabor Automatic G7733	Miele, Gütersloh
Tischschweißgerät Polystar 408-M-RPA	Polystar, Hamburg
TubeMarker	4titude, Wotton, UK
Zellzahlmessgerät Cellcounter DCC	DeLaval, Tumba, SWE

##### 1.3. Verwendete Geräte für den Chemotaxisassay

Gerät	Hersteller
Autoklav D-65	Systec, Linden
Brutschrank HeracellVios 160	Thermo Scientific, Waltham, USA
Fluoreszenz-Durchflusszytometer, Model Accuri C6	BD, Becton-Dickinson, New Jersey, USA
Hämatologie-Analysator Abaxis VetScan HM5 v3.31	Abaxis Europe GmbH, Griesheim
Laborkühlschrank- und Gefrierkombination Bosch KGE (- 20°C)	Bosch, Gerlingen
Spülmaschine Mielabor Automatic G7733	Miele, Gütersloh
Stoppuhr	Peter Oehmen, Essen
Vortex MS1 Minishaker	IKA, Staufen
Zentrifuge Hettich™ 1610 Universal 32 R	Hettich, Tuttlingen

## 1.4. Verwendete Geräte für die molekularbiologische Untersuchungen

Gerät	Hersteller
Autoklav D-65	Systec, Linden
Biofuge pico	Heraeus, Hanau
Eismaschine Model RF2266A	The Manitowoc Company, Manitowoc, USA
Experion Automated Electrophoresis Station	Bio Rad, München
Experion Priming Station II	Bio Rad, München
Experion Vortex Station	Bio Rad, München
Gefrierschrank Iridium 800, biomedical division	Angelatoni Industrie, Massa, IT
Laborkühlschrank- und Gefrierkombination Bosch KGE	Bosch, Gerlingen
Nanophotometer Pearl	Implen, München
Professional Thermocycler TOptical	Biometra, Göttingen
Professional Thermocycler QTower	Biometra, Göttingen
Regelbarer Vortexer RS-VA 10	Phoenix Instrument, Garbsen
Reinigungsbox DNA RNA UV Cleaner	Biosan, Lettland
Stoppuhr	Bio&Sell
Thermoshaker BioShake IQ	Analytik Jena, Schweiz
Zentrifuge My Fuge Mini	Biozym, Oldendorf
Zentrifuge Speed Mill Plus	Analytik Jena, Schweiz
Autoklav D-65	Systec, Linden

## 2. Material

### 2.1. Laborbedarf für den Time Kill Assay

Laborbedarf	Hersteller
Abdeckfolien für Mikrottestplatten Rotilabo®	Carl Roth, Karlsruhe
Cryobank™ Tubes	Mast Diagnostica, Reinfeld
Handschuhe Größe Medium Nitril® BestGen®	Meditrade, Kiefersfelden
Impföse aus Edelstahl	Carl Roth, Karlsruhe
Laborglasflaschen 1000 ml	Duran Group, Wertheim
Mikroröhrchen Typ Eppendorf 5 ml	Kisker Biotech, Steinfurt
Nunc™ Micro Well™ 96-Well Mikroplatte, flacher Boden	Thermo Fisher
Parafilm „M“/Pechiney	Bemis, Neenah, USA
Pipettenspitzen 1 µl, 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Brand, Wertheim
Pipettierhelfer Accu-jet® pro	Brand, Wertheim
Reagenzglas mit Deckel, Rundboden, 21 ml	Carl Roth, Karlsruhe
Serologische Pipette, 10 ml	Greiner bio-one, Frickenhausen
Transferpette® 0,1- 1, 0,5- 10, 20- 200, 100- 1000 µL	Brand, Wertheim

Reagenzien	Hersteller
Bouillon LB-Medium (Luria/Miller), 25 g/l	Carl Roth, Karlsruhe
Bovine CCL20/MIP-3-Alpha Protein, Expression host: <i>Escherichia coli</i> ( <i>E. coli</i> )	LifeSpan BioSciences, Inc., Seattle, USA
Columbia-Schafblut-Agar	Oxoid, Wesel
<i>E. coli</i> Stamm 1303	Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover
Kristallviolett-Galle-Lactose-Agar (VRB-Agar)	Oxoid, Wesel
Isotonische Kochsalz-Lösung 0,9 % NaCl Braun	B. Braun, Melsungen
Penicillin-Streptomycin	Bio&Sell, Feucht/Nürnberg
Recombinant Bovine Cytosol aminopeptidase (LAP3), partial, Expression host: <i>E. coli</i> , 20.3kDa	Cusabio, Houston, USA
Recombinant Bovine Protein S100-A9 (S100A9), Expression host: <i>E. coli</i> , 34.5 kDa	MyBioSource, San Diego, USA
Recombinant Bubalus bubalis Lingual antimicrobial peptide (rbbLAP), Expression host: <i>E. coli</i> 19.8 kDa, pH 8.0	Cusabio, Houston, USA
Recombinant Cattle DEFB1 beta-defensin 1 protein, Expression host: <i>E. coli</i> (rbDEFB1), 40kDa, pH7.2-pH7.4	Creative BioMart, Shirley, USA

Recombinant Human Antileukoproteinase, Expression host: <i>E. coli</i> (rhSLPI), 16.7kDa, pH8.0	Cusabio, Houston, USA
Recombinant Human S100A8/A9 Heterodimer (carrier-free), 23.9 kD (~11 kD für S100A8 und ~13 kD für S100A9), pH 7.2	Biolegend, San Diego, USA
S100 Calcium Binding Protein A12 Recombinant bovine (S100A12), Expression host: <i>E. coli</i> , 14.2kDa, pH 8.0	MyBioSource, San Diego, USA
<i>S. aureus</i> Stamm 1027	Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover
<i>Sc. uberis</i> Stamm O140J	Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover

## 2.2. Laborbedarf für die Explantnahme

Laborbedarf	Hersteller
Becherglas 100 ml, 250 ml, 500 ml	Duran Group, Wertheim
Biopsienadel 12G x 130 mm, Probenlänge 19 mm	BIP, Türkenfeld
Chirurgische Schere, gebogen, 14,5 cm	Eickemeyer, Tuttlingen
Cryobank™ Tubes	Mast Diagnostica, Reinfeld
Einmal-Injektion-Kanüle 20 G	B. Braun, Melsungen
Eppendorf Safe-Lock Tubes 1,5 ml	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Gewebekulturplatte, 24-Well	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glasperlen, massiv	VWR, Darmstadt
Handschuhe Größe Medium Nitril® BestGen®	Meditrade, Kiefersfelden
Kohlenstoffdioxid	Linde, Oberschleißheim
Tesa 4541 Gewebeband, 38 mm	Tesa, Offenburg
Laborglasflaschen 1000 ml	Duran Group, Wertheim
Micro Centrifuge Tube, freistehender Boden, 0,5 ml	VWR, Darmstadt
Milchprobenröhrchen, 10 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Petrischale, Glas	Carl Roth, Karlsruhe
Pinzette, anatomisch	Carl Roth, Karlsruhe
Pinzette, anatomisch, gerade, spitz	Carl Roth, Karlsruhe
Pinzette, chirurgisch	Aesculap, Tuttlingen
Pipetten 0,1-1, 0,5-10, 10-100, 20-200, 100-1000 µL	Sartorius, Göttingen
Pipettierhelfer Accu-jet® pro	Brand, Wertheim
Pipettenspitzen 1 µL, 100 µL, 1000 µL Optifit Tips	Sartorius, Göttingen
Reagenzglas mit Deckel, Rundboden, 21 ml	Carl Roth, Karlsruhe
Reagenz-/Zentrifugenröhrchen mit Schraubverschluss Celsartubes® 15 ml, 50 ml	Greiner bio-one, Frickenhausen
Röhrchen 1,4 ml mit rundem Boden	Micronic, Lelstad, NL
Serologische Pipette, 10 ml	Greiner bio-one, Frickenhausen
Servoprax Abstrichtupfer Amies-Agar	Servoprax, Wesel
Skalpellsgriff	Carl Roth, Karlsruhe
Skalpellsklingen BAYHA® steril, 15, 22	Carl Roth, Karlsruhe
Stickstoff	Linde, Oberschleißheim
TPE-Capband 8	Micronic, Lelstad, NL
TPE Capcluster	Micronic, Lelstad, NL
Reagenzien	Hersteller
Brain Heart Infusion Broth	Sigma-Aldrich, Steinheim
Cell Counting Kit – 8 (WST-8)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Columbia-Schafblut-Agar	Oxoid, Wesel
<i>E. coli</i> Stamm 1303	Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover
Flüssigmedium Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham (DMEM-F12)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Hydrocortison ≥98 %	Sigma-Aldrich, Steinheim

Insulin	Sigma-Aldrich, Steinheim
E.Isotonische Kochsalz-Lösung 0,9 % NaCl Braun	B. Braun, Melsungen
Kristallviolett-Galle-Lactose-Agar (VRB-Agar)	Oxoid, Wesel
Lipopolysaccharide von <i>E. coli</i> Stamm O55:B5	Sigma-Aldrich, Steinheim
PBS Dulbecco, ohne Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup>	Biochrom, Berlin
Penicillin-Streptomycin	Bio&Sell, Feucht/Nürnberg
RNA-Later	Sigma-Aldrich, Steinheim
<i>S. aureus</i> Stamm 1027	Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover
Schalmreagenz Eimü <sup>®</sup> Cell-Check 3S	Eimü, Tutzing
Tryptic Soy Broth	Sigma-Aldrich, Steinheim

### 2.3. Material für den Chemotaxisassay

Laborbedarf	Hersteller
BD Vacutainer <sup>®</sup> , One Use Holder	BD, Becton-Dickinson, New Jersey, USA
BD Vacutainer <sup>®</sup> Precision Glide <sup>™</sup> , 20G	BD, Becton-Dickinson, New Jersey, USA
Becherglas 100 ml, 250 ml, 500 ml	Duran Group, Wertheim
Eppendorf Safe-Lock Tubes 1,5 ml	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Falcon <sup>®</sup> 5 ml Rundbodenröhrchen, Polystyrol	BD, Becton-Dickinson, New Jersey, USA
Handschuhe Größe Medium Nitril <sup>®</sup> BestGen <sup>®</sup>	Meditrade, Kiefersfelden
Laborglasflaschen 1000 ml	Duran Group, Wertheim
Pipettierhelfer Accu-jet <sup>®</sup> pro	Brand, Wertheim
Pipettenspitzen 1 µl, 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Brand, Wertheim
Pinzette, anatomisch, gerade, spitz	Carl Roth, Karlsruhe
Polycarbonatmembran 25x80 mm, Porengröße 3 µm, PVP-Oberflächenbehandlung	NeuroProbe Inc., USA
Reagenz-/Zentrifugenröhrchen mit Schraubverschluss Cellstartubes <sup>®</sup> 15 ml, 50ml	Greiner bio-one, Frickenhausen
Serologische Pipette, 25 ml	Greiner bio-one, Frickenhausen
Transferpette <sup>®</sup> 0,1- 1, 0,5- 10, 20- 200, 100- 1000 µL	Brand, Wertheim
Transmigrationskammer, 10-Well	NeuroProbe Inc., USA
Vacutainer EDTA-Röhrchen	BD, Becton-Dickinson, New Jersey, USA

Reagenzien	Hersteller
Flüssigmedium Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham (DMEM-F12)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Hydrocortison ≥98 %	Sigma-Aldrich, Steinheim
Insulin aus Rinderpankreas	Sigma-Aldrich, Steinheim
Recombinant Human IL-8 (humanes IL-8)	Peptotech, Rocky Hill, USA
Pancoll animal, Dichte 0,077 g/ml, steril gefiltert	PAN Biotech, Aidenbach
PBS Dulbecco	Biochrom, Berlin
Penicillin-Streptomycin	Bio&Sell, Feucht/Nürnberg
Percoll <sup>®</sup>	Sigma-Aldrich, Steinheim

### 2.4. Material für molekularbiologische Untersuchungen

Laborbedarf	Hersteller
Abdeckfolie RT-QPCR Adhesive Clear Seals	4titude, Wotton, UK
Eppendorf Safe-Lock Tubes 1,5 ml	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Experion RNA-Chip	Bio-Rad, Feldkirchen
FrameStar <sup>®</sup> 384-Well PCR Platte	4titude, Wotton, UK
Handschuhe Größe Medium Nitril <sup>®</sup> BestGen <sup>®</sup>	Meditrade, Kiefersfelden
innusPEED Lysis Tubes P, 2,4 – 2,8 mm Keramik-Beads	Analytik Jena AG, Schweiz
PCR SoftTubes, 0,2 ml, Flachdeckel, DNA-, RNase-,	Biozym Scientific, Hessisch

DNasefrei	Oldendorf
Pinzette, anatomisch, gerade, spitz	Carl Roth, Karlsruhe
Pipettenspitzen 0,1-1, 0,5-10, 20-200, 100-1000 µL, DNA-, RNase-, Dnasefrei	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf
RNA Mini Kit	Bio&Sell, Feucht/Nürnberg
Transferpette® 0,1- 1, 0,5- 10, 20- 200, 100- 1000 µL	Brand, Wertheim
Verschlusszylinder PCR Soft Tubes, 0,5 ml	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf

Reagenzien	Hersteller
Deoxynucleotide Triphosphat (dNTPs)	Promega, Mannheim
Diverse Primer (für qRT-PCR)	Biomers, Ulm
Dnase I, Rnase free	Bio&Sell, Feucht/Nürnberg
Ethanol ≥ 99,5 %	Carl Roth, Karlsruhe
M-MLV Reverse Transkriptase RNase H Minus, Point Mutant (RT)	Promega, Mannheim
Oligo dT 15 Primer	Promega, Mannheim
Reagenzien für RNA-Chip	Bio-rad, Feldkirchen
RNA Mini Kit	Bio&Sell, Feucht/Nürnberg
RNase-ExitusPlus™	AppliChem, Darmstadt
RNase und DNase-freies Wasser	Carl Roth, Karlsruhe
RNasin Ribonuclease Inhibitor	Promega, Mannheim
SensiFAST™ SYBR® No Rox Kit	Bioline, Luckenwalde

## 2.5. Kulturmedien, Puffer und Lösungen

Reagenzien, die als Pulver oder lyophilisiert vorlagen wurden nach Herstellerangaben in Lösung gebracht und bis zur Verwendung gelagert.

### 2.5.1. Antimikrobielle Peptide und Kulturmedium für den Time-Kill-Assay

*Bouillon Luria/Miller- (LB-Medium) 25 g/l:*

25g LB-Medium Trockensubstanz wurden in 1000 ml *Aqua dest.* (destilliertes Wasser), gelöst und bei 4°C aufbewahrt.

*Penicillin-Streptomycin:*

10.000 U/ml Penicillin/10 mg/ml Streptomycin

*Bovine CCL20/MIP-3-Alpha Protein (rekombinantes bovines CCL20, rbCCL20):*

1 mg rbCCL20 Trockensubstanz wurden in 1 ml *Aqua dest.* gelöst, zu je 100 µl aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt.

*Recombinant Bovine Cytosol aminopeptidase (rekombinantes bovines linguales antimikrobielles Peptid, rbLAP):*

1 mg rbLAP Trockensubstanz wurden in 1 ml *Aqua dest.* gelöst, zu je 100 µl aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt.

*Recombinant Bovine Protein S100-A9 (rekombinantes bovines S100A9, rbS100A9):*

1 mg rbS100A9 Trockensubstanz wurden in 1 ml *Aqua dest.* gelöst, zu je 100 µl aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt.

*Recombinant Bubalus bubalis Lingual antimicrobial peptide (rekombinantes bubalines linguales antimikrobielles Peptid, rbbLAP):*

1 mg rbbLAP Trockensubstanz wurden in 1 ml *Aqua dest.* gelöst, zu je 100 µl aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt.

*Recombinant Cattle rbDEFB1 beta-defensin 1 protein (rekombinantes bovines β-Defensin-1, rbDEFB1):*

50 µg rbDEFB1 Trockensubstanz wurden in 50 µl Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) (s. III.2.5.2) gelöst und bei -80°C aufbewahrt.

*Recombinant Human Antileukoproteinase (Secretory leukocyte proteinase inhibitor, rekombinante humane Antileukoproteinase, rhSLPI):*

1 mg rhSLPI Trockensubstanz wurden in 1 ml *Aqua dest.* gelöst, zu je 100 µl aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt.

*Recombinant Human S100A8/A9 Heterodimer (rekombinantes humanes S100A8/A9, rhS100A8/A9), 0,29 µg/µl:*

Das bereits in PBS (s. III.2.5.2) gelöste Peptid wurde bei -20°C gelagert.

*S100 Calcium Binding Protein A12 Recombinant bovine (rekombinantes bovines S100A12, rbS100A12):*

1 mg rhSLPI Trockensubstanz wurde in 1 ml 0,9 %iger isotonischer Kochsalzlösung (NaCl) gelöst, zu je 100 µl aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt.

### **2.5.2. Puffer, Zusätze und Kulturmedien für das Explantmodell**

*Brain Heart Infusion Broth (BHI), 37 g/l:*

37g BHI wurden in 1 l *Aqua dest.* gelöst und bei 4°C aufbewahrt.

*Eutermidium*: (MACÍAS LUACES, 2019)

- DMEM-F12	500 ml
- Insulin (5 mg/ml, Endkonzentration: 10 µg/ml)	1 ml
- Penicillin-Streptomycin (10.000 U/ml – 10.000 µg/ml, Endkonzentration: 100 U/ml – 100 µg/ml)	5 ml
- Hydrocortison (1 mg/ml, Endkonzentration: 0,5 µg/ml)	250 µl

Das Eutermidium wurde in Aliquots zu je 50 ml bei -20°C aufbewahrt.

*Lipopolysaccharide (LPS) aus E. coli O55:B5 (1 mg/ml)*:

1 mg wurde in 1000 µl *Aqua dest.* gelöst, zu je 20 µl aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt.

*Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS), 9,55 g/l*:

- NaCl	8,0 g
- KCl	0,2 g
- Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,15 g
- KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2 g
- <i>Aqua dest.</i>	1 l

9,55 g PBS wurden in 1 l *Aqua dest.* gelöst und bei 4°C aufbewahrt

Für die Überführung der Explants in das Labor (III.3.2.4) wurde die fertige Pufferlösung vor der Kühlung autoklaviert.

*Tryptic Soy Broth (TSB), 30 g/l*:

30 g TSB wurden in 1 l *Aqua dest.* gelöst und bei 4°C aufbewahrt.

### 2.5.3. Puffer und Reagenzien für die Durchflusszytometrie

*Eutermidium*: s. III.2.5.2

*Interleukin-8 (IL-8), 1000ng/ml*:

1 µg IL-8 wurde in 1 ml *Aqua dest.* gelöst, zu je 100 µl aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt.



- |                     |       |
|---------------------|-------|
| - Percoll           | 12 ml |
| - <i>Aqua dest.</i> | 8 ml  |

*Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS), 9,55 g/l (s. III.2.5.2)*

*PBS zweifach konzentriert (PBS x 2), 19,1 g/l:*

Lösung von 19,1 g PBS in 1 l *Aqua dest.*, Aufbewahrung bei 4°C

#### 2.5.4. **Lösungen, Puffer und Reagenzien für die molekularbiologischen Untersuchungen**

*Waschlösungen für die mRNA-Extraktion (RNA Mini Kit):*

- Ethanol 70 %: Für 100 ml 70 %igen Ethanol wurden 70 ml Ethanol  $\geq 99,5$  % mit 30 ml *Aqua dest.* angemischt.
- Ethanol 80 %: Für 100 ml 80 %igen Ethanol wurden 80 ml Ethanol  $\geq 99,5$  % mit 30 ml *Aqua dest.* angemischt.
- Waschpuffer IT: Der gelieferte Waschpuffer IT für 250 Präparationen wurde mit 70 ml Ethanol  $\geq 99,5$  % verdünnt.
- Waschpuffer MT: Der gelieferte Waschpuffer MT für 250 Präparationen wurde mit 160 ml Ethanol  $\geq 99,5$  % verdünnt.

*Master Mix cDNA Synthese (für eine Probe):*

- |                         |                              |
|-------------------------|------------------------------|
| - Puffer                | 5 $\mu$ l                    |
| - dNTP                  | 1,25 $\mu$ l                 |
| - Reverse Transkriptase | 0,5 $\mu$ l                  |
| - RNasin                | 0,625 $\mu$ l                |
| - RNA/DNA-freies Wasser | 6,625 $\mu$ l/ 7,125 $\mu$ l |

*Master Mix für RT-qPCR (für ein Well auf der 384-Well-PCR-Platte):*

- |  |             |
|--|-------------|
| - SYBR green <sup>®</sup> PCR Master Mix | 5 $\mu$ l   |
| - Primer forward (5 $\mu$ mol/l)         | 0,4 $\mu$ l |
| - Primer reverse (5 $\mu$ mol/L)         | 0,4 $\mu$ l |
| - DNase-RNase freies Wasser              | 3,2 $\mu$ l |

## 2.6. Primer für die quantitative-real-time PCR

Zunächst wurden die lyophilisierten Primer vor der Verwendung mit Ribonuklease (RNase) und Desoxyribonuklease- (DNase) freiem Wasser auf 10 µM verdünnt.

**Tabelle 1: Primer-Sequenzen**

Gen	Vorwärts- und Rückwärtsprimer (5'→ 3') und -länge	Genlänge	T <sub>m</sub>	Referenz
<i>CXCL8</i>	for CCTCTTGTTCAATATGACTTCCA (23) rev GGCCCACTCTCAATAACTCTC (20)	1485	56,2 57,8	YANG et al. (2008)
<i>IL-1β</i>	for TTCTCTCCAGCCAACCTTCATT (22) rev ATCTGCAGCTGGATGTTCCAT (22)	944	58,4 58,4	NEUVIANS et al. (2004)
<i>IL6</i>	for GGAGGAAAAGGACGGATGCT (20) rev TCTGCGATCTTTTGCTTCAGGAT (23)	1.108	59,7 60,6	HILLMER (2018)
<i>LAP</i>	for AGGCTCCATCACCTGCTCCTT (21) rev CCTGCAGCATTTACTTGGGCT (21)	350	60,45 59,45	(KRENITZ, 2018)
<i>TNF</i>	for CTTCTGCCTGCTGCACTTCG (20) rev GAGTTGATGTCGGCTACAACG (21)	1.712	61,9 59,3	YANG et al. (2008)

*for* = forward Primer/Vorwärtsprimer, *rev* = reverse Primer/Rückwärtsprimer, T<sub>m</sub> = Schmelztemperatur des Primers in °C

## 2.7. Spendertiere für das Explantmodell

Durch ein vorher festgelegtes Ausschlussverfahren wurden die Spendertiere auf dem Schlachthof ausgewählt (s. III.3.2.3). Von 23 Tieren wurden 5 Tiere wegen positiver bakteriologischer Untersuchungsbefunde der Milch mit fakultativ euterpathogenen Erregern vom Versuch ausgeschlossen, wenn das verwendete Viertel betroffen war (LIND et al., 2015).

**Tabelle 2: Spendertiere Explantmodell**

Tier-Nr.	Rasse	Euterviertel VR	Euterviertel VL	Euterviertel HR	Euterviertel HL	Verwendung
1	FV	Z: 315.000 /ml BU: - Tupfer BU: -	Z: 439.000/ml BU: -	Z:3.3696.000/ml BU: -	Z: 5.128.000/ml BU: -	WST-Test O2-Versuch
2	SB	Z: 31.000/ml BU: -	Z: 15.000/ml BU: - Tupfer BU: -	Z: 34.000/ml BU: -	Z: 27.000/ml BU: -	WST-Test O2-Versuch
3	SB	Z: 2.536.000/ml BU: + Mischkultur	Z: 320.000/ml BU: -	Z: 196.000/ml BU: - Tupfer BU: -	Z: 2.864.000/ml BU: Mischkultur	WST-Test O2-Versuch
4	SB	7Z: 980.000/ml BU: + Strept. spp.	Z: 935.000/ml BU: + Strept spp.	Z: 338.000/ml BU: - Tupfer BU: -	Viertel atrophiert	Ch. -assay PCR
5	BV	Z: 155.000/ml BU: -	Z: 161.000/ml BU: -	Z: 376.000/ml BU: -	Z: 98.000/ml BU: -	Ch. -assay PCR
6	BV	Z: 54.000/ml BU: -	Z: 25.000/ml BU: - Tupfer BU:-	Z: 84.000/ml BU: -	Z: 99.000/ml BU: -	Ch. -assay PCR
7	FV	Z: 1.048.000/ml BU: + KNS	Z: 1.855.000/ml BU: + KNS	Z: 87.000/ml BU: -	Z: 80.000/ml BU: - Tupfer BU: Mischkultur, Ko- tamination	Ch. -assay PCR
8	BV	Z: 396.000/ml BU: -	Z: 349.000/ml BU: -	Z: 204.000/ml BU: - Tupfer BU: -	Z:445.000/ml BU: -	Ch. -assay PCR
9	BV	Z: 471.000/ml BU: -	Z: 481.000/ml BU: -	Z: 255.000/ml BU: -	Z: 108.000/ml BU: - Tupfer BU: -	Ch. -assay PCR
10	SB	Z: 125.000/ml BU: -	Z: 190.000/ml BU: -	Z: 70.000/ml BU: - Tupfer BU: -	Z: 162.000/ml BU: + Staph. spp.	Ch. -assay PCR
11	FV	Z: 122.000/ml BU: - Tupfer BU:-	Z: 187.000/ml BU: -	Z: 155.000/ml BU: -	Z: 255.000/ml BU: -	WST-Test Hauptversuch
13	FV	Z: 872.000/ml BU: -	Z: 159.000/ml BU: - Tupfer BU: -	Z: 218.000/ml BU: -	Z: 168.000/ml BU: -	Ch. -assay PCR
14	SB	Z: 81.000/ml BU: -	Z: 108.000/ml BU: -	Z: 73.000/ml BU: - Tupfer BU: -	Z: 174.000/ml BU: -	Ch. -assay PCR
15	RB	Z: 126.000/ml BU: + KNS	Z: 111.000/ml BU: + KNS	Z: 109.000/ml BU: - Tupfer BU: -	Z: 435.000/ml BU: + KNS	Ch. -assay PCR WST-Test Hauptversuch
16	FV	Z: 159.000/ml BU: -	Z: 189.000/ml BU: -	Z: 40.000/ml BU: - Tupfer BU: -	Z: 249.000/ml BU: -	Ch. -assay PCR
21	FV	Z: 61.000/ml BU: -	Z: 147.000/ml BU: -	Z: 46.000/ml BU: - Tupfer BU: -	Z: 61.000/ml BU: -	Ch. -assay PCR WST-Test

grau hinterlegte Felder = für weitere Untersuchungen beprobte Euterviertel, BV = Braunvieh, FV = Fleckvieh, RB = Rotbunt, SB = Schwarzbunt, VR = vorne rechts, VL = vorne links, HR = hinten rechts, HL = hinten links, Z = Zellzahl, BU = bakteriologische Untersuchung, KNS = Koagulase negative Staphyokokken, Staph. spp. = Staphylokokkus Spezies, Strept. spp. = Streptokokkus Spezies, Ch. -assay = Chemotaxisassay, PCR = Polymerasekettenreaktion

## 2.8. Versuchstiere für den Chemotaxisassay

Für die Gewinnung benötigter neutrophiler Granulozyten wurde Rindern einer Versuchstiergruppe aus Laufstallhaltung am Lehr- und Versuchsgut Oberschleißheim der Ludwig-Maximilians-Universität regelmäßig venöses Blut entnommen (s. III.3.3.1). Durch die Regierung von Oberbayern wurde im Rahmen des Tierversuchsantrags Nr.: ROB-55.2-2532.Vet\_03-20-50 „Gewinnung von Blut beim Rind zu wissenschaftlichen/diagnostischen Zwecken“ eine Blutentnahme im Mindestabstand von drei Tagen und von < 1 % des Körpergewichts genehmigt. Für die Untersuchung der aliquotierten Überstände mittels Chemotaxisassay (s. III.3.3.3) wurden jeweils drei trockenstehende, allgemeingesunde Kühe aus einer Kreuzungsherde der Rassen Fleckvieh und Holstein verwendet. Die aseptische Blutentnahme erfolgte höchstens zwei Mal wöchentlich pro Kuh nach Ausscheren und alkoholischer Desinfektion der Einstichstelle an der *Vena jugularis* (*V. jugularis*) unter ständiger Kontrolle des weißen und des roten Blutbildes durch den Hämatologie-Analysator HM5 (s. III.1.3).

## 3. Methoden

### 3.1. Time-Kill-Assay

Um den Einfluss von ausgewählten antimikrobiellen Peptiden (AMP) auf die Entwicklung der euterpathogenen Erreger *Escherichia coli* 1303 (*E. coli*) (s. III.2.1), *Staphylococcus aureus* 1027 (*S. aureus*) (s. III.2.1) und *Streptococcus uberis* 140J (*Sc. uberis*) (s. III.2.1) zu untersuchen, wurde stündlich eine photometrische Messung der Wachstumskinetik durchgeführt.

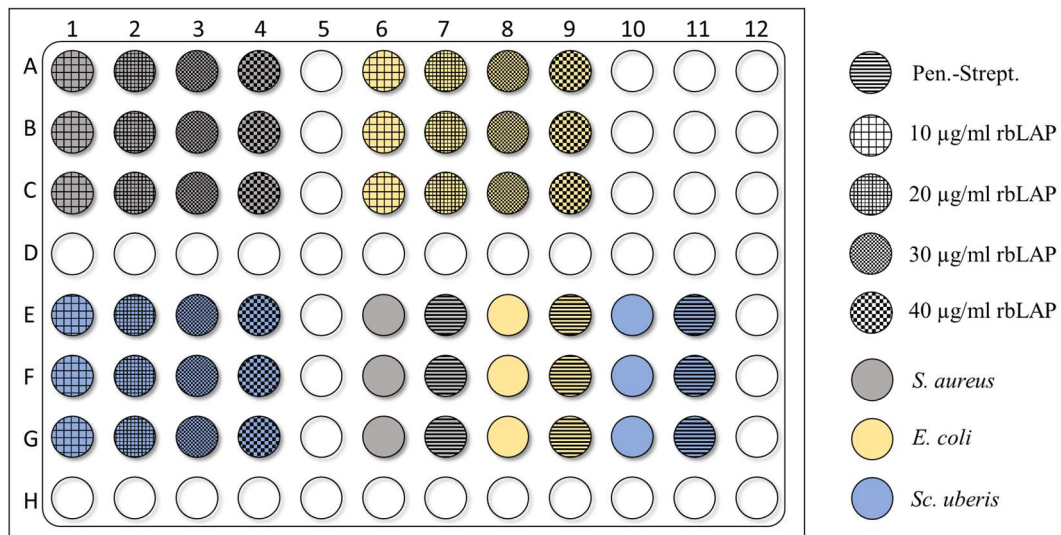
#### 3.1.1. Vorbereitung der Bakteriensuspensionen

Die Bakterienstämme *E. coli*, *S. aureus* und *Sc. uberis* wurden jeweils bei – 20°C auf Cryoballs (Mikrobank-System „Cryobank™“) bis zur Verwendung gelagert. Zur Anreicherung wurde der Cryoball mit anhaftenden *E. coli* mit einer sterilen Kanüle auf einen Kristallviolett-Galle-Lactose-Agar (VRB) Agar gebracht und mit einer abgeflamnten Öse ausgestrichen, während *S. aureus* und *Sc. uberis* in gleicher Weise auf einem Columbia-Schafblut (CSB) Agar ausgebracht wurden. Die Agarplatten wurden bei 37°C über 24 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden je einige Kolonien der Bakterienstämme mit einer sterilen Öse jeweils in 10 ml des Flüssigmediums Luria/Miller (LB) überführt, bei 2500 rpm auf dem Kreisschüttler vermischt und auf einer Rüttelplatte mit 90 rpm bei 37°C über 18 h

im Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurden nach gründlichem Rütteln der Bakteriensuspensionen jeweils 300 µl im Doppelansatz in einer 96-Well-Platte mit flachem Boden im Photometer bei 600 nm gemessen. Um nach 1,5 h Inkubationszeit eine Bakteriensuspension mit einer optischen Dichte (OD) von 0,02 zu erhalten, wurde diese im Photometer gemessen und mit LB-Medium wie gewünscht verdünnt. Anschließend wurde sie auf dem Kreisschüttler vermischt und wiederum auf einer Rüttelplatte mit 90 rpm bei 37°C über 1,5 h im Brutschrank zwischen-inkubiert.

### **3.1.2. Plattenprotokoll und verwendete antimikrobielle Peptide**

Auf eine 96-Well-Platte wurden jeweils im 3-fach-Ansatz 20 µl der zwischen-inkubierten Bakteriensuspension zu einem Ansatz aus LB-Medium und der jeweiligen Verdünnungsstufe des antimikrobiellen Peptids pipettiert. Das Gesamtvolumen pro Well betrug hierbei jeweils 300 µl. Als Positivkontrolle wurde jeweils die Wachstumskurve der Bakteriensuspension ohne Zusätze und als Negativkontrolle das Wachstum der Bakterienkolonie mit dem Zusatz von jeweils 5 µl/Well Penicillin-Streptomycin (s. III.2.1) mitgeführt. Die Platte wurde bei 37°C über 6,5 h im Photometer (s. III.1.1) inkubiert und es wurde stündlich eine Messung nach vorherigem Schütteln bei einer Wellenlänge von 600 nm durchgeführt. Um Kontaminationen auszuschließen wurden die Bakteriensuspensionen nach der Inkubation regelmäßig ausplattiert.



**Abbildung 1: Bsp. für das Plattenlayout eines Time-Kill-Assays**

*Pen.-Strept.*: Penicillin- Streptomycin, *rbLAP* = rekombinantes bovines linguales antimikrobielles Peptid

Verwendet wurden dabei die S100-Proteine rekombinantes bovines S100A9 (rbS100A9), rekombinantes bovines S100A12 (rbS100A12) und rekombinantes humanes S100A8/A9 (rhS100A8/A9), die  $\beta$ -Defensine rekombinantes bovines Beta-Defensin-1 (rbDEFB1), rekombinantes bubalines linguales antimikrobielles Peptid (rbLAP) und rekombinantes bovines linguales antimikrobielles Peptid (rbLAP) das CC-Chemokin rekombinantes bovines CCL20 (rbCCL20) und das Enzym rekombinante humane Antileukoproteinase (rhSLPI) (s. III.2.5.1), in folgenden Verdünnungen:

**Tabelle 3: Übersicht verwendete AMP und Konzentrationen**

Dosierung in µg/ml	rbS100A9	rhS100A8/A9	rbS100A12	rbbLAP	rbLAP	rhSLPI	rbCCL20	rbDEFB1 ( <i>S. aureus</i> )
5	x (n=9)						x ( <i>Sc. uberis</i> , n=9)	x (n=8)
6,5							x ( <i>Sc. uberis</i> , n=9)	
10	x (n=9)	x (n=9)	x (n=9)		x (n=9)		x (n=9)	x (n=9)
13,33	x (n=9)							
20	x (n=9)	x (n=9)	x (n=9)	x ( <i>Sc. uberis</i> n=6) ( <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> n=9)	x (n=9)	x (n=9)	x ( <i>E. coli</i> & <i>S. aureus</i> , n=9)	
30			x (n=9)	x (n=9)	x (n=9)	x (n=9)		
33,5							x ( <i>S. aureus</i> , n=9)	
40		x (n=9)	x (n=9)	x (n=9)	x (n=9)	x (n=9)		

*n* = Anzahl

### 3.2. Explant-Modell

Anhand der Stimulation von Explants der Zitzenschleimhaut und des Euterparenchyms mit Lipopolysacchariden (LPS) und Restimulation mit hitzeinaktivierten Partikeln von *E. coli* oder *S. aureus* sollte die Induzierbarkeit einer Endotoxintoleranz *in vitro* untersucht werden. Das verwendete Explant-Modell wurde bereits in ähnlicher Weise in vorangegangenen Forschungsarbeiten (LIND, 2011; MACÍAS LUACES, 2019) verwendet.

#### 3.2.1. Herstellung hitzeinaktivierter *E. coli* und *S. aureus*

Das Verfahren erfolgte in Anlehnung an KRENITZ (2018). Die beiden Bakterienstämme *E. coli* 1303 und *S. aureus* 1027 wurden auf Agarplatten kultiviert (s. III.3.1.1). Nach 24 h wurden jeweils wenige Bakterienkolonien mit einer abgeflammtten Öse in je 10 ml Brain Heart Infusion (BHI) überführt, mit dem Kreischüttler vermischt und für 6 h bei 37°C unter ständigem Schütteln mit 110 rpm inkubiert. Anschließend wurden die Bakteriensuspensionen gerüttelt und je 100 µL in 9,9 ml Tryptic Soy Broth (TSB) pipettiert, welche wiederum gerüttelt und für 18 h bei 37°C unter ständigem Schütteln inkubiert wurde. Durch Vorlegen von jeweils 9 ml steriler 0,9 %iger Natriumchloridlösung (NaCl) in Reagenzgläser wurde mit der Zellsuspension in Zehnerschritten eine Verdünnungsreihe bis zur Stufe 10<sup>-7</sup> angelegt. Von dieser wurden die Verdünnungsstufen 10<sup>-5</sup> bis 10<sup>-7</sup> mit 5 bis 10

sterilen Glasperlen gleichmäßig ausplattiert, wobei *E. coli* wieder auf VRB und *S. aureus* auf CSB Agar ausplattiert wurde. Es wurden pro Verdünnungsstufe jeweils Triplikate angefertigt und für 24 h bei 37°C inkubiert. Ausgewertet wurden nur Platten auf denen mindestens 10, aber höchstens 300 Bakterienkolonien vorlagen. Zur Berechnung der Koloniebildenden Einheiten (KBE) wurde folgende Formel verwendet:

$$\frac{KBE}{ml} = \frac{\Sigma c}{Vx[(n1)+(n2 \times 0,1)]} \times d$$

$\Sigma c$  = Summe aller Kolonien von 2 aufeinander folgenden Verdünnungen,  $V$  = (Volumen Probe in ml),  
 $n1$  = Anzahl Platten niedrige Verdünnung,  $n2$  = Anzahl Platten höhere Verdünnung,  $d$  = Verdünnungsfaktor der niedrigen Verdünnung

Nach der dritten Wiederholung konnte von einer Reproduzierbarkeit der KBE ausgegangen werden. Die Bakterien wurden im Wasserbad für 120 min bei 60°C hitzeinaktiviert und unter der sterilen Werkbank mit sterilem PBS (s. III.2.5.2) auf die gewünschte Anzahl von  $1 \times 10^8$  Bakterien/ml eingestellt. Bis zum Gebrauch wurden sie in Aliquots von 15 ml bei  $-20^\circ\text{C}$  eingefroren.

### 3.2.2. Vorbereitung der Explantgewinnung

Am Tag der Explantgewinnung wurden die Wells der benötigten 24-Well Platten mit je 1 ml Eutermedium für 1 h bei 37°C, 15 % O<sub>2</sub> (Sauerstoff) und 5 % CO<sub>2</sub> (Kohlendioxid) vorinkubiert. Anschließend wurden sie sofort auf 4°C im Kühlschrank abgekühlt. Bei Verdacht auf Kontamination durch Trübung des Mediums wurde dieses sofort verworfen. Für den Transport der Explants wurden je 30 ml steriles PBS unter der Sterilwerkbank abgefüllt und auf Eis gestellt.

### 3.2.3. Auswahl der Spendertiere

Die Entnahme der Gewebeproben in Form von Explants fand im Schlachthof A. Moksel GmbH der Vion Food Group in 86807 Buchloe statt. Auf Grund restriktiver Bestimmungen bezüglich des Personenverkehrs am Schlachthof musste die Untersuchung am lebenden Tier im Gegensatz zur früheren Durchführung dieser Methode entfallen. Direkt nach der Schlachtung wurden die Tiere adspektorisch auf Verletzungen und andere Krankheitshinweise, wie Abweichungen vom physiologischen BCS (Body Condition Score) oder Umfangsvermehrungen untersucht. Es wurden, soweit möglich, symmetrische, oberflächlich unauffällige Euter adspektorisch gesunder Kühe ausgewählt und durch Schlachthofmitarbeiter, ohne das Parenchym zu verletzen, abgetrennt und in eine saubere Kunststoffkiste gelegt. Zur

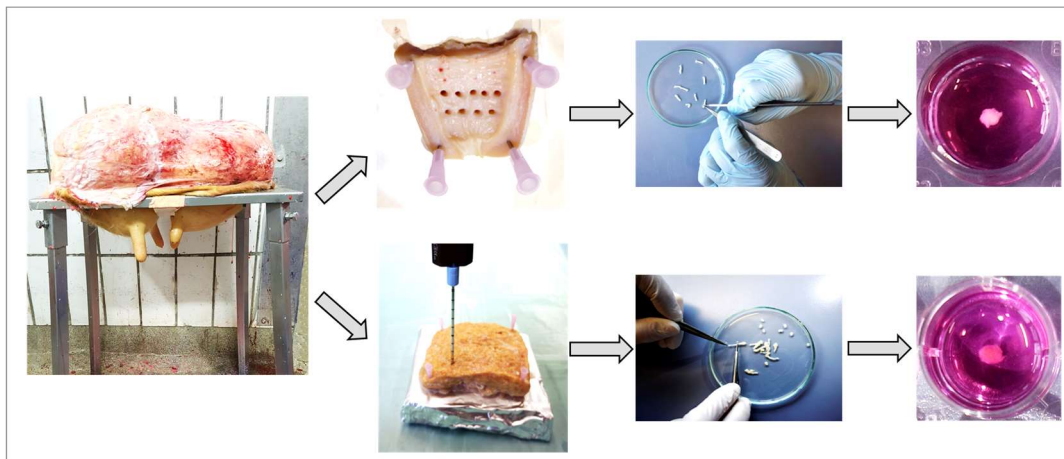


weiteren Vorauswahl wurden die Euter palpatorisch auf Veränderungen im Gewebe untersucht. Im Anschluss wurden die Euter in einer Kiste mit Leitungswasser und Papiertüchern gereinigt und mit den Zitzen nach unten auf einen Eutertisch als Vorrichtung zur Untersuchung verbracht. Die Zitzen wurden gründlich mit 70 %igem Ethanol desinfiziert und zunächst ein CMT (California Mastitis Test) durchgeführt. Tiere mit Eutervierteln mit negativen (-) oder schwach positiven (+) Ergebnissen wurden weiter verwendet, während Tiere mit deutlich positiven (++) oder stark positiven (+++) Ergebnissen sofort aussortiert wurden (ROSENBERGER, 1990). Anschließend wurde eine Milchprobe zur bakteriologischen Untersuchung aseptisch entnommen und auf Eis gestellt. Die Zellzahl wurde für jedes Viertel einzeln mit dem Zellzahlmessgerät „DeLaval DCC“ bestimmt und das Viertel mit der niedrigsten Zellzahl ausgewählt. Als Richtwert für die maximale Zellzahl des Spenderviertels wurden 500.000 Zellen/ml festgelegt. Im Labor der Klinik für Wiederkäuer, LMU München wurden die Milchproben anschließend bakteriologisch auf Mastitis-Erreger untersucht. Bei einem positiven Befund des untersuchten Euterviertels mit euterpathogenen Erregern wurde das gewonnene Gewebe nicht weiterverwendet.

#### **3.2.4. Gewinnung der Explants**

Nach der Vorauswahl wurde das Euter wieder aus dem Eutertisch gehoben und mit den Zitzen nach oben gelagert. Das ausgewählte Euterviertel wurde gereinigt und mit 70 %igem Ethanol desinfiziert. Mit einer sterilen Skalpellklinge wurde die Zitze an der Zitzenbasis abgesetzt und auf eine mit steriler Alufolie umwickelte Styroporunterlage gelegt. Zunächst wurde die Haut mit einem Längsschnitt mit einer sterilen Skalpellklinge aufgeschnitten und anschließend der Zitzenkanal vorsichtig eröffnet, ohne die gegenüberliegende Schleimhaut zu verletzen. Die Schnittkanten wurden mit vier G20 Kanülen auf der Styroporunterlage befestigt. Zunächst wurde von der Schleimhaut nahe der Zitzenbasis ein steriler Tupfer genommen, der in Amies Agar transportiert wurde. Mit der Biopsiestanze „BIP-EVOCORE®“ wurden mit sterilen Biopsienadeln mit einem Durchmesser von 2,76 mm die Biopate mit einer Zylinderoberfläche von 5,89 mm<sup>2</sup> aus der Zitzenzisterne entnommen und mit einer sterilen Pinzette in 50 ml steriles PBS überführt. Anschließend wurde die Haut des Euters mit einer sterilen Skalpellklinge entfernt und nach dem Wechsel der Klinge ein ca. 10 cm x 10 cm x 5 cm großes Gewebestück herauspräpariert. Die Gewebeentnahme erfolgte analog zur Zitzenzisterne. Zum Transport wurden

die Gefäße auf Eis in einer Styroporbox aufbewahrt. Um Explants vergleichbarer Größe zu erhalten, wurden die Bioptate im Labor unter einer sterilen Arbeitswerkbank (s. III.1.2) weiterverarbeitet. Die Bioptate wurden mit einem sterilen Skalpell auf eine Länge von 2 mm gekürzt. Es wurde beim Euterparenchym darauf geachtet, bindegewebige Anteile auszuschließen, um somit mehrheitlich funktionelle Drüsenzellen für die Explants zu erhalten.



**Abbildung 2: Ablauf Explantentnahme in ZZ und EP und Weiterverarbeitung**

*Das Euter wurde auf dem Eutertisch für die Milchprobenentnahme platziert. Anschließend wurden die Zitze und das Euterparenchym aus dem ausgewählten Viertel herausgeschnitten. Auf einer Styroporunterlage mit autoklavierter Alufolie wurden mit der Biopsiestanze Explants herausgestanzt, die nach dem Transport in sterilem PBS im Labor mit dem Skalpell auf die gewünschte Länge präpariert und sofort in Eutermedium überführt.*

### 3.2.5. Inkubation der Explants

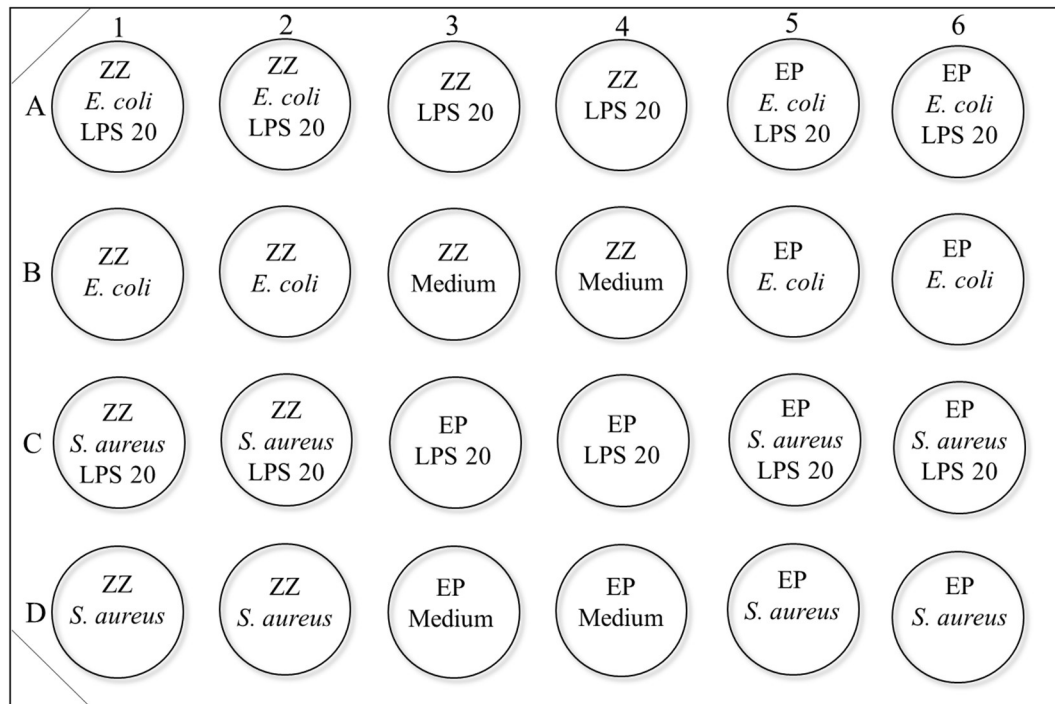
Die fertig präparierten Explants wurden sofort in die einzelnen mit 1 ml Eutermedium gefüllten Wells der vorbereiteten 24-Well-Platten überführt. Anschließend wurden diese zunächst für 1 h im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt. Nach Ablauf der Zeit wurde das Medium durch frisches Eutermedium ersetzt und die Zusätze laut Protokoll (vgl. Tabelle 4: Protokoll Explantstimulation) hinzupipettiert. Die 24-Well-Platte wurde nun für 5 h im Brutschrank inkubiert (Inkubationsphase I). Danach wurde der Überstand (Eutermedium jeweils mit oder ohne Zusätze) jedes einzelnen Wells durch frisches Eutermedium ausgetauscht und weitere 12 h inkubiert (Inkubationsphase II). Es folgte ein weiterer Wechsel des Mediums und die Zugabe der vorgesehenen Zusätze mit einer Inkubationszeit von 12 h (Inkubationsphase III). Die gesamte Inkubation erfolgte jeweils bei 37°C, 5,5 % O<sub>2</sub> und 5 % CO<sub>2</sub>. Pro Lokalisation wurden neun verschiedene Doppelansätze pipettiert. Nach der Kühlphase wurden zu sechs der Doppelansätze für die Inkubationsphase I

1  $\mu\text{l}$  LPS oder 20  $\mu\text{l}$  LPS (s. III.2.5.2) zugesetzt. Davon wurde zu zwei der Doppelansätze in der Inkubationsphase III Eutermedium pipettiert und zu den restlichen vier Ansätzen je  $10^8$  KBE/ml *E. coli* oder *S. aureus*, so dass jede Kombination der Zusätze vorhanden war. Des Weiteren wurde zu zwei der Doppelansätze in der Inkubationsphase III *E. coli* oder *S. aureus* pipettiert, während hier in Inkubationsphase I nur Eutermedium verwendet worden war. Als Negativkontrolle wurde ein Doppelansatz mit Eutermedium für jeden Wechsel verwendet. Nach der Inkubation wurden die Explants einzeln in jeweils 450  $\mu\text{l}$  RNALater fixiert und in Kryoröhrchen für 22 h im Kühlschrank aufbewahrt, um die komplette Durchtränkung des Gewebes zu gewährleisten. Zur weiteren Aufbewahrung bis zur RNA-Extraktion wurden die Explants bei  $-80^\circ\text{C}$  kryokonserviert. Das Medium mit den Zusätzen und Zellprodukten der Explants wurde als Überstand jeweils bis zur Weiterverarbeitung bei  $-20^\circ\text{C}$  eingefroren.

**Tabelle 4: Protokoll Explantstimulation**

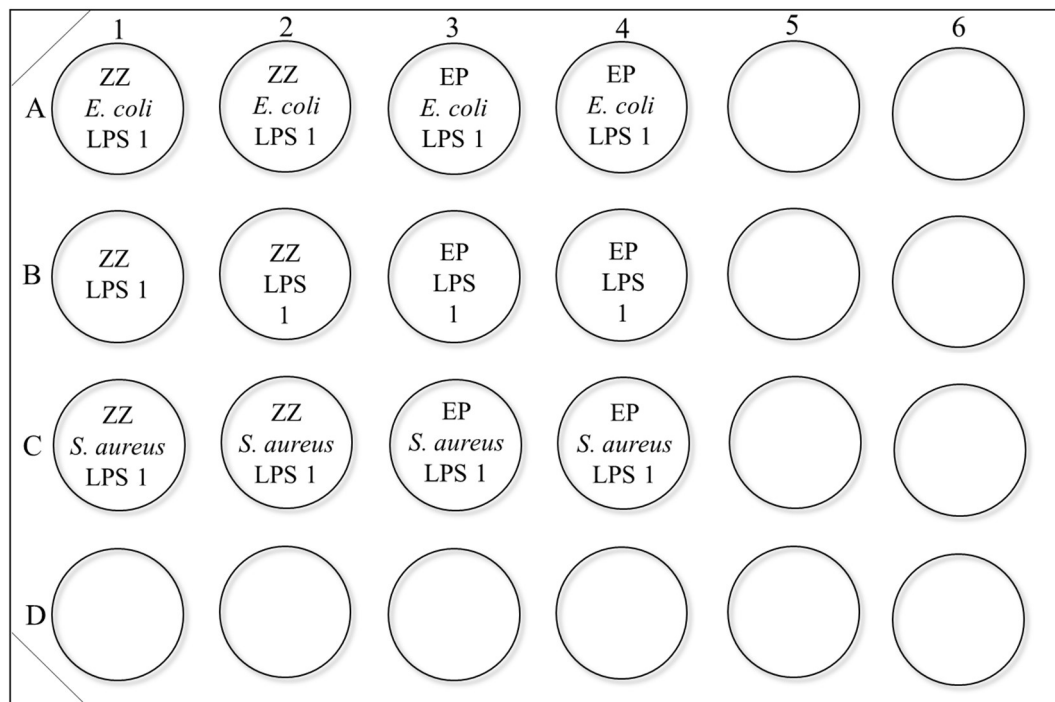
	Kühlphase (1 h)	Inkubationsphase I (5 h)	Inkubationsphase II (12 h)	Inkubationsphase III (12 h)	Gesamtinkubationszeit (30 h)
Explant 1	Medium	Medium	Medium	Medium	Explant fixieren
Explant 2	Medium	Medium	Medium	Hitzeinaktivierte <i>E. coli</i>	Explant fixieren
Explant 3	Medium	Medium	Medium	Hitzeinaktivierte <i>S. aureus</i>	Explant fixieren
Explant 4	Medium	LPS 1 $\mu\text{g/ml}$ + Medium	Medium	Medium	Explant fixieren
Explant 5	Medium	LPS 20 $\mu\text{g/ml}$ + Medium	Medium	Medium	Explant fixieren
Explant 6	Medium	LPS 1 $\mu\text{g/ml}$ + Medium	Medium	Hitzeinaktivierte <i>E. coli</i>	Explant fixieren
Explant 7	Medium	LPS 1 $\mu\text{g/ml}$ + Medium	Medium	Hitzeinaktivierte <i>S. aureus</i>	Explant fixieren
Explant 8	Medium	LPS 20 $\mu\text{g/ml}$ + Medium	Medium	Hitzeinaktivierte <i>E. coli</i>	Explant fixieren
Explant 9	Medium	LPS 20 $\mu\text{g/ml}$ + Medium	Medium	Hitzeinaktivierte <i>S. aureus</i>	Explant fixieren

*Explant 1 -9 = identische Bioplate vom selben Tier und gleicher Lokalisation, LPS = Lipopolysaccharid*



**Abbildung 3: Plattenlayout Explantstimulation Platte 1 pro Tier**

Layout der Explants auf der 24-Well-Platte, 2 Platten pro Tier, ZZ= Zitenzisterne, EP= Euterparenchym, LPS 20= LPS 20  $\mu\text{g/ml}$ , LPS 1= 1  $\mu\text{g/ml}$  LPS



**Abbildung 4: Plattenlayout Explantstimulation Platte 2 pro Tier**

Layout der Explants auf der 24-Well-Platte, 2 Platten pro Tier, ZZ = Zitenzisterne, EP = Euterparenchym, LPS 20 = LPS 20  $\mu\text{g/ml}$ , LPS 1 = 1  $\mu\text{g/ml}$  LPS

### 3.2.6. Stoffwechselaktivität der Explants

Um Rückschlüsse auf die Vitalität der Explants zu erhalten wurden sie auf ihre Stoffwechselaktivität untersucht. Diese wurde mittels eines WST-8-Tests (water-soluble tetrazolium dye-8, wasserlösliche Tetrazoliumfärbung-8, WST-8) in parallelen Testansätzen an den Explants dreier Kühe überprüft. Hierbei wird 1-Methoxyphenazinmethosulfat (1-Methoxy-PMS) extrazellulär zu WST-8 Formazan reduziert, welches photometrisch erfasst und somit quantifiziert werden kann. Da die Synthese von 1-Methoxy-PMS auf die Anwesenheit von NADH (reduzierte Form von Nicotinamidadenindinukleotid) und NADPH (reduzierte Form von Nicotinamidadenindinukleotidphosphat) angewiesen ist, welches nur mit Hilfe einer Dehydrogenase hergestellt wird, kann eine direkte Aussage zur Zellvitalität getroffen werden. Unter Einhaltung des Untersuchungsprotokolls mit den jeweiligen Zusätzen (s. III.3.2.5) wurden in jedes Well zu Stunde 0 und Stunde 27 100 µl WST-8 hinzupipettiert und für weitere drei Stunden mitinkubiert. Anschließend wurden jeweils 280 µl des Mediums auf einer 96-Well-Platte mit dem Photometer nach Herstellerangaben bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen. Als Referenzwert wurde jeweils der Median aller gemessenen Werte von Stunde 3 der Explants des Euterparenchyms und der Zitzenzisterne nach Bestätigung einer Normalverteilung verwendet. Er galt als 100 % stoffwechselaktiv. Bei einer Stoffwechselaktivität von über 50 % kann davon ausgegangen werden, dass die Explants vital sind, während sie zwischen 30 % und 40 % leicht geschädigt sind. Bei Werten unter 30 % wird davon ausgegangen, dass die Explants als nicht mehr vital einzustufen sind (MACÍAS LUACES, 2019). Zusätzlich wurde für jede Platte eine Negativkontrolle als Referenzwert mitgeführt, die sich aus Medium und WST-8 ohne Explant zusammensetzte. Im Vorfeld wurde ein Versuch mit angepasster Sauerstoffkonzentration durchgeführt. Es wurden hierbei mehrere Replikate der Ansätze LPS 20 µg/ml mit *E. coli* und Medium von drei Kühen jeweils vergleichend bei 5,5 % und 16% Sauerstoff inkubiert. Für die Absenkung des Sauerstoffs auf eine Konzentration von 5,5 % wurde Stickstoff verwendet. Zur Auswertung der Stoffwechselaktivität wurde nach oben beschriebenem Protokoll WST-8 hinzupipettiert, das entstandene Formazan im Photometer gemessen und verglichen.

### 3.3. Chemotaxisassay

Mit Hilfe eines Chemotaxisassays wurden die bei der Explant-Kultivierung gesammelten Überstände (s. III.3.2.5) anhand der Anzahl der durch eine Membran

gewanderten polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) auf das Vorhandensein chemotaktisch wirksamer Stoffe funktionell untersucht. Die Erfassung gewanderter PMN erfolgte durchflusszytometrisch.

### 3.3.1. Entnahme von venösem Blut

Die ausgewählte Kuh (s. III.2.8) wurde im Fressgitter gefangen und mit einem Halfterstrick fixiert. Die Haut an der Einstichstelle wurde mit 70 %igem Ethanol desinfiziert und die *V. jugularis* einer Halsseite angestaut. Das venöse Blut wurde mit Handschuhen mit Hilfe einer sterilen Kanüle (G20) und 10 ml Vaccutainer EDTA Röhren entnommen. Es wurden jeweils 60 ml Blut entnommen.

### 3.3.2. Isolierung neutrophiler Granulozyten aus dem Blut

Die benötigten PMN wurden durch Dichtegradientenzentrifugation aus Vollblut gewonnen. Dazu wurde im Labor das am selben Tag von je drei Kühen gewonnene Blut (s. III.2.8) gepoolt und zu je 10 ml auf 4 x 50 ml Zentrifugenröhren aufgeteilt. Das Vollblut wurde jeweils durch Zugabe von 15 ml PBS im Verhältnis 2:3 verdünnt. Es wurden 15 ml Pancoll animal mit einer Dichte von 1.077 g/ml in 50 ml Zentrifugenröhren vorgelegt und vorsichtig mit der PBS-Vollblutmischung mit Hilfe eines Pipettierhelfers ohne Phasenvermischung überschichtet. Zur Auftrennung der Einzelbestandteile des Blutes wurde es bei 1300 x g bei 10°C für 30 min ohne Bremse zentrifugiert. Im Anschluss wurden mit der Pipette die Plasmaphase mit den Thrombozyten, die Interphase mit Monozyten und Lymphozyten und das Pancoll animal abpipettiert, bis nur noch das Pellet mit Erythrozyten und Granulozyten im Röhren verblieb (BROSSERON et al., 2012). Zur Isolierung der Granulozyten wurden die Erythrozyten mittels hypotoner Lyse durch Zugabe von 20 ml *Aqua dest.* mit einer Einwirkzeit von 20 s unter ständigem Schwenken lysiert. Anschließend wurde zur Pufferung sofort doppelt konzentriertes PBS (PBS x 2) hinzu pipettiert und mit 800 x g bei 10°C für 8 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgekippt und der Vorgang der hypotonen Lyse so oft wiederholt bis optisch eine vollständige Lyse der Erythrozyten stattgefunden hatte. Zur Reinigung der PMN wurden diese mit 20 ml PBS verdünnt, danach bei 800 x g bei 10°C für 8 min zentrifugiert und der Überstand abgekippt. Nach Zugabe von jeweils 1 ml Eutermedium wurde die Gesamtzellzahl mit dem Hämatologie-Analysator ermittelt, mit Eutermedium auf die gewünschte Zellzahl von  $5 \cdot 10^6$ /ml verdünnt und sofort weiterverwendet.

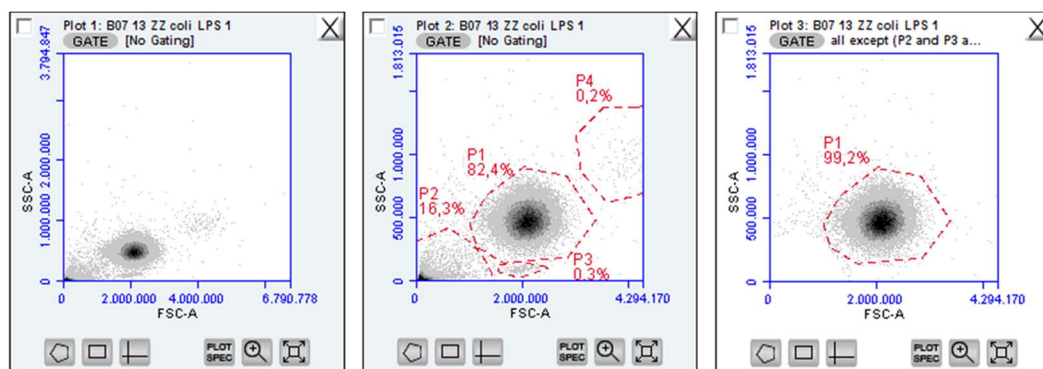
### 3.3.3. Durchführung des Chemotaxisassays

Die gesammelten Überstände der Explants wurden vor der Verwendung aufgetaut und die Doppelansätze wurden jeweils gepoolt. Zur Analyse der gesammelten Überstände wurden 10-Well-Transmigrationskammern verwendet. Als Positivkontrolle wurden je 100  $\mu$ l IL-8 (s. III.2.5.3) mit 900  $\mu$ l Eutermium in einem Verhältnis von 1:10 verdünnt, um eine IL-8-Konzentration von 100 ng/ml erhalten. Die Wells des Kammerbodens wurden jeweils mit 300  $\mu$ L der Probe bzw. der Positivkontrolle (100 ng/ml IL-8) und der Negativkontrolle (Medium) beschickt und mit 60 %igem Percoll unterschichtet, bis ein positiver Flüssigkeitsmeniskus entstand. Die gepoolten Proben wurden jeweils im Doppelansatz angesetzt. Auf den gefüllten Kammerboden wurde vorsichtig eine Polycarbonatmembran (Porengröße: 3  $\mu$ m) zur Abtrennung mit der Polyvinylpyrrolidon (PVP)-behandelten Seite nach unten passgenau aufgelegt, ohne die Flüssigkeiten der einzelnen Wells zu vermischen. Anschließend wurde auf die Kammer jeweils eine Gummimatte und der Deckel der Transmigrationskammer gesetzt und fest verschraubt. In die oberen Vertiefungen wurden nun jeweils 200  $\mu$ L der vorher verdünnten PMN-Zellsuspension auf die Membran pipettiert, wobei darauf geachtet wurde, die Pipettenspitze jedes Mal zu wechseln und keine Luftblasen auf die Membran zu pipettieren. Die fertig beschickte Transmigrationskammer wurde bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und ca. 16 % O<sub>2</sub> inkubiert. Nach 2 h wurden die Kammern wieder aus dem Inkubator entfernt und der Überstand ohne die Membran zu penetrieren abpipettiert. Deckel und Gummimatte wurden von der Kammer abgenommen und jeweils zur weiteren Untersuchung 375  $\mu$ L der Probe zu 125  $\mu$ L Eutermium in ein Rundbodenröhrchen pipettiert.

### 3.3.4. Auswertung und Messprinzip im Durchflusszytometer

Um eine quantitative Aussage über die Anzahl gewanderter PMN im Chemotaxisassay zu machen, wurde eine durchflusszytometrische Messung mit dem Fluoreszenz-Durchflusszytometer Accuri C6 (s. III.1.3) durchgeführt. In diesem Gerät werden die vorhandenen Zellen in der Probe mit Hilfe einer Hüllflüssigkeit (Sheath fluid: *Aqua dest.*) vereinzelt und durch eine Flusszelle transportiert. In dieser werden die Zellen im 90°-Winkel zur Flussrichtung mit einem Laser mit 488 nm Wellenlänge bestrahlt, wobei für die jeweilige Zelle ein charakteristisches Streulicht entsteht, das durch einen Vorwärts- und im 90°-Winkel dazu durch einen Seitendetektor gemessen wird. Die Vorwärtsstreuung (FSC) lässt durch die gemessene Signalstärke einen Rückschluss auf die ungefähre Größe der Zellen zu, während die

Seitwärtsstreuung (SSC) eine grobe Analyse der Oberflächenbeschaffenheit abliefern. Vor der Messung wurden je 375  $\mu\text{l}$  der Probe aus der Chemotaxischamber mit 125  $\mu\text{l}$  Eutermium verdünnt und mit dem Kreisschüttler vermischt, um die für eine genaue Messung erforderliche angepasste Zelldichte zu erlangen. Die Durchflusgeschwindigkeit (Run Limit) wurde auf 66  $\mu\text{l}/\text{min}$  gestellt und es wurden jeweils 100  $\mu\text{l}$  je Probe gemessen. Zur Differenzierung der gewünschten PMN zu anderen enthaltenen Zellen und zur Quantifizierung dieser wurde bei jedem Durchgang ein Backgating durchgeführt.



**Abbildung 5: Messung eines Überstands nach Chemotaxisassay ohne und mit Backgating**

Dargestellt ist eine Messung des Überstands der Zitzenzisterne mit dem Zusatz von LPS 1  $\mu\text{g}$  und *E. coli* nach Chemotaxisassay im Durchflusszytometer. Vorwärtsstreuung und Seitwärtsstreuung sind jeweils gegeneinander aufgetragen. A: Messung ohne Gating, B: Anpassung der Achsen und Abgrenzung der einzelnen Bereiche durch Gates, P1 = PMN, P2 = Detritus, P3 = Lymphozyten, P4 = PMN-Agglomerate; C = Isolierte Darstellung der PMN

Während der Messung im Durchflusszytometer wurden die Proben auf Eis gelagert, um eine stabile Messtemperatur zu garantieren.

### 3.4. Molekularbiologische Untersuchung

Zur Analyse der Zellantwort auf molekularer Ebene wurde die Boten-Ribonukleinsäure (messenger RNA, mRNA) der Explants (s. III.3.2) extrahiert, in komplementäre Desoxyribonukleinsäure (complementary DNA, cDNA) umgeschrieben und diese anhand einer quantitativen real-time PCR (RT-qPCR) amplifiziert und quantifiziert. Durch Messung mit dem Nanophotometer wurde die Menge der vorhandenen cDNA bestimmt und jeweils mit DNase-freiem Wasser auf eine Konzentration von 200 ng/ $\mu\text{l}$  verdünnt.

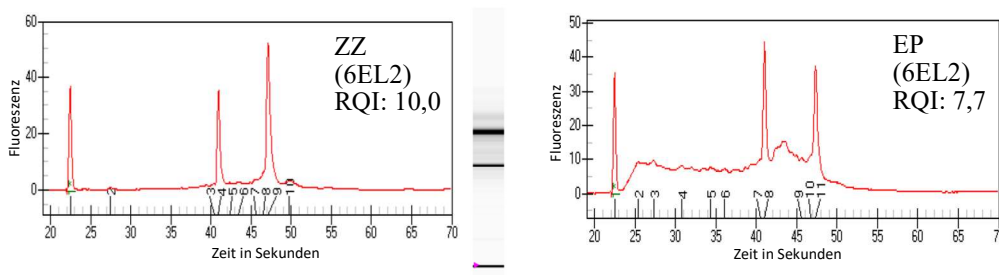


### 3.4.1. mRNA- Isolation

Die in RNA-Later bei  $-80^{\circ}\text{C}$  konservierten Explants wurden unmittelbar nach Entnahme aus dem Gefrierschrank auf Eis gestellt und sofort weiterverarbeitet. Explants gleichen Gewebetyps und gleicher Behandlung wurden gepoolt. Sie wurden jeweils mit einer sterilen spitzen Pinzette in ein LyseTube P, gefüllt mit Keramikbeads und mit  $450\ \mu\text{l}$  Lysepuffer überführt. Zur Freisetzung der mRNA wurden die Explants in der SpeedMill (s. III.1.4) für  $2 \times 2\ \text{min}$  mit einer Pause von  $1\ \text{min}$  zerkleinert und anschließend für  $1\ \text{min}$  bei  $13.000 \times g$  zentrifugiert. Mit Hilfe des Bio&Sell RNA Mini Kits (s. III.2.4) wurde die mRNA der Proben mit erweitertem Herstellerprotokoll isoliert: Der Überstand wurde ohne feste Gewebebestandteile jeweils auf eine Zentrifugationssäule E pipettiert, welche vorhandene Desoxyribonukleinsäure (DNA) bindet und diese somit aus der Probe herausfiltert. Durch Zentrifugation der Säule für  $2\ \text{min}$  bei  $11.000 \times g$  wurde der Überstand in ein  $2,0\ \text{ml}$  Sammeltube überführt. Um die mRNA an die Zentrifugationssäule S zu binden wurde die Probe mit  $400\ \mu\text{l}$   $70\ \%$ igem Ethanol verdünnt, auf diese pipettiert und für  $2\ \text{min}$  bei  $11.000 \times g$  zentrifugiert. Bei allen weiteren Schritten der mRNA-Isolation (bis zur Eluation der mRNA) wurde die Zentrifugationssäule S jeweils nach der Zentrifugation in ein neues Sammeltube gestellt und weiterverarbeitet, während die überschüssige Flüssigkeit verworfen wurde. Reste von DNA wurden durch Zugabe von  $55\ \mu\text{l}$  DNase mit einer Inkubationszeit von  $15\ \text{min}$  entfernt. Zur weiteren Reinigung der mRNA wurden folgende Waschschrte durchgeführt: Zunächst wurden  $500\ \mu\text{l}$  Waschpuffer IT, dann  $700\ \mu\text{l}$  Waschpuffer MT und anschließend  $700\ \mu\text{l}$   $80\ \%$ iges Ethanol zur Probe hinzugefügt, die jeweils durch Zentrifugation für  $1\ \text{min}$  bei  $11.000 \times g$  durch den Filter der Zentrifugationssäule hindurchgedrückt wurden und die mRNA gleichzeitig an der Säule fixierten. Die Säule wurde durch einen  $4\text{-minütigen}$  Zentrifugationsschritt bei  $11.000 \times g$  getrocknet und von Ethanolresten befreit. Zur Eluation der mRNA wurden  $80\ \mu\text{l}$  RNase freies Wasser auf die Säule überführt und nach  $1\ \text{min}$  Inkubationszeit für  $1\ \text{min}$  bei  $11.000 \times g$  zentrifugiert. Anschließend wurden mehrere Waschschrte durchgeführt und die eluierte mRNA wurde bis zur zeitnahen Weiterverarbeitung auf Eis gelagert.

### 3.4.2. Kontrolle der mRNA Qualität

Um ausreichende Qualität der mRNA sicherzustellen wurde jede Probe nach der Isolation durch eine Mikrofluid basierte Elektrophorese mit dem Experion™ RNA StdSens Analysis Kit (s. III.1.4) von Bio-Rad untersucht. Der benötigte RNA-Chip wurde nach Herstellerangaben gefüllt, gedruckt und geschüttelt, bevor er in der Experion Electrophoresis Station untersucht wurde. Durch die Bindung des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR® Green II an die RNA konnte im Anschluss sowohl die Qualität als auch die Quantität dieser digital dargestellt werden. Zur Berechnung dient hierbei ein Algorithmus, der mit dem Verhältnis der prä-S18 und der S18 zur S28 Region der ribosomalen RNA arbeitet. Der berechnete Qualitätswert RNA quality indicator (RQI) wird vom Hersteller von 1 bis 4 als RNA mit sehr niedriger Qualität eingestuft, von 4 bis 7 als RNA mit niedrigerer Qualität und zwischen 7 und 10 als RNA mit hoher Qualität, wobei die reproduzierbare Beschaffenheit der RNA in unterschiedlichen Geweben bei der Einstufung miteinbezogen werden sollte (DENISOV et al., 2008).



**Abbildung 6: Vergleich der RQI-Werte von ZZ und EP mit Hilfe eines Elektropherogramms und eines virtuellen Gelreports**

*EP = Euterparenchym, ZZ = Zitenzisterne, 6EL2 = Kuh 6, E. coli, Lipopolysaccharide 20 µg/ml; 3EEL2 = Kuh 3, Euterparenchym, E. coli, Lipopolysaccharide 20 µg/ml; RQI = RNA quality indicator*

### 3.4.3. cDNA-Synthese

Nach der mRNA-Isolation wurde diese zur weiteren Untersuchung in cDNA nach dem Protokoll von MACÍAS LUACES (2019) umgeschrieben. Pro täglich untersuchter Probenanzahl ( $n = 12$ ) wurde jeweils eine Probe als Negativkontrolle ohne RT (Reverse Transkriptase) pipettiert. Nach der Messung mit dem Nanophotometer wurde die Menge der vorhandenen cDNA bestimmt und jeweils mit DNase-freiem Wasser auf eine Konzentration von 200 ng/µl verdünnt.

#### 3.4.4. Quantitative real-time PCR

Zur Untersuchung der mRNA-Expression der Gene von IL-8, LAP (Linguales antimikrobielles Peptid), Interleukin -1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), Interleukin-6 (IL-6), S100A9 und Tumornekrosefaktor-  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in stimulierten und nicht stimulierten Explants wurde anhand der synthetisierten cDNA mit Hilfe des SensiFAST™ SYBR® No Rox Kits eine RT-qPCR durchgeführt. Zunächst wurden die Proben, die Primer und die Standards für 5 min bei 60°C bei 200 rpm inkubiert, um die cDNA vollständig von der Wand des Probenröhrchens zu lösen. Währenddessen wurde der Mastermix (s. III.2.5.4) unter einer sterilen Werkbank pipettiert, der die jeweils gewünschten Vorwärts- und Rückwärtsprimer (s. III.2.6), die Desoxyribonukleotide (dNTPs), das Enzym DNA-Polymerase und den Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green enthält. Für jeden Versuchsansatz auf einer 384-Well Platte wurde der Standard in den Verdünnungen 10<sup>-2</sup> bis 10<sup>-6</sup> Proben jeweils im Doppelansatz und die Negativkontrolle (NTC) in Form von DNase freiem Wasser mitgeführt. Jede Probe wurde im Doppelansatz pipettiert. Pro Well wurden unter einer anderen sterilen Werkbank je 9  $\mu$ l Mastermix vorgelegt und anschließend je 1  $\mu$ l Probe, Standard oder NTC hinzupipettiert. Die Platten wurden vor der RT-qPCR mit einer Folie abgeklebt und zentrifugiert. Die RT-qPCR fand im Q-Tower mit 2-stufigem Temperaturprotokoll statt: Während die Deckeltemperatur für die komplette Dauer des Durchlaufs auf 110° C fixiert war, wurde im 1. Zyklus durch 2-minütige Inkubation die DNA-Polymerase aktiviert, die die Anlagerung der dNTPs katalysiert. Es folgte jeweils eine 5-sekündige Inkubation bei 95°C (Zyklus 2) zur Denaturierung der Doppelstrang-DNA (dsDNA) in Einzelstrang-DNA (ssDNA), um anschließend für 15 s bei 60°C (Zyklus 3) die Primeranlagerung (Annealing), die SYBR Green-Anlagerung und die Nukleotidanlagerung (Extension) zu ermöglichen. Zyklus 2 und 3 wurden jeweils 39-mal wiederholt, wobei nach jedem Durchgang die Fluoreszenz gemessen wurde. Hierbei wurde die Fluoreszenzintensität und der Cycle Threshold (ct-Wert) dokumentiert, welcher den Zyklus wiedergibt, ab dem die Fluoreszenz der DNA die der Hintergrundfluoreszenz signifikant überschreitet. Wenn dessen Standardabweichung (SD) bei einem Wert von > 1 lag wurde der Ansatz wiederholt. Anhand des zugehörigen Programms wurde durch absolute Quantifizierung die Menge der entstanden DNA in Kopien/ $\mu$ l mit Hilfe der Standardkurve und dem ct-Wert berechnet. Nach der RT-qPCR wurde zur Überprüfung auf übermäßige Dimerbildung durch langsame Erhöhung der Temperatur von 60°C auf 95°C die Schmelzkurve analysiert, welche für jedes Gen spezifisch ist. Die Proben ohne RT (s. III.3.4.3)

wurden als Negativkontrolle ebenfalls mitgeführt. Als weitere Qualitätsmerkmale wurden bei jedem Durchgang außerdem die Effizienz der Standardkurve, die im Bereich 90 – 110 % liegen soll und das Bestimmtheitsmaß ( $R^2$ ), das sich bei  $> 0,985$  befinden soll berechnet. Des Weiteren wurde die für jedes Gen spezifische Schmelztemperatur mit der Schmelztemperatur der amplifizierten cDNA abgeglichen. Sie durfte nicht mehr als  $\pm 1$  °C abweichen. Lag ein Qualitätsmerkmal außerhalb des Referenzbereichs wurde die RT-qPCR wiederholt.

### 3.5. Statistische Auswertung der Daten

Alle Daten wurden mit Microsoft Excel erhoben und mit der Software R Version 4.0.4 statistisch ausgewertet und grafisch aufbereitet. Für den Chemotaxisassay wurde zunächst der Median aller Doppelwerte berechnet und daraus die Prozentzahlen in Bezug auf die jeweilige Positivkontrolle der gemessenen Kammer ermittelt. Die Kopien/ $\mu\text{l}$  der RT-qPCR wurden im Vorfeld logarithmiert, da eine sehr große Streuung der Daten vorlag und diese nicht normalverteilt waren. Für die Auswertung der Stoffwechselaktivität in Prozent wurden die Werte der OD von Stunde 30 auf den Median der OD zu Stunde 3 bezogen. Die statistische Analyse wurde für alle Versuche mit einem linearen gemischten Modell erstellt. In diesem Modell wurden für alle Versuche des Explantmodells die Zusätze und die Gewebe als feste Effekte untersucht, während die Individualität der Tiere als zufällige Effekte mitberücksichtigt wurde. Zunächst wurde eine lineare Regression durchgeführt und das Modell auf Normalverteilung (Shapiro-Wilk-Test), Homogenität (Levene-Test) und Varianzhomogenität (Breusch-Pagan-Test) sowohl über Signifikanzen, als auch optisch überprüft. Wurden diese Voraussetzungen nicht erfüllt, wurde eine robuste lineare Regression ausgeführt. Aus den Daten der robusten linearen Regression wurden anschließend die geschätzten Mittelwerte berechnet (estimated marginal means). Diese wurden durch multiple paarweise Mittelwertvergleiche in Form von Kontrasten auf statistisch signifikante Unterschiede untersucht. Die p-Werte wurden für die multiplen Mittelwertvergleiche mit dem Schnelltest nach Tukey angepasst. Dabei wurden die Signifikanzen durch folgende p-Werte dargestellt:

- $0,05 \leq \text{p-Wert} < 0,1$ : Tendenz
- $0,01 \leq \text{p-Wert} < 0,05$ : signifikantes Ergebnis
- $0,001 \leq \text{p-Wert} < 0,01$ : hoch signifikantes Ergebnis
- $\text{p} < 0,001$ : höchst signifikantes Ergebnis

Der Time Kill Assay wurde grafisch in Form eines Liniendiagramms, bestehend aus den zuvor berechneten geschätzten Mittelwerten dargestellt. Um den Erwartungsbereich abzubilden, in dem sich diese aufhalten, wurden die Konfidenzintervalle mit einem Konfidenzniveau von 95 % hinzugefügt. Zur Darstellung des Chemotaxisassays, der RT-qPCR und der Stoffwechselaktivität wurden Boxplot-Diagramme mit Median, 1. Quartil und 3. Quartil verwendet. Zusätzlich wurden die 95 % Konfidenzintervalle aus dem Modell abgebildet.

Für die Darstellung und die Auswertung der Daten wurden folgende Programme verwendet:

- Microsoft Excel: Speicherung und Sortierung der Rohdaten aller Versuche
- BD Accuri™ C6 Software: Graphische Darstellung der Rohdaten des Chemotaxisassays
- CLARIOstar Software: Graphische Darstellung der Rohdaten des Time-Kill-Assays
- Experion Software: Graphische Darstellung der Rohdaten der mRNA-Isolation
- Analytic Jena Software TOptical, qTOWER: Graphische Darstellung der Rohdaten der RT-qPCR
- R Software: Statistische Auswertung der Daten und grafische Verarbeitung aller Versuchsergebnisse
- Excel: Verarbeitung der Versuchsergebnisse und statistische Auswertung der Daten

## IV. ERGEBNISSE

Die vorliegende Arbeit ist in zwei Hauptteile gegliedert. Zum einen sollte anhand eines Time Kill Assays untersucht werden, ob für die Immunabwehr im Euter des Rindes relevante AMP *in vitro* das Wachstum fakultativ euterpathogener Mastitiserreger beeinflussen. Zum anderen wurde mit Hilfe eines Explant-Modells untersucht, ob die Expression relevanter AMP *in vitro* durch vorherige Stimulation mit LPS nach Restimulation mit *S. aureus* oder *E. coli* heraufreguliert werden. Weiterhin wurde geprüft, ob die erfolgte Restimulation zur Herabregulation der Expression von Entzündungsmediatoren im Sinne einer Endotoxintoleranz führt. Dies wurde zusätzlich funktionell mittels eines Chemotaxisassays untersucht.

### 1. Untersuchungen zum Einfluss rekombinanter antimikrobieller Peptide/Proteine auf das Wachstum ausgewählter Mastitiserreger (Time Kill Assay)

Zur Untersuchung des direkten Einflusses ausgewählter AMP auf das Wachstum häufig vorkommender pathogener Mastitiserreger *in vitro* beim Rind wurde das Bakterienwachstum während der Inkubation durch stündliche Messung der OD über 6 h im Photometer evaluiert (s. III.3.1). Es wurde die Hypothese geprüft, ob die AMP auch *in vitro* dazu in der Lage sind das Wachstum von *E. coli*, *S. aureus* und *Sc. uberis* zu hemmen.

**Tabelle 5: Zunahme der Optischen Dichte (OD<sub>600</sub>) sechs Stunden nach Inkubationsbeginn der eingesetzten Mastitiserreger**

6 h	<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>		<i>Sc. uberis</i>	
	MW OD	SD	MW OD	SD	MW OD	SD
Ohne Zusatz (Positivkontrolle)	0,803	+/- 0,110	0,599	+/- 0,044	0,370	+/- 0,055
Antibiotikum (Negativkontrolle)	0,110	+/- 0,038	0,115	+/- 0,012	0,118	+/- 0,058

MW OD = Mittelwert der Optischen Dichte (OD<sub>600</sub>) aller ausgewerteten Versuche 6 h nach Inkubationsbeginn, SD = Standardabweichung von der Grundgesamtheit

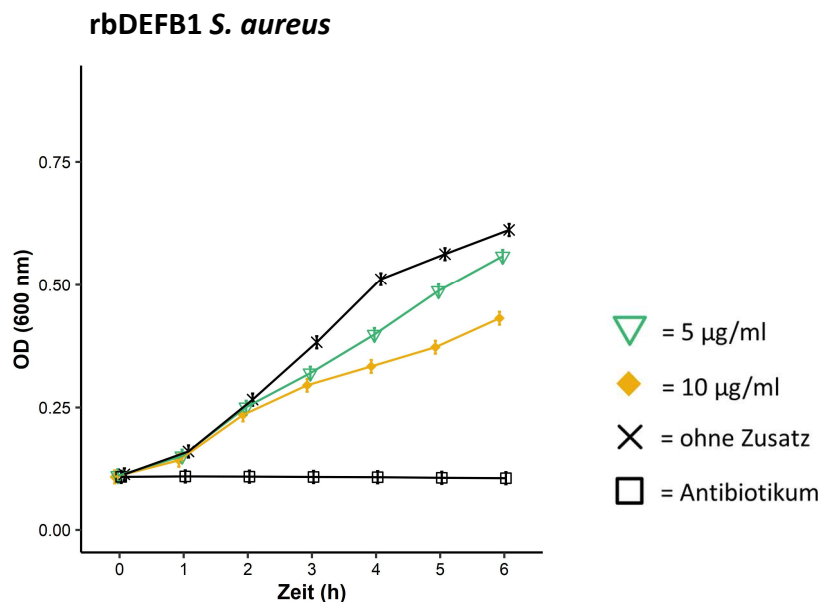
Bei allen Versuchen mit *E. coli* und *S. aureus* war bei der jeweiligen Positivkontrolle (Bakteriensuspension ohne Zusatz) bereits 2 h nach Inkubationsbeginn ein höchst signifikanter ( $p < 0,001$ ) Unterschied zur Negativkontrolle (Bakteriensuspension mit Antibiotikum-Zusatz) messbar. Das Wachstum von *Sc. uberis* übertraf jeweils nach spätestens 3 h signifikant ( $p < 0,05$ ) die OD der Negativkontrolle. Der

Unterschied der einzelnen Stunden zueinander in der Negativkontrolle war bei allen untersuchten Bakterienstämmen jeweils nicht signifikant.

### 1.1. Rekombinantes bovines beta-Defensin-1 (rbDEFB1)

Der Zusatz von rbDEFB1 hatte eine Konzentrations-abhängige Hemmung des Wachstums von *S. aureus* zur Folge (s. Abbildung 7).

Bei den untersuchten Konzentrationen von 5 µg/ml rbDEFB1 und 10 µg/ml war eine höchst signifikante ( $p < 0,001$ ) Wachstumshemmung von *S. aureus* ab Stunde drei nach Inkubationsbeginn messbar, während bei 10 µg/ml bereits nach 2 h ein hoch signifikanter ( $p = 0,006$ ) Unterschied zur Positivkontrolle bestand.



**Abbildung 7: Wirkung von rbDEFB1 auf *S. aureus***

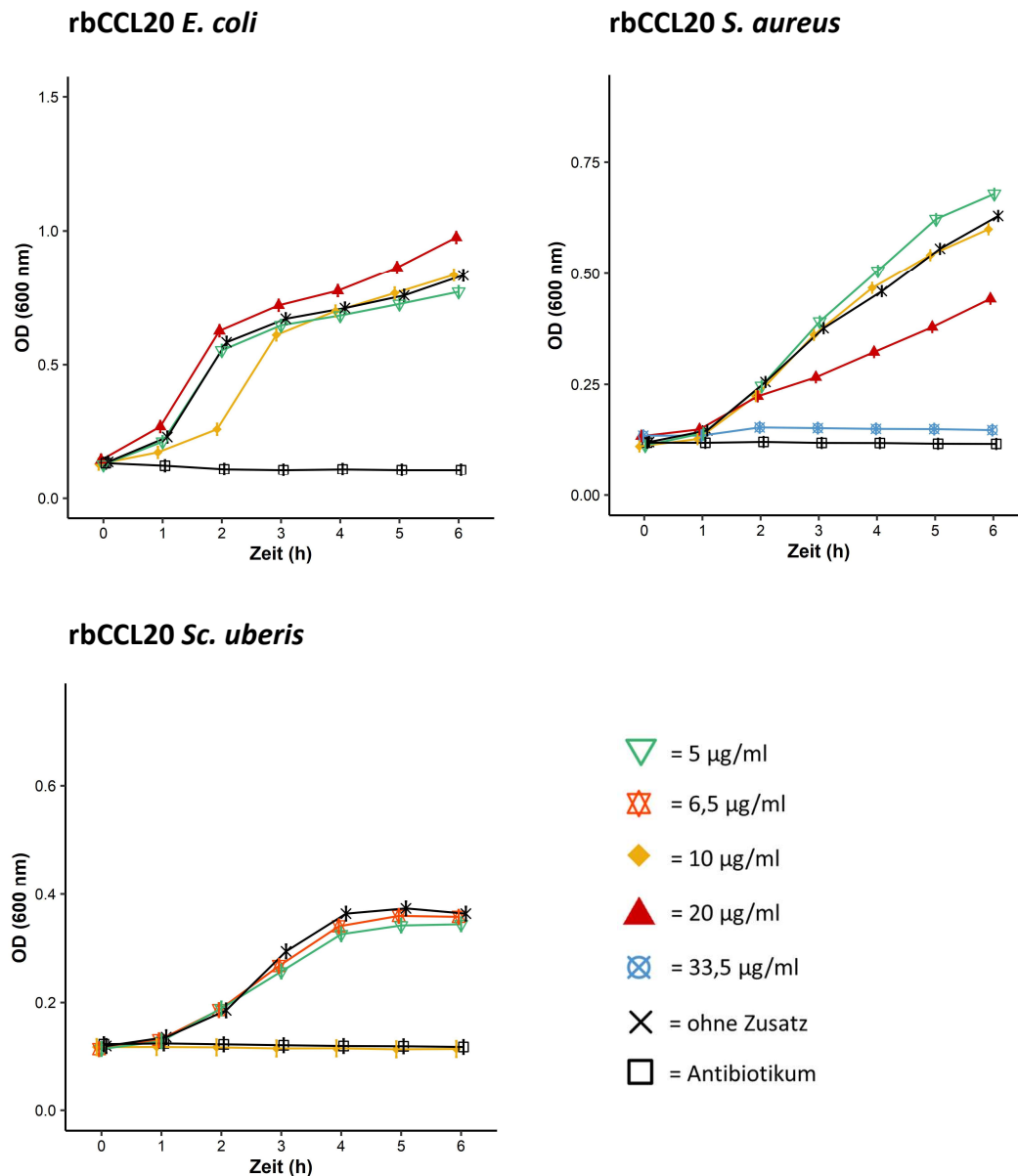
Dargestellt als adjustierter Mittelwert ist der Verlauf der optischen Dichte, die bei einer Wellenlänge von 600 nm über 6 h gemessen wurde (5 µg/ml rbDEFB1:  $n = 8$ , 10 µg/ml rbDEFB1:  $n = 9$ ). Die Positivkontrolle (ohne Zusatz) und die Negativkontrolle (Antibiotikum) sind jeweils in schwarz abgebildet. Die Ansätze mit dem entsprechenden AMP-Zusatz heben sich farblich ab. Die statistisch signifikanten Unterschiede lassen sich jeweils durch die fehlende Überschneidung der ebenfalls abgebildeten Konfidenzintervalle (vertikale Linie im Symbol) ablesen.

### 1.2. Rekombinantes bovines CC-Chemokin 20 (rbCCL20)

Das Peptid rbCCL20 hatte bei *E. coli* eine Konzentrations-abhängige Steigerung des Wachstums zur Folge, während es bei *S. aureus* und *Sc. uberis* zu einer Konzentrations-abhängigen Hemmung des Wachstums führte (s. Abbildung 8).

In der niedrigsten angewendeten Konzentration von 5 µg/ml hatte das Peptid rbCCL20 kaum Einfluss auf das Wachstum von *E. coli*. Erst zu Stunde sechs nach Inkubationsbeginn fand eine hoch signifikante Wachstumshemmung ( $p = 0,001$ ) statt. Beim Zusatz von 10 µg/ml rbCCL20 fand zunächst bis Stunde drei eine hoch signifikante ( $p < 0,01$ ) Hemmung des Wachstums statt, wobei in den folgenden Stunden kein signifikanter Unterschied zur Positivkontrolle mehr messbar war. Durch die Zugabe von 20 µg/ml rbCCL20 wurde das Wachstum ab Stunde drei hoch signifikant ( $p < 0,01$ ) gesteigert. Während bei *E. coli* also eine Steigerung des Wachstums mit steigender rbCCL20-Konzentration auftrat, konnte bei *S. aureus* und *Sc. uberis* der gegenteilige Effekt gemessen werden. Die Konzentration von 5 µg/ml rbCCL20 führte ab Stunde vier nach Inkubationsbeginn zu einer höchst signifikanten ( $p < 0,001$ ) Wachstumssteigerung von *S. aureus*, bei 10 µg/ml konnte nur zu Stunde zwei und sechs eine hoch signifikante ( $p < 0,01$ ) Zunahme der OD im Vergleich zur Positivkontrolle festgestellt werden. Bei der höheren Konzentration von 20 µg/ml rbCCL20 wurde hingegen bereits ab Stunde zwei eine hoch signifikante ( $p < 0,01$ ) Hemmung des Wachstums gemessen. Bei der höchsten eingesetzten Konzentration von 33,5 µg/ml näherte sich die Wachstumskurve optisch der Negativkontrolle an, aber die OD zu dieser unterschied sich dennoch hoch signifikant ( $p < 0,01$ ). Das Wachstum von *Sc. uberis* wurde bereits ab einer Konzentration von 10 µg/ml komplett gehemmt, da der Unterschied zur Negativkontrolle zu keiner Stunde signifikant war ( $p = 0,996$  zu Stunde sechs). Bei der Konzentration von 6,5 µg/ml kam es jeweils zwischenzeitlich (Stunde drei, vier und fünf) zu einer hoch signifikanten ( $p < 0,01$ ) Wachstumshemmung von *Sc. uberis*, die sich jedoch zu Stunde sechs wieder aufhob. Die Konzentration von 5 µg/ml zeigte keinen Einfluss auf das Wachstum von *Sc. uberis*.





**Abbildung 8: Wirkung von rbCCL20 auf *E. coli*, *S. aureus* und *Sc. uberis***

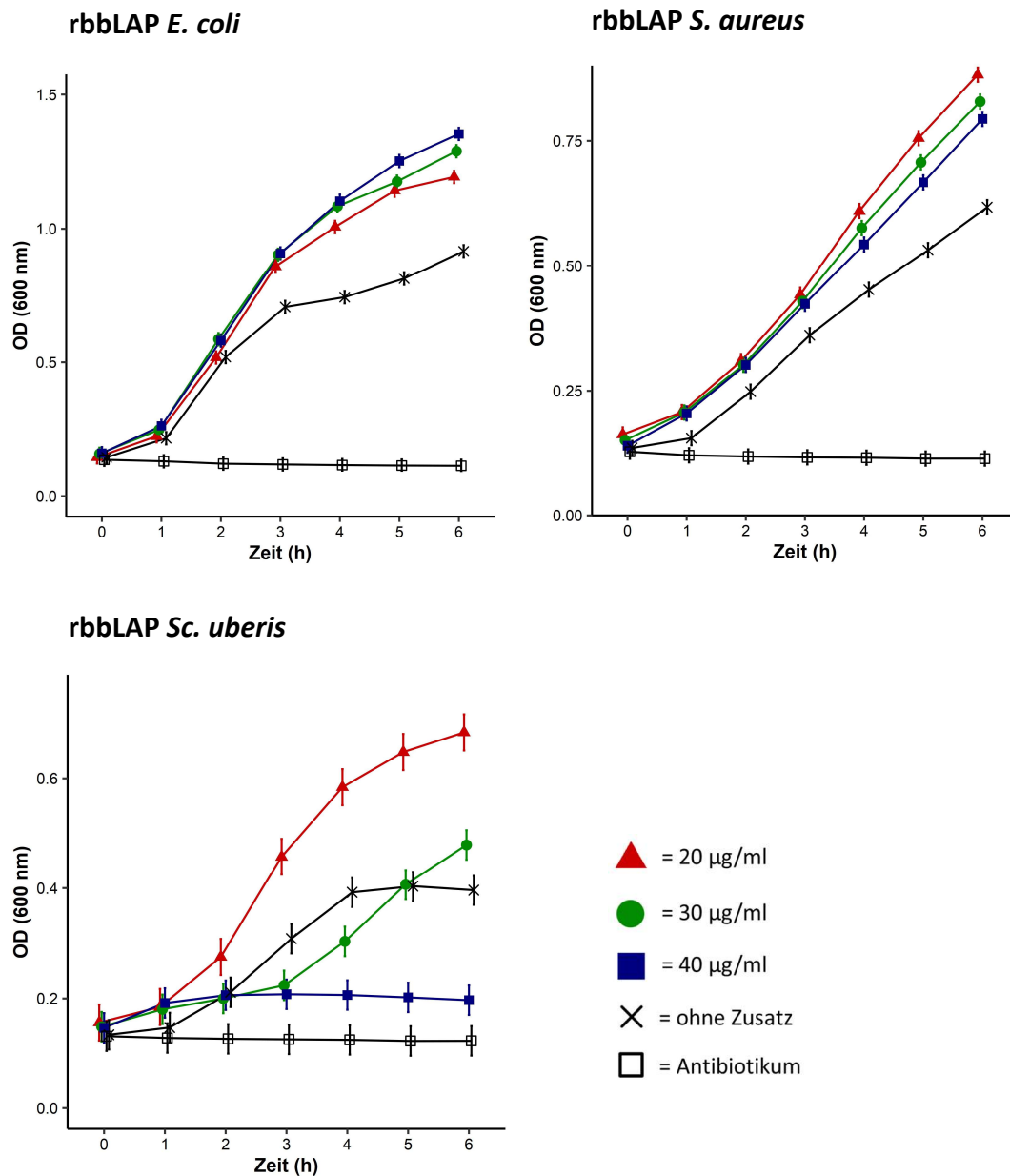
Dargestellt als adjustierter Mittelwert ist der Verlauf der optischen Dichte, die bei einer Wellenlänge von 600 nm über 6 h gemessen wurde ( $n=9$ ). Die Positivkontrolle (ohne Zusatz) und die Negativkontrolle (Antibiotikum) sind jeweils in schwarz abgebildet. Die Ansätze mit dem entsprechenden AMP-Zusatz heben sich farblich ab. Die statistisch signifikanten Unterschiede lassen sich jeweils durch die fehlende Überschneidung der ebenfalls abgebildeten Konfidenzintervalle (vertikale Linie im Symbol) ablesen.

### 1.3. Linguales antimikrobielles Peptid (LAP)

Untersucht wurde die Wirkung des rekombinanten bubalinen linguales antimikrobiellen Peptids (rbLAP) und des rekombinanten bovinen linguales antimikrobiellen Peptids (rbLAP).

Der Zusatz von LAP führte überwiegend zu einer Steigerung des bakteriellen Wachstums aller untersuchten Pathogene. Lediglich in der am höchsten eingesetzten Konzentration von rbbLAP ließ sich ein hemmender Effekt gegenüber *Sc. uberis* (s. Abbildung 9) bzw. bei rbLAP gegenüber *S. aureus* (s. Abbildung 10) erkennen.

Während im Versuch *E. coli* kombiniert mit rbbLAP die OD ab Stunde drei nach Inkubationsbeginn in allen Konzentrationen höchst signifikant ( $p < 0,001$ ) über die OD der Positivkontrolle stieg, war dieser Effekt bei *S. aureus* mit rbbLAP bereits ab Stunde eins sichtbar. Bei dem Ansatz von *Sc. uberis* mit der Konzentration von 20 µg/ml rbbLAP war ab Stunde drei nach Inkubationsbeginn eine höchst signifikante ( $p < 0,001$ ) Erhöhung des Wachstums des Bakteriums im Vergleich zur Positivkontrolle zu erkennen. Ab einer Konzentration von 30 µg/ml war ab Stunde drei nach Inkubationsbeginn eine hoch signifikante ( $p < 0,01$ ) Hemmung des Wachstums von *Sc. uberis* messbar, wobei die OD bei 30 µg/ml ab Stunde fünf wieder anstieg und die OD der Positivkontrolle bei Stunde sechs sogar hoch signifikant ( $p < 0,01$ ) überstieg. Die OD der höchsten untersuchten Konzentration von 40 µg/ml blieb bei *Sc. uberis* ab Stunde drei nach Inkubationsbeginn auf einem nahezu konstanten Wert höchst signifikant ( $p < 0,001$ ) niedriger als die OD der Positivkontrolle (s. Abbildung 9).

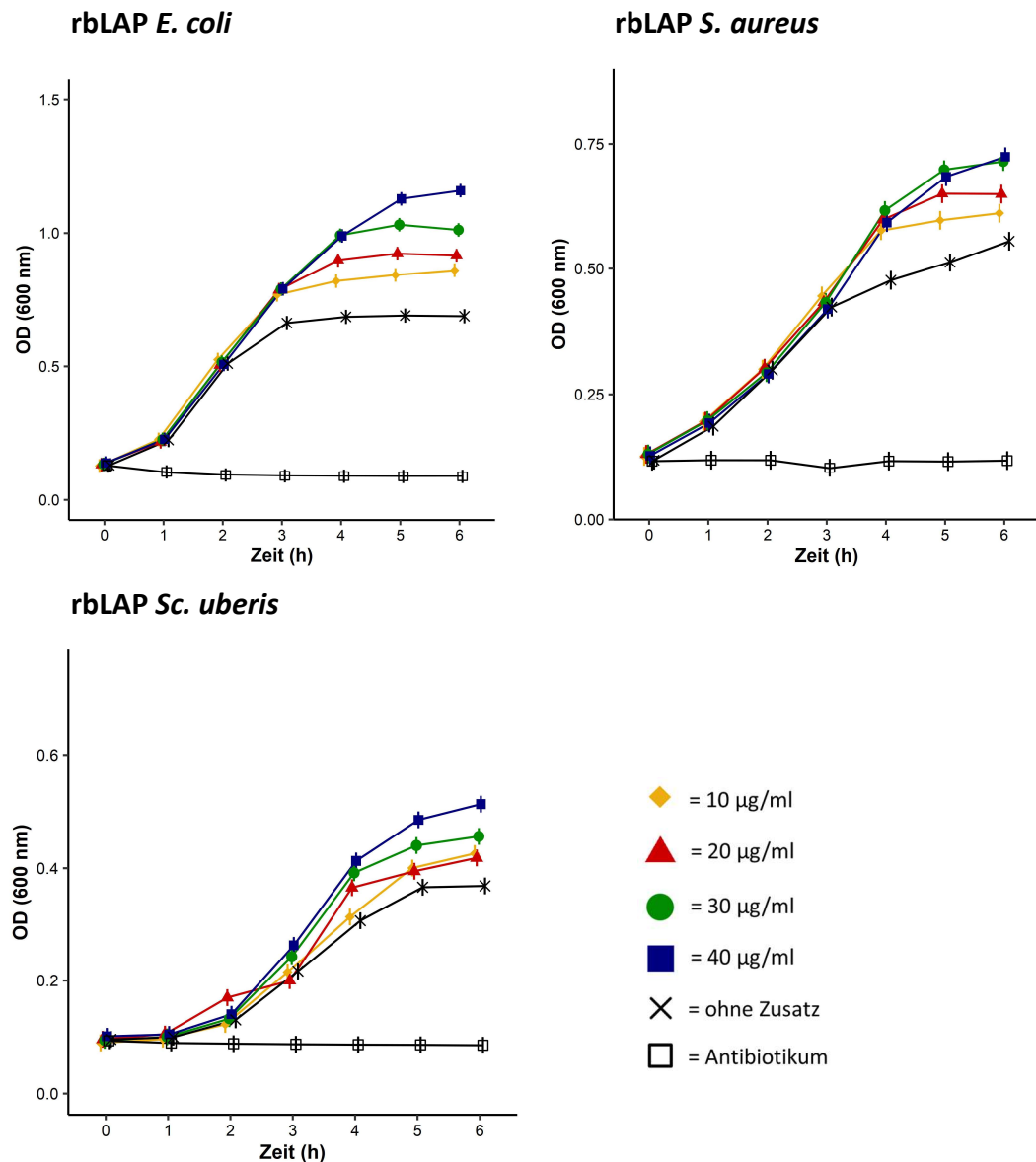


**Abbildung 9: Wirkung von rbbLAP auf *E. coli*, *S. aureus* und *Sc. uberis***

Dargestellt als adjustierter Mittelwert ist der Verlauf der optischen Dichte, die bei einer Wellenlänge von 600 nm über 6 h gemessen wurde (rbbLAP 20 µg/ml, *Sc. uberis*: n = 6; restliche Versuche: n = 9). Die Positivkontrolle (ohne Zusatz) und die Negativkontrolle (Antibiotikum) sind jeweils in schwarz abgebildet. Die Ansätze mit dem entsprechenden AMP-Zusatz heben sich farblich ab. Die statistisch signifikanten Unterschiede lassen sich jeweils durch die fehlende Überschneidung der ebenfalls abgebildeten Konfidenzintervalle (vertikale Linie im Symbol) ablesen.

Bei der Koinkubation von *E. coli* und rbbLAP stieg das Wachstum aller Ansätze mit rbbLAP ab Stunde drei nach Inkubationsbeginn im Vergleich zur Positivkontrolle höchst signifikant ( $p < 0,001$ ) an. Bei der Koinkubation mit *S. aureus* war diese Entwicklung ab Stunde vier sichtbar und bei *Sc. uberis* fand ab Stunde fünf eine

signifikante ( $p < 0,05$ ) Wachstumssteigerung nach Inkubationsbeginn statt (s. Abbildung 10).



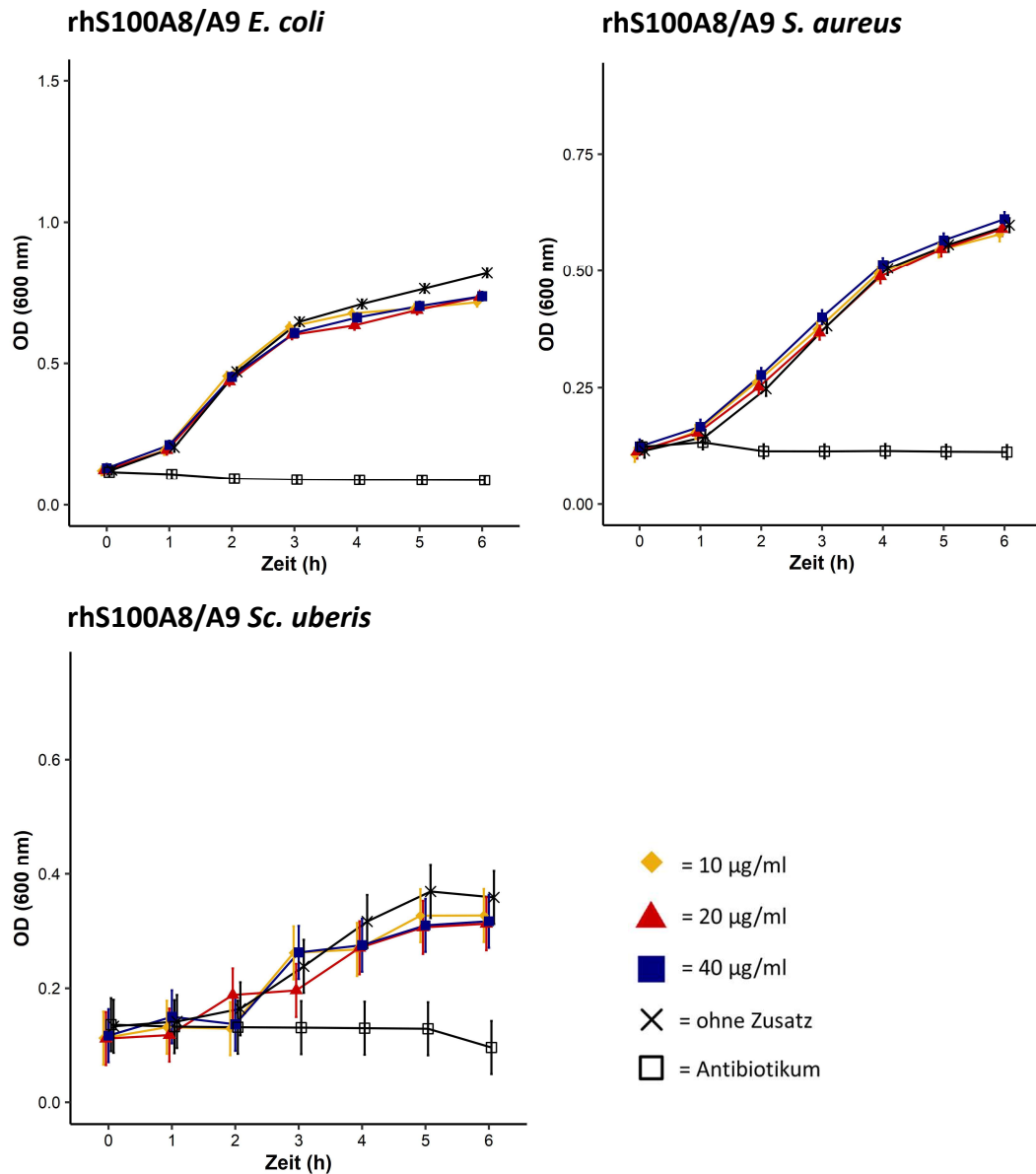
**Abbildung 10: Wirkung von rbLAP auf *E. coli*, *S. aureus* und *Sc. uberis***

Dargestellt als adjustierter Mittelwert ist der Verlauf der optischen Dichte, die bei einer Wellenlänge von 600 nm über 6 h gemessen wurde ( $n = 9$ ). Die Positivkontrolle (ohne Zusatz) und die Negativkontrolle (Antibiotikum) sind jeweils in schwarz abgebildet. Die Ansätze mit dem entsprechenden AMP-Zusatz heben sich farblich ab. Die statistisch signifikanten Unterschiede lassen sich jeweils durch die fehlende Überschneidung der ebenfalls abgebildeten Konfidenzintervalle (vertikale Linie im Symbol) ablesen.

#### 1.4. Rekombinantes humanes S100-Protein A8/A9 (rhS100A8/A9)

Ab Stunde vier nach Inkubationsbeginn fand eine signifikante ( $p < 0,05$ ) Hemmung von *E. coli* aller drei untersuchter Konzentrationen des Heterodimers rhS100A8/A9

statt, wobei das geschätzte Mittel der OD der Wachstumskurven zu Stunde sechs im Mittel nur um 0,09 von der Positivkontrolle abwich. Die untersuchten Konzentrationen von rhS100A8/A9 hatten keinen signifikanten Einfluss auf das Wachstum von *S. aureus* und *Sc. uberis* (s. Abbildung 11).



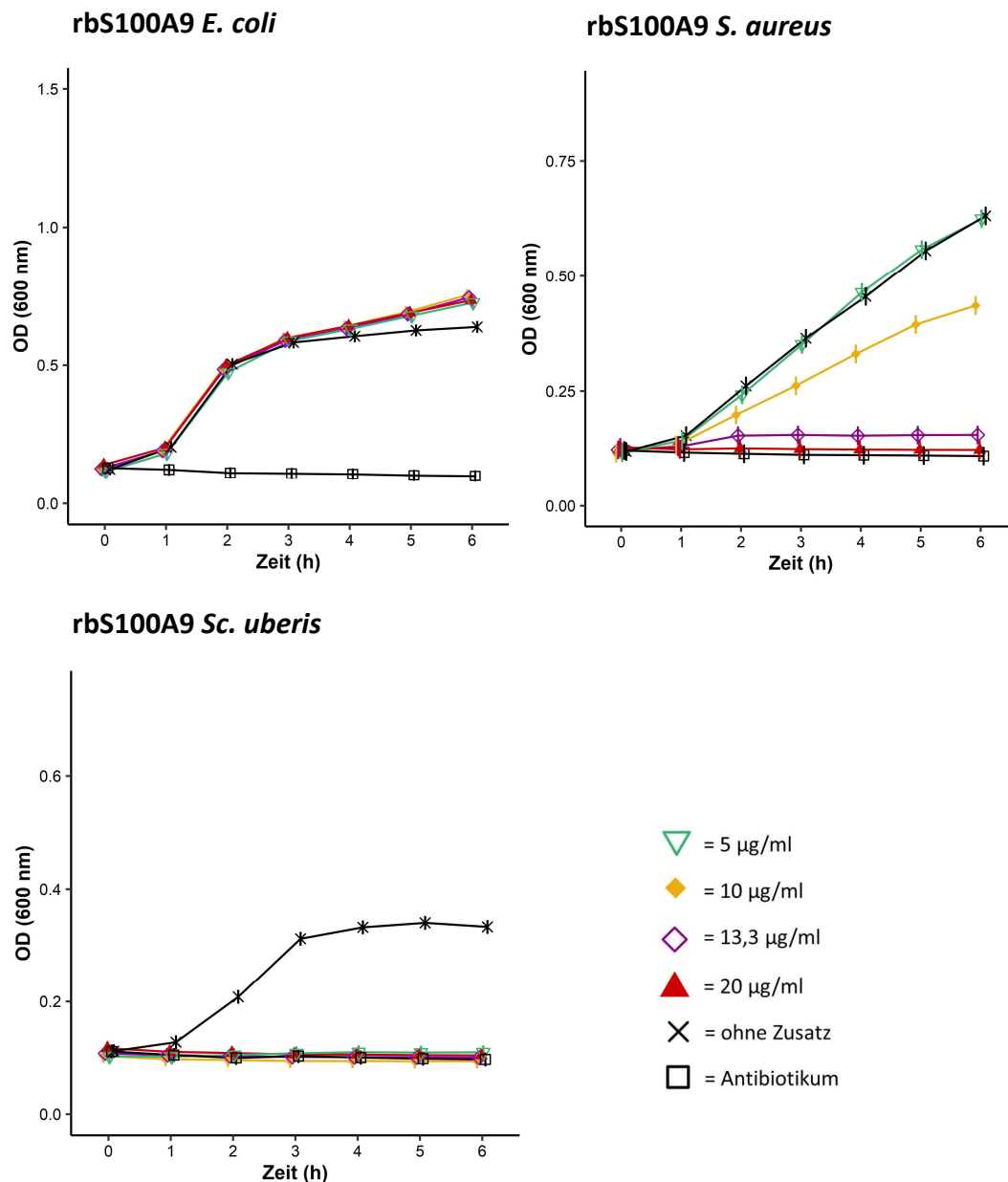
**Abbildung 11: Wirkung von rhS100A8/A9 auf *E. coli*, *S. aureus* und *Sc. uberis***

Dargestellt als adjustierter Mittelwert ist der Verlauf der optischen Dichte, die bei einer Wellenlänge von 600 nm über 6 h gemessen wurde ( $n = 9$ ). Die Positivkontrolle (ohne Zusatz) und die Negativkontrolle (Antibiotikum) sind jeweils in schwarz abgebildet. Die Ansätze mit dem entsprechenden AMP-Zusatz heben sich farblich ab. Die statistisch signifikanten Unterschiede lassen sich jeweils durch die fehlende Überschneidung der ebenfalls abgebildeten Konfidenzintervalle (vertikale Linie im Symbol) ablesen.

### 1.5. Rekombinantes bovines S100-Protein A9 (rbS100A9)

Das Peptid rbS100A9 steigerte das Wachstum von *E. coli*, während es die Fähigkeit besaß, das Wachstum von *S. aureus* und *Sc. uberis* Konzentrations-abhängig vollständig zu hemmen (s. Abbildung 12).

Fünf Stunden nach Inkubationsbeginn kam es bei allen verwendeten Konzentrationen zu einer hochsignifikanten ( $p < 0,001$ ) Wachstumssteigerung von *E. coli* verglichen mit der Positivkontrolle. Während eine Konzentration von 5  $\mu\text{g/ml}$  rbS100A9 keinen Einfluss auf das Wachstum von *S. aureus* hatte, konnten 10  $\mu\text{g/ml}$ , 13,3  $\mu\text{g/ml}$  und 20  $\mu\text{g/ml}$  bereits ab Stunde zwei nach Inkubationsbeginn hochsignifikant ( $p < 0,001$ ) den Anstieg der OD im Vergleich zur Positivkontrolle verringern. Durch 20  $\mu\text{g/ml}$  wurde eine komplette Hemmung des Wachstums erzielt, da zu Stunde sechs kein signifikanter Unterschied ( $p = 0,908$ ) zur Negativkontrolle messbar war. Das Wachstum von *Sc. uberis* wurde in allen verwendeten Konzentrationen komplett gehemmt. Ab Stunde zwei nach Inkubationsbeginn war die OD aller Konzentrationen von rbS100A9 im Vergleich zur OD der Positivkontrolle bereits hochsignifikant ( $p < 0,001$ ) niedriger und es konnte kein signifikanter Unterschied zur Negativkontrolle gemessen werden (s. Abbildung 12).



**Abbildung 12: Wirkung von rbS100A9 auf *E. coli*, *S. aureus* und *Sc. uberis***

Dargestellt als adjustierter Mittelwert ist der Verlauf der optischen Dichte, die bei einer Wellenlänge von 600 nm über 6 h gemessen wurde ( $n = 9$ ). Die Positivkontrolle (ohne Zusatz) und die Negativkontrolle (Antibiotikum) sind jeweils in schwarz abgebildet. Die Ansätze mit dem entsprechenden AMP-Zusatz heben sich farblich ab. Die statistisch signifikanten Unterschiede lassen sich jeweils durch die fehlende Überschneidung der ebenfalls abgebildeten Konfidenzintervalle (vertikale Linie im Symbol) ablesen.

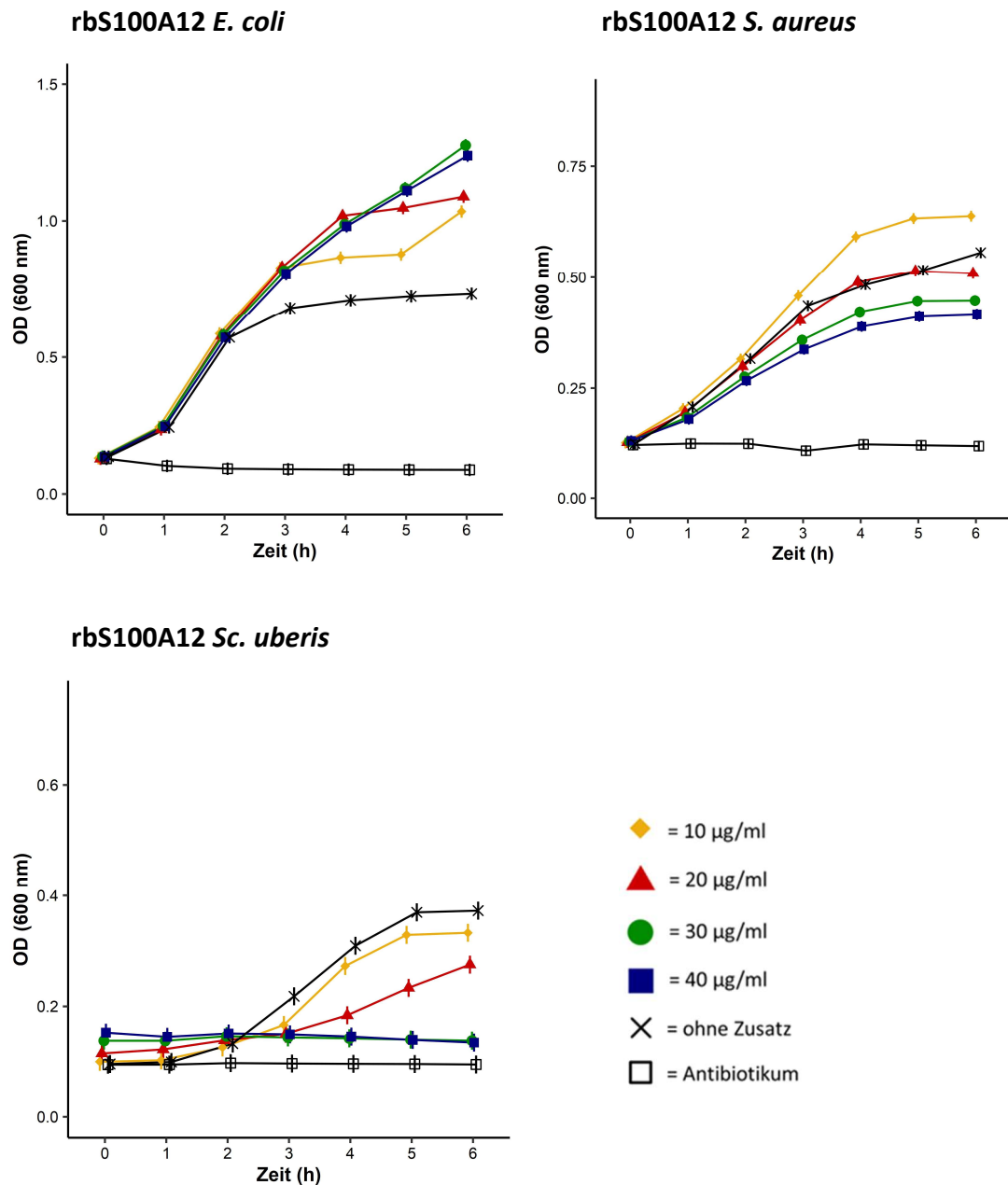
### 1.6. Rekombinantes bovines S100-Protein A12 (rbS100A12)

Das Protein rbS100A12 steigerte das Wachstum von *E. coli* Konzentrations-abhängig und hemmte gleichzeitig das Wachstum von *S. aureus* und *Sc. uberis*.

Die eingesetzten Konzentrationen von rbS100A12 führte ab Stunde drei nach

Inkubationsbeginn in allen zugefügten Konzentrationen zu einer hoch signifikanten ( $p < 0,001$ ) Wachstumssteigerung von *E. coli*. Es konnte außerdem eine Dosis-abhängige Steigerung des Bakterienwachstum gemessen werden, da das Wachstum mit 30  $\mu\text{g/ml}$  und 40  $\mu\text{g/ml}$  ab Stunde fünf hoch signifikant ( $p < 0,01$ ) über den Werten lag, als mit Zusatz von 10  $\mu\text{g/ml}$  und 20  $\mu\text{g/ml}$ . Beim Zusatz von rbS100A12 zu *S. aureus* und *Sc. uberis* konnte der gegenteilige Effekt beobachtet werden. Das Wachstum von *S. aureus* wurde durch 10  $\mu\text{g/ml}$  3 h nach Inkubationsbeginn signifikant ( $p = 0,014$ ) im Vergleich zur Positivkontrolle gesteigert. Durch den Zusatz von 30  $\mu\text{g/ml}$  und 40  $\mu\text{g/ml}$  wurde das Wachstum von *S. aureus* jedoch bereits ab Stunde eins signifikant ( $p < 0,05$ ) gehemmt. Das Wachstum von *Sc. uberis* wurde bereits ab einer Konzentration von 10  $\mu\text{g/ml}$  ab Stunde drei nach Inkubationsbeginn hoch signifikant ( $p < 0,001$ ) gehemmt, wobei Konzentrationen von 30  $\mu\text{g/ml}$  und 40  $\mu\text{g/ml}$  eine nahezu komplette Hemmung des Bakterienwachstums zur Folge hatten. Die OD zu Stunde sechs nach Inkubationsbeginn zeigte mit  $p = 1,0$  bei 30  $\mu\text{g/ml}$  und  $p = 0,601$  bei 40  $\mu\text{g/ml}$  keinen signifikanten Unterschied zur OD bei Stunde null, jedoch konnte jeweils kein signifikanter Unterschied zur Negativkontrolle gemessen werden.





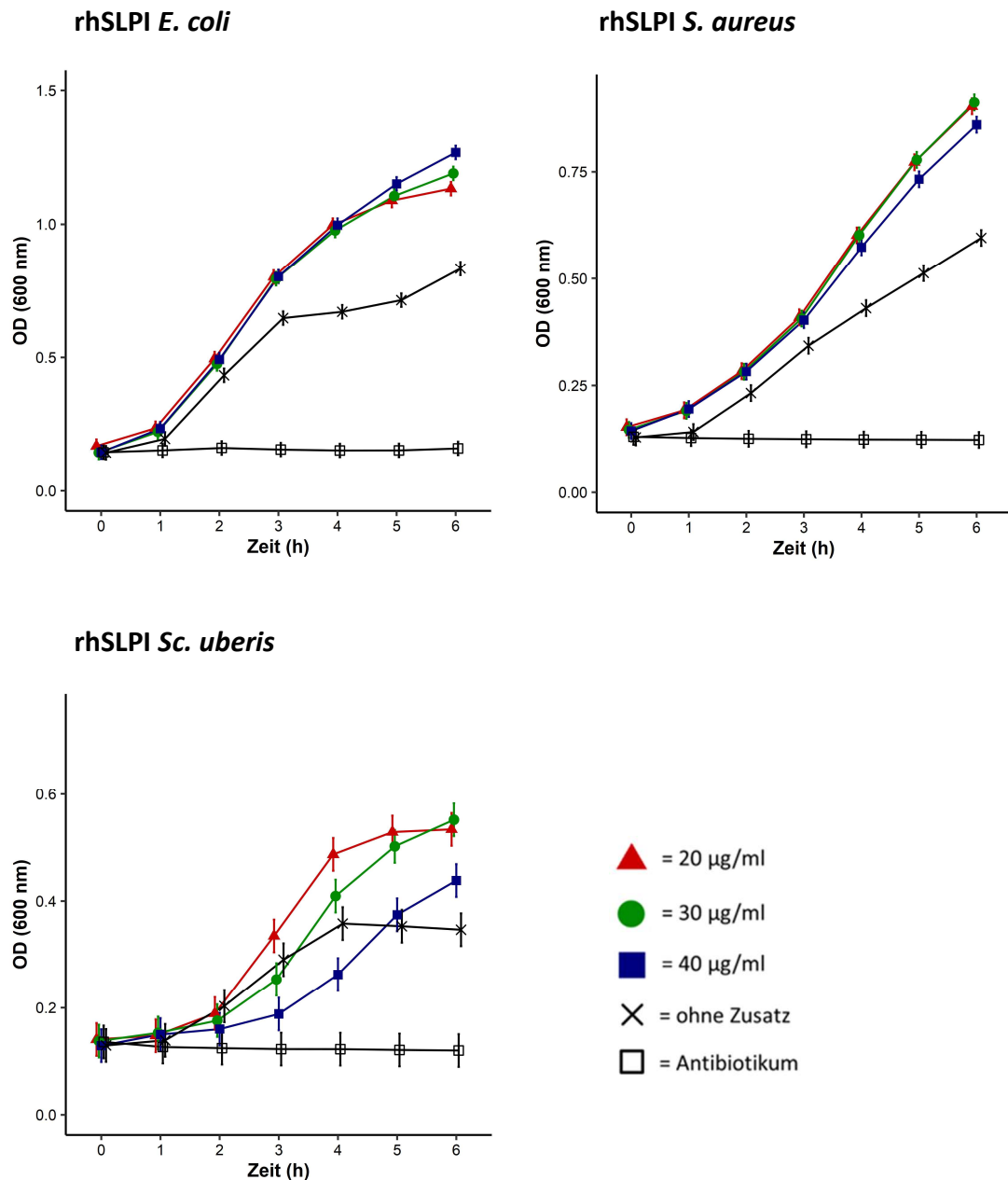
**Abbildung 13: Wirkung von S100A12 auf *E. coli*, *S. aureus* und *Sc. uberis***

Dargestellt als adjustierter Mittelwert ist der Verlauf der optischen Dichte, die bei einer Wellenlänge von 600 nm über 6 h gemessen wurde ( $n = 9$ ). Die Positivkontrolle (ohne Zusatz) und die Negativkontrolle (Antibiotikum) sind jeweils in schwarz abgebildet. Die Ansätze mit dem entsprechenden AMP-Zusatz heben sich farblich ab. Die statistisch signifikanten Unterschiede lassen sich jeweils durch die fehlende Überschneidung der ebenfalls abgebildeten Konfidenzintervalle (vertikale Linie im Symbol) ablesen.

### 1.7. Rekombinante humane Antileukoproteinase (rhSLPI)

Der Zusatz von hrSLPI führte in allen verwendeten Konzentrationen zu einem gesteigerten Wachstum der untersuchten Mastitispathogene.

Das Wachstum von *E. coli* erfuhr ab Stunde drei nach Inkubationsbeginn durch den Zusatz von rhSLPI in allen angewandten Konzentrationen eine höchst signifikante Steigerung ( $p < 0,001$ ) und das von *S. aureus* bereits ab Stunde eins eine hoch signifikante Steigerung ( $p < 0,01$ ) im Vergleich zur Positivkontrolle. Das Peptid hatte ähnlichen Einfluss auf das Wachstum von *Sc. uberis*, wobei das Bakterienwachstum zunächst Konzentrations-abhängig gesteigert wurde und 6 h nach Inkubationsbeginn in allen Konzentrationen die Positivkontrolle höchst signifikant ( $p < 0,001$ ) übertraf. Bei einer Konzentration von 40  $\mu\text{g/ml}$  wurde drei bis vier nach Inkubationsbeginn das Wachstum von *Sc. uberis* vorübergehend gehemmt im Gegensatz zur Positivkontrolle. Jedoch führte der Ansatz mit 40  $\mu\text{g/ml}$  rhSLPI sechs Stunden nach Inkubationsbeginn zu einem höchst signifikanten ( $p = 0,0003$ ) Anstieg der OD gegenüber der Positivkontrolle (s. Abbildung 14).



**Abbildung 14: Wirkung von rhSLPI auf *E. coli*, *S. aureus* und *Sc. uberis***

Dargestellt als adjustierter Mittelwert ist der Verlauf der optischen Dichte, die bei einer Wellenlänge von 600 nm über 6 h gemessen wurde ( $n = 9$ ). Die Positivkontrolle (ohne Zusatz) und die Negativkontrolle (Antibiotikum) sind jeweils in schwarz abgebildet. Die Ansätze mit dem entsprechenden AMP-Zusatz heben sich farblich ab. Die statistisch signifikanten Unterschiede lassen sich jeweils durch die fehlende Überschneidung der ebenfalls abgebildeten Konfidenzintervalle (vertikale Linie im Symbol) ablesen.

## 2. Untersuchungen zum Einfluss einer bakteriellen Restimulation auf die Reaktivität mammären Gewebes (Explantmodell)

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde anhand eines Explantmodells (s. III.3.2.) *in vitro* eine Prästimulation der Eutergewebe mit LPS und eine anschließende Restimulation mit jeweils *E. coli* und *S. aureus* durchgeführt. Mit Hilfe eines Chemotaxisassays (s. III.3.3) und einer RT-qPCR (s. III.3.4.4) wurde die Gewebereaktion im Hinblick auf die Bildung von Entzündungsmediatoren und Antimikrobiellen Peptiden untersucht. Die Fragestellung dieser Arbeit war es, ob sich *in vitro* durch den beschriebenen Versuchsansatz durch Prästimulation des Gewebes mit LPS eine Endotoxintoleranz (s. II.4) induzieren lässt und nach Restimulation mit *E. coli* oder *S. aureus* eine veränderte Reaktivität des Wirtgewebes vorliegt.

### 2.1.1. Chemotaxisassay

Nach der Stimulation der Explants wurden die Überstände mit Hilfe eines Chemotaxisassays auf das Vorhandensein von chemotaktisch aktiven Stoffen untersucht.

Es wurden die Anzahl migrierter PMN pro 100  $\mu$ l jedes Überstands durchflusszytometrisch gemessen (s. III.3.3.4). Für die Auswertung wurde jeweils der prozentuale Anteil der PMN an der Anzahl gemessener PMN der jeweiligen Positivkontrolle derselben Transmigrationskammer verwendet (relative Transmigrationsrate). Als Positivkontrolle wurden in diesem Versuch 100 ng/ml IL-8 (s. III.3.3.3) verwendet. Als eine der Negativkontrollen wurde je ein Well pro Platte nur mit Medium (ohne Explant) mitgeführt, welches hinsichtlich der relativen Transmigrationsrate im Median 4,13 % der Positivkontrolle entsprach. Die relative Transmigrationsrate des mit den unstimulierten Explants mit inkubierten Überstandes (weitere Negativkontrolle, s. III.3.2.5) zeigte für die Lokalisation der Zitzenzisterne einen Median von 3,43 % und für das Euterparenchym von 3,385 % (s. Abbildung 15, Ansatz M)

#### *Euterparenchym (EP)*

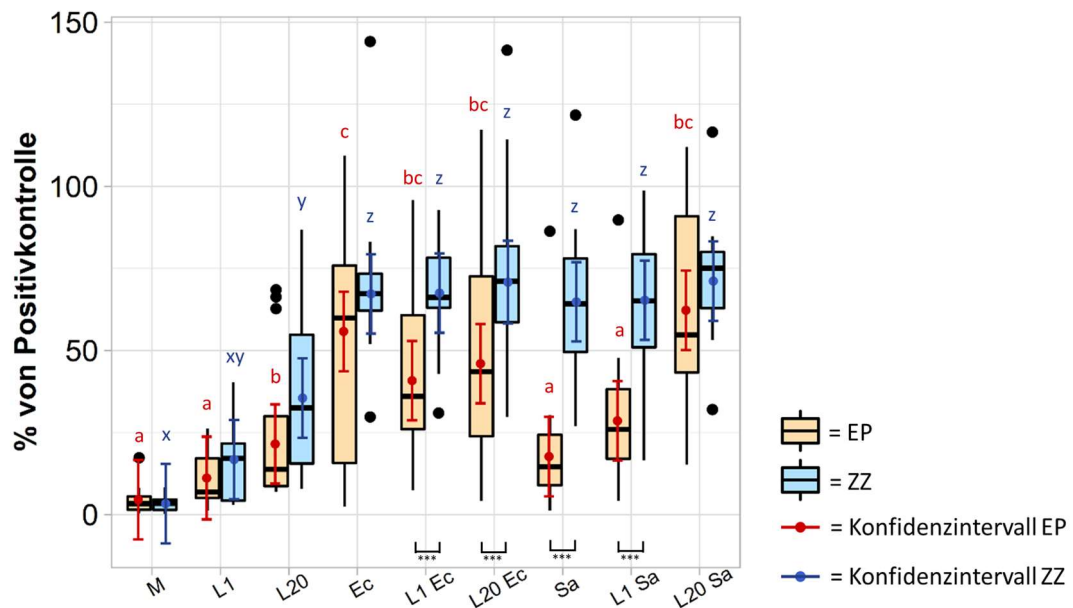
Durch die Stimulation mit LPS ließ sich kein signifikanter Unterschied im Vergleich zum Medium feststellen (s. Abbildung 15). Eine Stimulation mit *E. coli* führte jeweils zu einer hoch signifikanten ( $p < 0,01$ ) Steigerung der relativen

Transmigrationsrate. In den Überständen von Explants, die entweder nur mit *S. aureus* stimuliert worden waren oder mit LPS (1 µg/ml) prästimuliert und mit *S. aureus* restimuliert worden waren war jedoch kein signifikanter Anstieg der relativen Transmigrationsrate messbar. Eine Prästimulation der Explants mit 20 µg/ml LPS und eine Restimulation mit *S. aureus* hingegen führte zu einer höchst signifikanten ( $p < 0,001$ ) Überschreitung des Ansatzes mit *S. aureus* und des Ansatzes mit Medium und einer hoch signifikanten ( $p < 0,01$ ) Steigerung der Transmigrationsrate gegenüber dem Ansatz, in dem die Explants mit LPS (1 µg/ml) prästimuliert und mit *S. aureus* restimuliert worden waren. Eine einfache Stimulation der Explants mit *E. coli* führte zu einer höchst signifikant ( $p < 0,001$ ) gesteigerten relativen Transmigrationsrate im Vergleich zu Überständen *S. aureus*-stimulierter Explants. Unabhängig davon, ob die Explants prästimuliert worden waren unterschieden sich die Ansätze, die mit *E. coli* koinkubiert worden waren nicht signifikant untereinander. Weiterhin zeigten Ansätze, die mit *E. coli* koinkubiert worden waren eine signifikant höhere Transmigrationsrate im Vergleich zu Ansätzen die nur mit LPS (LPS 1,  $p < 0,001$ ; LPS 20,  $p < 0,01$ ) koinkubiert worden waren.

#### *Zitzenzisterne (ZZ)*

Durch die Stimulation der Explants mit LPS ließ sich nur mit 20 µg/ml ein signifikanter Unterschied ( $p = 0,004$ ) der Transmigrationsrate gemessener Kulturüberstände im Vergleich zu unstimulierten Explants feststellen. Eine Stimulation der Explants der Zitzenzisterne mit *E. coli* oder *S. aureus* führte invariant zu einer signifikanten Steigerung der Transmigrationsrate untersuchter Kulturüberstände gegenüber unstimulierter ( $p < 0,001$ ) und LPS-stimulierter ( $p < 0,05$ ) Explants, unabhängig davon, ob die Explants mit LPS prästimuliert waren, oder nicht. Es gibt keinen signifikanten Unterschied zwischen Ansätzen, die als Stimulus *E. coli* oder *S. aureus* enthalten hatten.

Insgesamt wies die Lokalisation Zitzenzisterne im Vergleich zum Euterparenchym eine stärkere Reaktivität auf (s. Abbildung 15). Vergleich man die Transmigrationsraten der Überstände des Euterparenchyms mit den Überständen der Zitzenzisterne so konnte festgestellt werden, dass der prozentuale Anteil gewanderter PMN bei Überständen der Zitzenzisterne grundsätzlich höher lag. Dieser Unterschied zeigte sich hoch signifikant ( $p < 0,01$ ) bei den Zusätzen LPS 1 µg/ml mit *E. coli*, LPS 20 µg/ml mit *E. coli*, *S. aureus* und LPS 1 µg/ml mit *S. aureus*.



**Abbildung 15: Einfluss der Restimulation mammärer Explants auf die Migrationsrate boviner PMN in deren Kulturüberstände**

Dargestellt als Boxplot ist die Expression der mRNA nach der Umschreibung in cDNA (Kopien/ $\mu$ l). Zusätzlich zu den Boxplots sind die Ausreißer als schwarze Punkte und die Konfidenzintervalle abgebildet. Lokalisationen: EP = Euterparenchym ( $n = 8$ ); ZZ = Zitzenzisterne ( $n = 12$ ). Als Zusätze wurden verwendet: M = Medium, L1 = LPS 1  $\mu$ g/ml, L20 = LPS 20  $\mu$ g/ml, Ec = *E. coli* ( $10^8$  KBE/ml, hitzeinaktiviert), L1Ec = LPS 1  $\mu$ g/ml und Restimulation mit *E. coli* ( $10^8$  KBE/ml, hitzeinaktiviert), L20Ec = LPS 20  $\mu$ g/ml und Restimulation mit *E. coli* ( $10^8$  KBE/ml, hitzeinaktiviert), Sa = *S. aureus* ( $10^8$  KBE/ml, hitzeinaktiviert), L1Sa = LPS 1  $\mu$ g/ml und Restimulation mit *S. aureus* ( $10^8$  KBE/ml, hitzeinaktiviert), L20Sa = LPS 20  $\mu$ g/ml und Restimulation mit *S. aureus* ( $10^8$  KBE/ml, hitzeinaktiviert). Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Zusätzen sind durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Geweben sind folgendermaßen abgebildet: \* =  $p < 0,05 - 0,01$ , \*\* =  $p < 0,01 - 0,001$ , \*\*\* =  $p < 0,001$

### 2.1.2. Expression ausgewählter Kandidatengene (RT-qPCR)

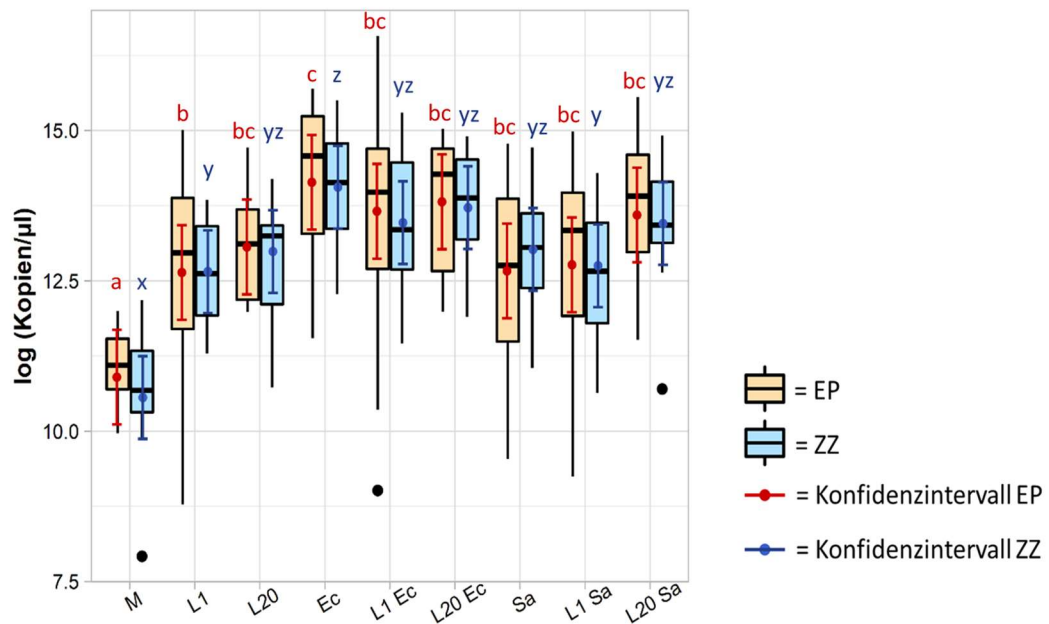
Um einen indirekten Nachweis relevanter Zellprodukte zu erhalten wurde die mRNA des untersuchten Gewebes isoliert, in cDNA umgeschrieben und auf eine Konzentration 200 ng/ $\mu$ l verdünnt. Anschließend wurde eine qPCR durchgeführt. Die Bestimmung der Menge der amplifizierte DNA wurde mittels absoluter Quantifizierung vorgenommen (s. III.3.4). Zur statistischen Berechnung und Darstellung wurden die Kopien pro  $\mu$ l logarithmiert. Untersucht wurden *IL-1  $\beta$* , *CXCL8* und *IL-6*, *TNF* und die antimikrobiellen Faktoren *LAP* und *SI00A9*. Ausgewertet wurde jeweils die Expression der unterschiedlichen Ansätze innerhalb der beiden Lokalisationen EP und ZZ des Explantmodells (s. III.3.2.5) und die Expression der einzelnen Ansätze im Lokalisationsvergleich.

Im Vorfeld der RT-qPCR wurde die Qualität der mRNA überprüft. Anhand einer automatisierten Elektrophorese wurde der RQI-Wert der mRNA der einzelnen Proben bestimmt (s. 0). Der Median aller gemessenen RQI-Werte lag bei den Proben des Euterparenchyms bei 7,2, wobei der Median innerhalb eines Tieres immer  $\geq 5,9$  betrug. In der Zitzenzisterne lagen die Werte grundsätzlich höher (Median von 9,7) und der Median innerhalb eines Tieres betrug immer  $\geq 9,5$ . Es war kein Einfluss der einzelnen Stimulations-Zusätze auf die RNA-Qualität messbar.

Verglich man die Basisexpression der einzelnen Gene innerhalb der Gewebe untereinander, so konnten vor allem im Euterparenchym große interindividuelle Unterschiede festgestellt werden. *CXCL8* wurde in beiden Gewebe-Lokalisationen höchst signifikant ( $p < 0,001$ ) höher exprimiert, als alle anderen untersuchten Gene, wobei in der Zitzenzisterne *S100A9* auf einem annähernd gleich hohen Niveau exprimiert wurde. Im Euterparenchym wurden die Gene *LAP*, *IL-1 $\beta$*  und *TNF* höchst signifikant ( $p < 0,001$ ) niedriger exprimiert, als die übrigen untersuchten Gene. *TNF* wurde auch in der Zitzenzisterne hochsignifikant ( $p < 0,001$ ) niedriger exprimiert, als die übrigen untersuchten Gene.

#### *Interleukin-8/ CXC-Motiv-Chemokin 8 (CXCL8)*

Sowohl im Euterparenchym, als auch in der Zitzenzisterne konnte eine hoch signifikante (EP  $p < 0,01$ ) bis höchst signifikante (ZZ  $p < 0,001$ ) Expression von *CXCL8* durch Stimulation mit allen verwendeten Zusätzen ausgelöst werden. Verglichen mit den anderen untersuchten Genen wurde *CXCL8* nach Stimulation der eingesetzten Zusätze mit einer 80-fachen Steigerung der Basisexpression nach Zusatz von *E. coli* am höchsten exprimiert. Durch den Zusatz von *E. coli* steigert sich in beiden Geweben die Expression von *CXCL8* im Vergleich zum Zusatz von LPS 1  $\mu\text{g/ml}$  signifikant (EP  $p = 0,029$ , ZZ  $p = 0,005$ ). In der Zitzenzisterne wurde außerdem eine signifikant höhere Expression von *CXCL8* ( $p = 0,014$ ) nach Stimulation mit *E. coli* als nach der Stimulation von LPS 1  $\mu\text{g/ml}$  mit Restimulation von *S. aureus* gemessen. Die Expression des Gens innerhalb der einzelnen Zusätze wurde in beiden Lokalisationen ähnlich hoch. Das Gen wurde innerhalb der einzelnen Zusätze vergleichbar hoch exprimiert, so dass kein signifikanter Unterschied messbar war (s. Abbildung 16).



**Abbildung 16: CXCL8-Expression in unstimulierten, einfach stimulierten und restimulierten mammären Explants**

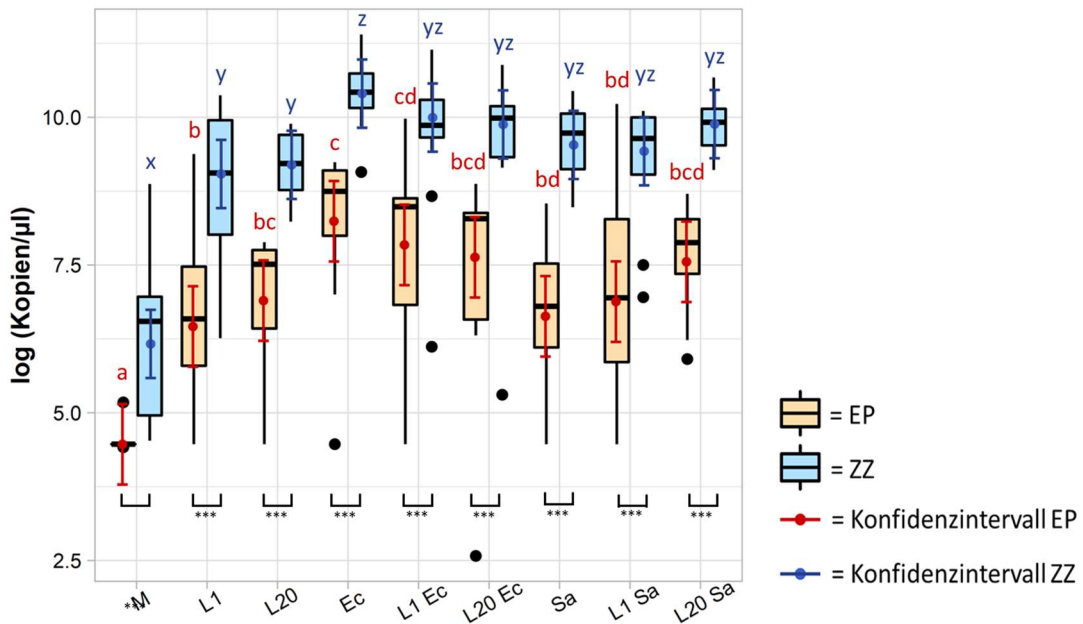
Dargestellt als Boxplot ist die Expression der mRNA nach der Umschreibung in cDNA (Kopien/ $\mu$ l). Zusätzlich zu den Boxplots sind die Ausreißer als schwarze Punkte und die Konfidenzintervalle abgebildet. Lokalisationen: EP = Euterparenchym ( $n = 8$ ); ZZ = Zitzenzisterne ( $n = 12$ ). Als Zusätze wurden verwendet: M = Medium, L1 = LPS 1  $\mu$ g/ml, L20 = LPS 20  $\mu$ g/ml, Ec = *E. coli* ( $10^8$  KBE/ml, hitzeinaktiviert), L1Ec = LPS 1  $\mu$ g/ml und Restimulation mit *E. coli* ( $10^8$  KBE/ml, hitzeinaktiviert), L20Ec = LPS 20  $\mu$ g/ml und Restimulation mit *E. coli* ( $10^8$  KBE/ml, hitzeinaktiviert), Sa = *S. aureus* ( $10^8$  KBE/ml, hitzeinaktiviert), L1Sa = LPS 1  $\mu$ g/ml und Restimulation mit *S. aureus* ( $10^8$  KBE/ml, hitzeinaktiviert), L20Sa = LPS 20  $\mu$ g/ml und Restimulation mit *S. aureus* ( $10^8$  KBE/ml, hitzeinaktiviert). Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Zusätzen sind durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Geweben sind folgendermaßen abgebildet: \* =  $p < 0,05 - 0,01$ , \*\* =  $p < 0,01 - 0,001$ , \*\*\* =  $p < 0,001$

### Interleukin-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )

Die Expression von IL-1 $\beta$  konnte durch Zugabe der Stimulations-Zusätze in beiden untersuchten Lokalisationen höchst signifikant ( $p < 0,001$ ) gesteigert werden. Während die Expression von IL-1 $\beta$  in der Zitzenzisterne nach Stimulation mit *E. coli* signifikant ( $p = 0,026$ ) höher war, als die Expression nach Stimulation mit LPS 1  $\mu$ g/ml und LPS 20  $\mu$ g/ml, konnten in diesem Gewebe keine weiteren signifikanten Unterschiede in der Expression gemessen werden. Im Euterparenchym war die Expression nach Stimulation mit *E. coli* signifikant höher, als nach Zugabe von LPS 1  $\mu$ g/ml, *S. aureus* und *S. aureus* mit LPS 1  $\mu$ g/ml. Die Zugabe von LPS 1  $\mu$ g/ml war hoch signifikant ( $p = 0,001$ ) niedriger, als nach der Restimulation



mit *E. coli*. Vergleich man die Lokalisationen miteinander, konnte festgestellt werden, dass die Expression von *IL-1 $\beta$*  nach Stimulation in der Zitenzisterne höchst signifikant ( $p < 0,001$ ) höher lag, als im Euterparenchym (s. Abbildung 17).



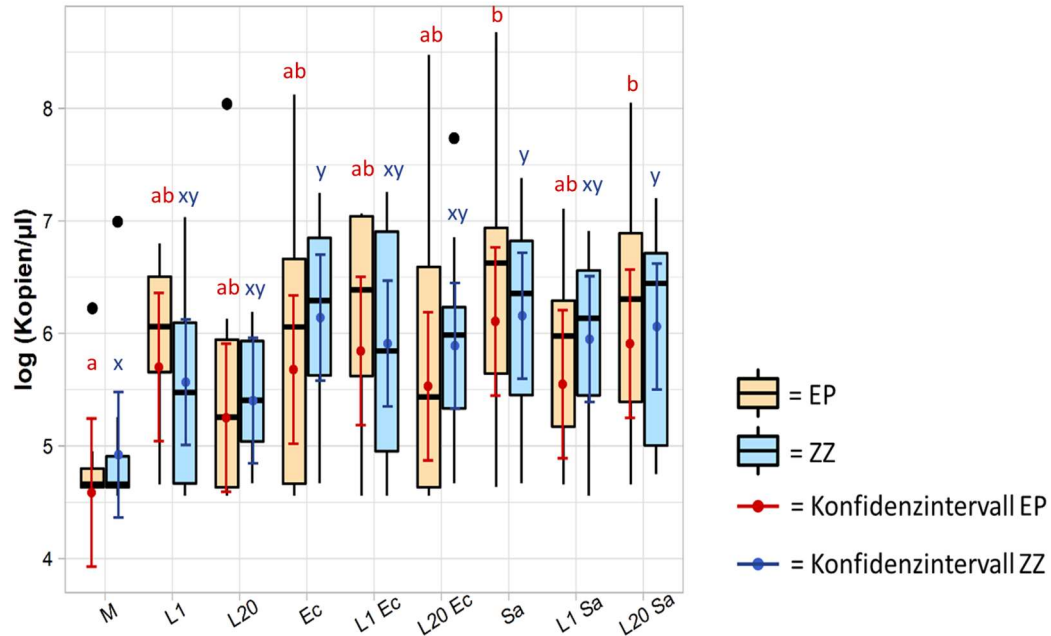
**Abbildung 17: IL-1 $\beta$ -Expression in unstimulierten, einfach stimulierten und restimulierten mammären Explants**

Dargestellt als Boxplot ist die Expression der mRNA nach der Umschreibung in cDNA (Kopien/ $\mu$ l). Zusätzlich zu den Boxplots sind die Ausreißer als schwarze Punkte und die Konfidenzintervalle abgebildet. Lokalisationen: EP = Euterparenchym ( $n = 8$ ); ZZ = Zitenzisterne ( $n = 12$ ). Als Zusätze wurden verwendet: M = Medium, L1 = LPS 1  $\mu$ g/ml, L20 = LPS 20  $\mu$ g/ml, Ec = *E. coli* ( $10^8$  KBE/ml, hitzeinaktiviert), L1Ec = LPS 1  $\mu$ g/ml und Restimulation mit *E. coli* ( $10^8$  KBE/ml, hitzeinaktiviert), L20Ec = LPS 20  $\mu$ g/ml und Restimulation mit *E. coli* ( $10^8$  KBE/ml, hitzeinaktiviert), Sa = *S. aureus* ( $10^8$  KBE/ml, hitzeinaktiviert), L1Sa = LPS 1  $\mu$ g/ml und Restimulation mit *S. aureus* ( $10^8$  KBE/ml, hitzeinaktiviert), L20Sa = LPS 20  $\mu$ g/ml und Restimulation mit *S. aureus* ( $10^8$  KBE/ml, hitzeinaktiviert). Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Zusätzen sind durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Geweben sind folgendermaßen abgebildet: \* =  $p < 0,05 - 0,01$ , \*\* =  $p < 0,01 - 0,001$ , \*\*\* =  $p < 0,001$

#### Tumornekrosefaktor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )

Die Expression von TNF war an beiden Lokalisationen auf einem sehr niedrigen Niveau. In beiden Geweben wurde die Basisexpression ausschließlich durch die Stimulation mit *S. aureus* und mit LPS 20 und der anschließenden Restimulation von *S. aureus* signifikant ( $p < 0,05$ ) überschritten, wobei die Stimulation mit *E. coli* in der Zitenzisterne ebenfalls zu einer signifikanten ( $p < 0,05$ ) Steigerung der Expression führte. Innerhalb der einzelnen Gewebe bestand kein weiterer signifikanter

Unterschied in der Expression von *TNF* zwischen den unterschiedlichen Zusätzen. Des Weiteren ließ sich auch zwischen Zitzenzisterne und Euterparenchym kein signifikanter Unterschied innerhalb der einzelnen Zusätze feststellen (s. Abbildung 18).



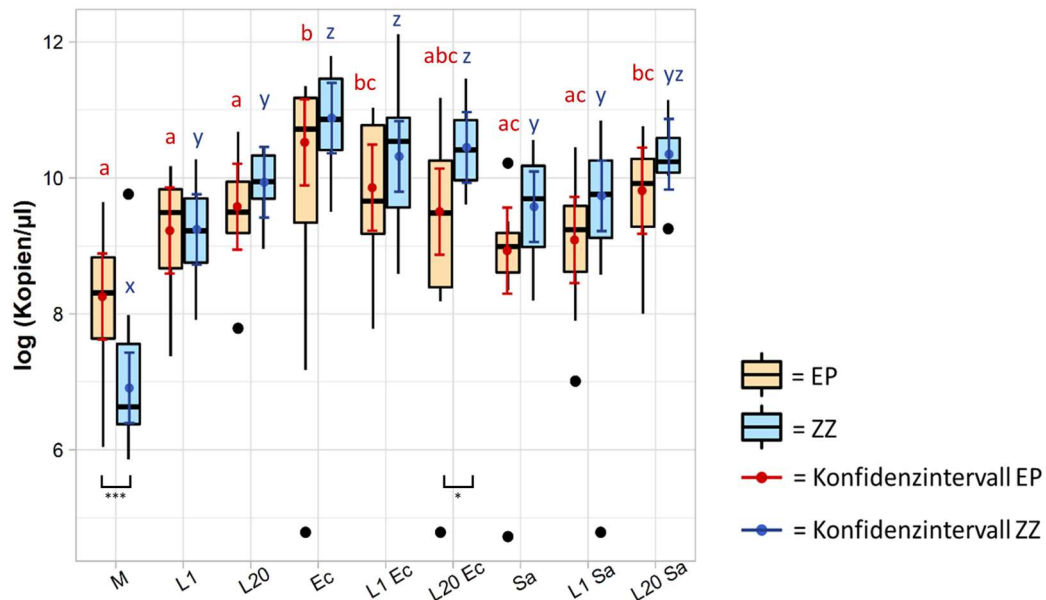
**Abbildung 18: *TNF-α*-Expression in unstimulierten, einfach stimulierten und restimulierten mammären Explants**

Dargestellt als Boxplot ist die Expression der mRNA nach der Umschreibung in cDNA (Kopien/μl). Zusätzlich zu den Boxplots sind die Ausreißer als schwarze Punkte und die Konfidenzintervalle abgebildet. Lokalisationen: EP = Euterparenchym ( $n = 8$ ); ZZ = Zitzenzisterne ( $n = 12$ ). Als Zusätze wurden verwendet: M = Medium, L1 = LPS 1 μg/ml, L20 = LPS 20 μg/ml, Ec = *E. coli* ( $10^8$  KBE/ml, hitzeinaktiviert), L1Ec = LPS 1 μg/ml und Restimulation mit *E. coli* ( $10^8$  KBE/ml, hitzeinaktiviert), L20Ec = LPS 20 μg/ml und Restimulation mit *E. coli* ( $10^8$  KBE/ml, hitzeinaktiviert), Sa = *S. aureus* ( $10^8$  KBE/ml, hitzeinaktiviert), L1Sa = LPS 1 μg/ml und Restimulation mit *S. aureus* ( $10^8$  KBE/ml, hitzeinaktiviert), L20Sa = LPS 20 μg/ml und Restimulation mit *S. aureus* ( $10^8$  KBE/ml, hitzeinaktiviert). Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Zusätzen sind durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Geweben sind folgendermaßen abgebildet: \* =  $p < 0,05$  - 0,01, \*\* =  $p < 0,01$  - 0,001, \*\*\* =  $p < 0,001$

#### Interleukin-6 (IL-6)

In Explants des Euterparenchyms wurde die Expression von *IL-6* nur durch einfache Stimulation mit *E. coli*, Stimulation mit LPS 1 μg/ml und Restimulation mit *E. coli* und LPS 20 μg/ml und Restimulation mit *S. aureus* signifikant ( $p < 0,05$ ) induziert (s. Abbildung 19). Alle weiteren Ansätze zeigten aufgrund hoher Varianz keinen signifikanten Unterschied zur Mediumkontrolle. Die Expression von *IL-6*

konnte durch Zugabe der Stimulations-Zusätze in Explants der Zitsenzisterne invariant höchst signifikant ( $p < 0,001$ ) gesteigert werden. *IL-6* wurde in beiden Lokalisationen nach Stimulation mit *E. coli* signifikant ( $p < 0,05$ ) höher exprimiert, als nach Stimulation mit *S. aureus* und nach Stimulation mit LPS 1  $\mu\text{g/ml}$  und Restimulation mit *S. aureus*. Vergleich man die Expression des Gens in der Zitsenzisterne, wenn 1  $\mu\text{g/ml}$  LPS mitinkubiert wurde mit den Zusätzen *E. coli* und LPS 20  $\mu\text{g/ml}$  mit Restimulation durch *E. coli* konnte eine signifikante ( $p < 0,05$ ) Steigerung erkannt werden. Die Basisexpression für *IL-6* war in der Zitsenzisterne signifikant ( $p = 0,001$ ) höher im Vergleich zum Euterparenchym. Des Weiteren fand eine signifikante ( $p = 0,02$ ) Steigerung der Expression in der Zitsenzisterne unter dem Zusatz von LPS 20  $\mu\text{g/ml}$  mit *E. coli* im Vergleich zum Euterparenchym statt (s. Abbildung 19).

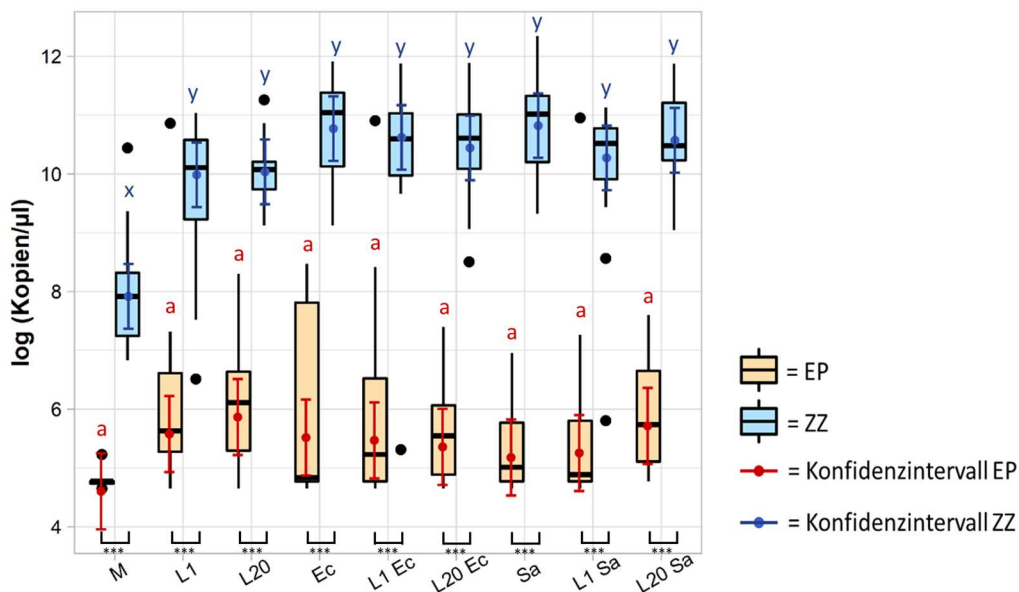


**Abbildung 19: IL-6-Expression in unstimulierten, einfach stimulierten und restimulierten mammären Explants**

Dargestellt als Boxplot ist die Expression der mRNA nach der Umschreibung in cDNA (Kopien/ $\mu\text{l}$ ). Zusätzlich zu den Boxplots sind die Ausreißer als schwarze Punkte und die Konfidenzintervalle abgebildet. Lokalisationen: EP = Euterparenchym ( $n = 8$ ); ZZ = Zitsenzisterne ( $n = 12$ ). Als Zusätze wurden verwendet: M = Medium, L1 = LPS 1  $\mu\text{g/ml}$ , L20 = LPS 20  $\mu\text{g/ml}$ , Ec = *E. coli* ( $10^8$  KBE/ml, hitzeinaktiviert), L1Ec = LPS 1  $\mu\text{g/ml}$  und Restimulation mit *E. coli* ( $10^8$  KBE/ml, hitzeinaktiviert), L20Ec = LPS 20  $\mu\text{g/ml}$  und Restimulation mit *E. coli* ( $10^8$  KBE/ml, hitzeinaktiviert), Sa = *S. aureus* ( $10^8$  KBE/ml, hitzeinaktiviert), L1Sa = LPS 1  $\mu\text{g/ml}$  und Restimulation mit *S. aureus* ( $10^8$  KBE/ml, hitzeinaktiviert), L20Sa = LPS 20  $\mu\text{g/ml}$  und Restimulation mit *S. aureus* ( $10^8$  KBE/ml, hitzeinaktiviert). Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Zusätzen sind durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Geweben sind folgendermaßen abgebildet: \* =  $p < 0,05 - 0,01$ , \*\* =  $p < 0,01 - 0,001$ , \*\*\* =  $p < 0,001$

### Linguales antimikrobielles Peptid (LAP)

Die Expression des Gens *LAP* wurde im Euterparenchym durch Stimulation und Restimulation nur teilweise und nicht signifikant gesteigert. In der Zitzenzisterne konnte die Expression von *LAP* durch Stimulation aller Zusätze im Vergleich zur Basisexpression höchst signifikant ( $p < 0,001$ ) gesteigert werden. Innerhalb der Lokalisationen war die Expression von *LAP* bei allen Zusätzen auf ähnlichem Niveau, somit gab es keine signifikanten Unterschiede. Die Expression des Gens war bei allen Zusätzen in der Zitzenzisterne jedoch hoch signifikant ( $p < 0,001$ ) höher messbar, als im Euterparenchym (s. Abbildung 20).

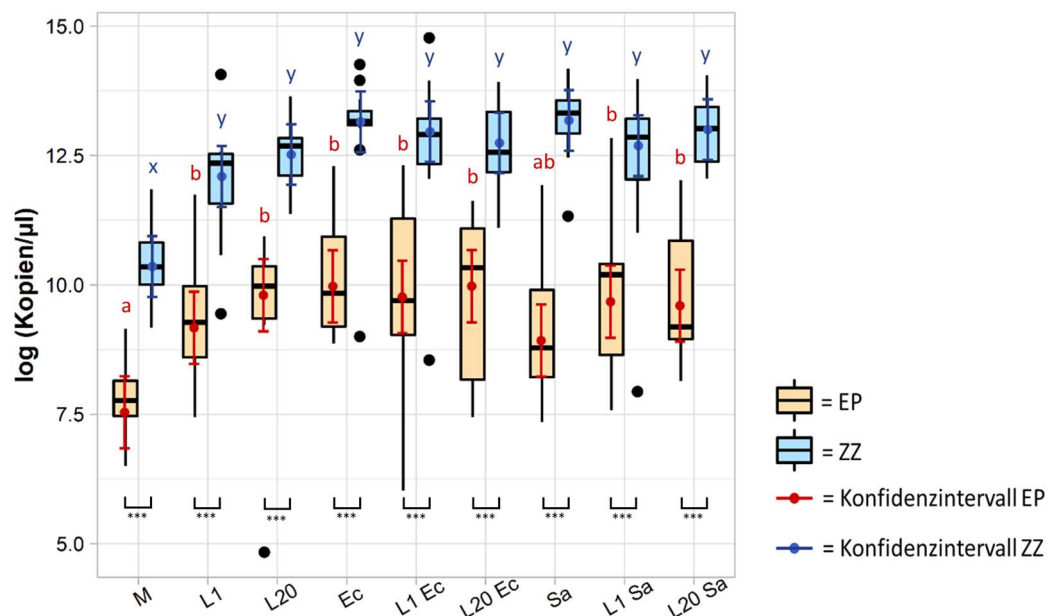


**Abbildung 20: LAP-Expression in unstimulierten, einfach stimulierten und re-stimulierten mammären Explants**

Dargestellt als Boxplot ist die Expression der mRNA nach der Umschreibung in cDNA (Kopien/ $\mu$ l). Zusätzlich zu den Boxplots sind die Ausreißer als schwarze Punkte und die Konfidenzintervalle abgebildet. Lokalisationen: EP = Euterparenchym ( $n = 8$ ); ZZ = Zitzenzisterne ( $n = 12$ ). Als Zusätze wurden verwendet: M = Medium, L1 = LPS 1  $\mu$ g/ml, L20 = LPS 20  $\mu$ g/ml, Ec = *E. coli* ( $10^8$  KBE/ml, hitzeinaktiviert), L1Ec = LPS 1  $\mu$ g/ml und Restimulation mit *E. coli* ( $10^8$  KBE/ml, hitzeinaktiviert), L20Ec = LPS 20  $\mu$ g/ml und Restimulation mit *E. coli* ( $10^8$  KBE/ml, hitzeinaktiviert), Sa = *S. aureus* ( $10^8$  KBE/ml, hitzeinaktiviert), L1Sa = LPS 1  $\mu$ g/ml und Restimulation mit *S. aureus* ( $10^8$  KBE/ml, hitzeinaktiviert), L20Sa = LPS 20  $\mu$ g/ml und Restimulation mit *S. aureus* ( $10^8$  KBE/ml, hitzeinaktiviert). Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Zusätzen sind durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Geweben sind folgendermaßen abgebildet: \* =  $p < 0,05$  - 0,01, \*\* =  $p < 0,01$  - 0,001, \*\*\* =  $p < 0,001$

*S100-Protein A9 (S100A9)*

In beiden Lokalisationen wurde durch die Stimulation anhand der eingesetzten Zusätze eine signifikante ( $p < 0,05$ ) Expressionssteigerung des Gens *S100A9* erreicht, wobei der Zusatz von *S. aureus* im Euterparenchym nur die Tendenz einer Steigerung aufwies. Sowohl im Euterparenchym, als auch in der Zitzenzisterne konnten keine weiteren signifikanten Unterschiede in der Expression von *S100A9* zwischen den einzelnen Zusätzen innerhalb der Gewebe festgestellt werden. Die Expression von *S100A9* in der Zitzenzisterne war bei allen Zusätzen höchst signifikant ( $p < 0,001$ ) höher ausgeprägt, als im Euterparenchym (s. Abbildung 21).



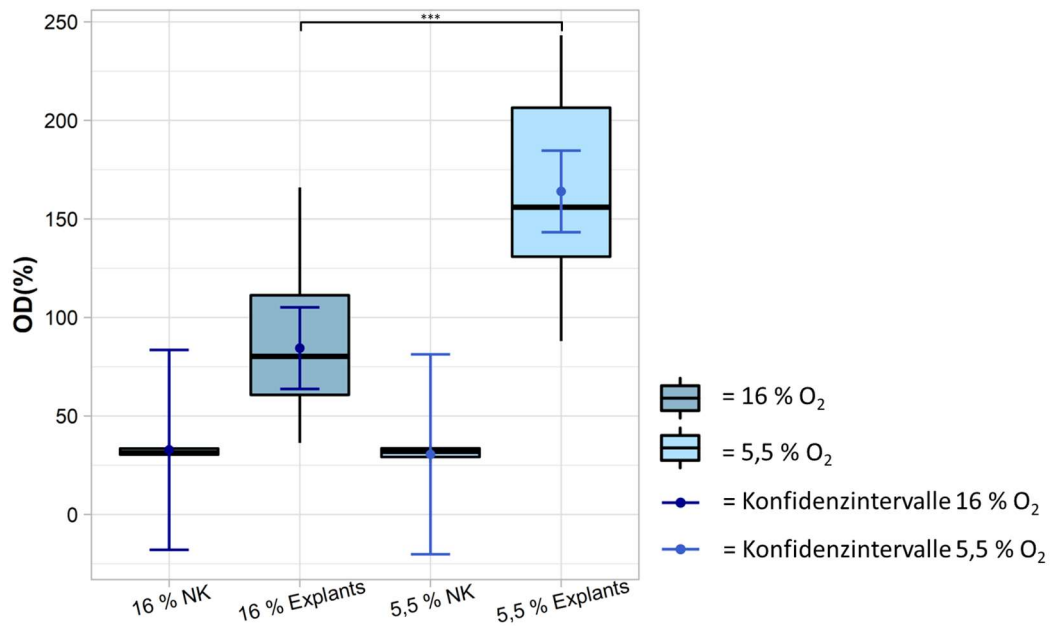
**Abbildung 21: *S100A9*-Expression in unstimulierten, einfach stimulierten und restimulierten mammären Explants**

Dargestellt als Boxplot ist die Expression der mRNA nach der Umschreibung in cDNA (Kopien/ $\mu$ l). Zusätzlich zu den Boxplots sind die Ausreißer als schwarze Punkte und die Konfidenzintervalle abgebildet. Lokalisationen: EP = Euterparenchym ( $n = 8$ ); ZZ = Zitzenzisterne ( $n = 12$ ). Als Zusätze wurden verwendet: M = Medium, L1 = LPS 1  $\mu$ g/ml, L20 = LPS 20  $\mu$ g/ml, Ec = *E. coli* ( $10^8$  KBE/ml, hitzeinaktiviert), L1Ec = LPS 1  $\mu$ g/ml und Restimulation mit *E. coli* ( $10^8$  KBE/ml, hitzeinaktiviert), L20Ec = LPS 20  $\mu$ g/ml und Restimulation mit *E. coli* ( $10^8$  KBE/ml, hitzeinaktiviert), Sa = *S. aureus* ( $10^8$  KBE/ml, hitzeinaktiviert), L1Sa = LPS 1  $\mu$ g/ml und Restimulation mit *S. aureus* ( $10^8$  KBE/ml, hitzeinaktiviert), L20Sa = LPS 20  $\mu$ g/ml und Restimulation mit *S. aureus* ( $10^8$  KBE/ml, hitzeinaktiviert). Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Zusätzen sind durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Geweben sind folgendermaßen abgebildet: \* =  $p < 0,05$  - 0,01, \*\* =  $p < 0,01 - 0,001$ , \*\*\* =  $p < 0,001$

### **2.1.3. Festlegung der Sauerstoffkonzentration bei der Überprüfung der Stoffwechselaktivität**

Zur Anpassung des Explantmodells an die physiologischen Bedingungen im Körper wurden Vorversuche mit Anpassung der Sauerstoffkonzentration im Inkubator durchgeführt. Vergleichend wurden die Explants bei Konzentrationen von 5,5 % und ca. 16 % Sauerstoff inkubiert. Angegeben wurde die Stoffwechselaktivität in Prozent, wobei der Median aller OD drei Stunden nach Inkubationsbeginn als 100 % gesetzt wurde (s. III.3.2.6). Innerhalb der Sauerstoffkonzentrationen waren die Ergebnisse der beiden untersuchten Zusätze LPS 20 µg/ml mit *E. coli* und Medium normalverteilt, weshalb sie im Folgenden zusammengefasst untersucht wurden.

Die Stoffwechselaktivität der Zitzenzisterne lag bei beiden Sauerstoffkonzentrationen deutlich über 50 %, wobei sie bei 5,5 % Sauerstoff mit 156 % hoch signifikant ( $p < 0,001$ ) höher lag, als bei ca. 16 % Sauerstoff, wo diese 80 % betrug. Während der Farbumschlag der Negativkontrolle bei 5,5 % Sauerstoff hoch signifikant überschritten wurde, war der Unterschied zur Negativkontrolle bei 16 % Sauerstoff nicht signifikant (s. Abbildung 22).

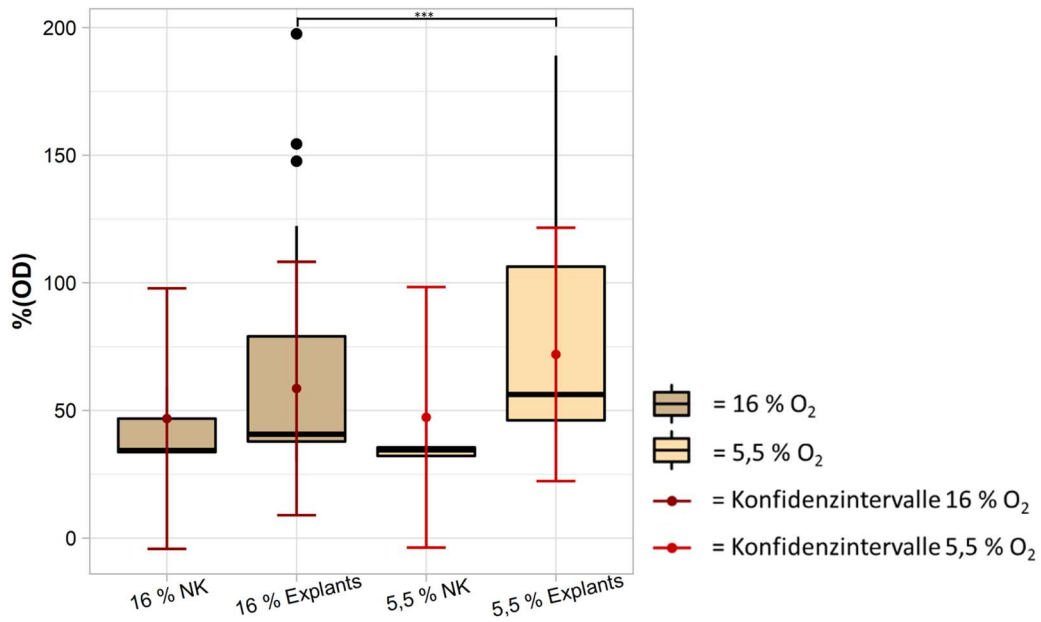


**Abbildung 22: Stoffwechselaktivität der Zitzenzisterne bei ca. 16 % und 5,5 % Sauerstoff vergleichend**

*OD(%) = Optische Dichte nach WST-8-Zusatz gemessen bei 600 nm zu Stunde 30 in Prozent bezogen auf den Median zu Stunde 3, 16 % NK = Stoffwechselaktivität als optische Dichte in Prozent der Negativkontrolle bei einer Sauerstoffkonzentration von 16 %, 16 % Explants = Stoffwechselaktivität als optische Dichte in Prozent der Explants bei einer Sauerstoffkonzentration von 16 %, 5,5 % NK = Stoffwechselaktivität als optische Dichte in Prozent der Negativkontrolle bei einer Sauerstoffkonzentration von 5,5 %, 5,5 % Explants = Stoffwechselaktivität als optische Dichte in Prozent der Explants bei einer Sauerstoffkonzentration von 5,5 %, Zusätzlich zu den Boxplots sind die Konfidenzintervalle abgebildet.*

Im Eutergewebe erreichte die Stoffwechselaktivität bei einer Sauerstoffkonzentration von 5,5 % den Median von 56 % und überschritt hoch signifikant ( $p < 0,001$ ) den Farbumschlag der Negativkontrolle. Bei einer Sauerstoffkonzentration von ca. 16 % konnte bei einem der drei Tiere bereits nach 3 h eine deutlich verringerte Stoffwechselaktivität im Vergleich zu den anderen beiden Tieren und zur Stoffwechselaktivität desselben Tieres bei 5,5 % Sauerstoff festgestellt werden. Der Median der Stoffwechselaktivität lag bei ca. 16 % Sauerstoff nur bei 41 % und somit unter der Vitalitätsgrenze von 50 %. Des Weiteren bestand bei dieser Sauerstoffkonzentration kein signifikanter Unterschied zur Negativkontrolle. Die Stoffwechselaktivität war bei 5,5 % Sauerstoff hoch signifikant ( $p < 0,001$ ) höher, als bei 16 % Sauerstoff (s. Abbildung 23).





**Abbildung 23: Stoffwechselaktivität im Euterparenchym bei ca. 16 % und 5,5 % Sauerstoff vergleichend**

OD(%) = Optische Dichte nach WST-8-Zusatz gemessen bei 600 nm zu Stunde 30 in Prozent bezogen auf den Median zu Stunde 3, 16 % NK = Stoffwechselaktivität als optische Dichte in Prozent der Negativkontrolle bei einer Sauerstoffkonzentration von 16 %, 16 % Explants = Stoffwechselaktivität als optische Dichte in Prozent der Explants bei einer Sauerstoffkonzentration von 16 %, 5,5 % NK = Stoffwechselaktivität als optische Dichte in Prozent der Negativkontrolle bei einer Sauerstoffkonzentration von 5,5 %, 5,5 % Explants = Stoffwechselaktivität als optische Dichte in Prozent der Explants bei einer Sauerstoffkonzentration von 5,5 %, Zusätzlich zu den Boxplots sind die Konfidenzintervalle abgebildet.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde für die weiteren Versuche eine Sauerstoffkonzentration von 5,5 % gewählt und für die komplette Inkubation der Explants verwendet.

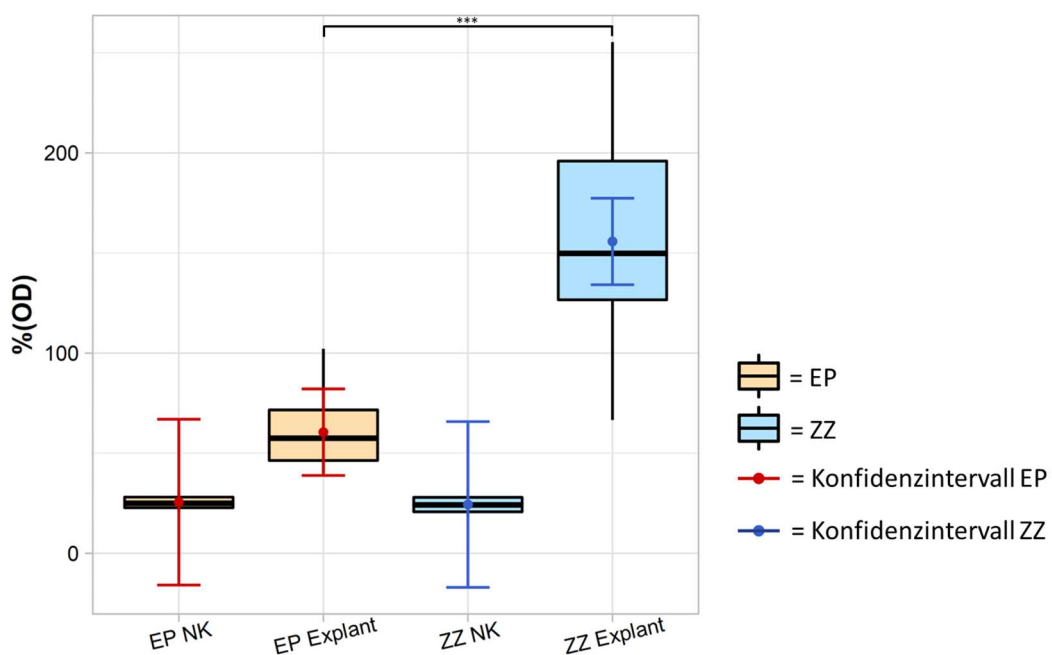
#### 2.1.4. Stoffwechselaktivität der Explants

Zur Verifizierung der Stoffwechselaktivität und somit auch der Vitalität der Explants wurden diese mit allen Zusätzen nach Protokoll von drei beprobten Tieren jeweils am Anfang und am Ende der Inkubationszeit mit WST-8 inkubiert. Auch hier wurde jeweils eine Negativkontrolle mitgeführt und der Median der OD der Stunde drei wurde als 100 % festgelegt, da die gemessenen Werte unabhängig vom Zusatz eine Normalverteilung aufwiesen (s. III.3.2.6). Es konnte auch zu Stunde dreißig kein Unterschied zwischen den einzelnen Zusätzen festgestellt werden, weshalb sie zusammenfassend ausgewertet wurden.



Die Stoffwechselaktivität lag im Euterparenchym mit einem Median von ebenfalls 56 % über der gesetzten Vitalitätsgrenze von 50 % der Stoffwechselaktivität von Stunde drei. Sie wies jedoch keinen signifikanten Unterschied ( $p = 0,067$ ) zur Negativkontrolle auf. In der Zitenzisterne wurde eine Stoffwechselaktivität von 149 % erreicht. Sie übertraf somit sowohl die Stoffwechselaktivität des Euterparenchyms, als auch die Negativkontrolle hoch signifikant ( $p < 0,001$ ).

In der Zitenzisterne war die Stoffwechselaktivität hoch signifikant ( $p < 0,001$ ) höher, als im Euterparenchym, es konnte jedoch bei beiden Lokalisationen von vitalem Gewebe ausgegangen werden (s. Abbildung 24).



**Abbildung 24: Stoffwechselaktivität der Explants im Euterparenchym und in der Zitenzisterne**

*OD(%) = Optische Dichte nach WST-8-Zusatz gemessen bei 600 nm zu Stunde 30 in Prozent bezogen auf den Median zu Stunde 3, EP NK = Stoffwechselaktivität als optische Dichte in Prozent der Negativkontrolle des Euterparenchyms, EP Explants = Stoffwechselaktivität als optische Dichte in Prozent von Überständen des Euterparenchyms, ZZ NK = Stoffwechselaktivität als optische Dichte in Prozent der Negativkontrolle der Zitenzisterne, ZZ Explants = Stoffwechselaktivität als optische Dichte in Prozent von Überständen der Zitenzisterne, Zusätzlich zu den Boxplots sind die Konfidenzintervalle abgebildet.*

## V. DISKUSSION

In der Milchviehhaltung stellt das Auftreten von Mastitiden für Betriebe ein großes wirtschaftliches Problem dar. Ein weiterer besorgniserregender Aspekt sind bisher fehlende Therapiealternativen für den standardmäßigen Einsatz von Antibiotika, da deren vermehrter Einsatz die Gefahr von Resistenzbildungen birgt. Die Schwere einer Euterentzündung hängt stark von der Reaktivität des angeborenen Immunsystems ab. Körpereigene antimikrobielle Peptide spielen in der Immunabwehr des bovinen Euters gegenüber pathogenen Keimen eine erhebliche Rolle. Ihre antimikrobiellen Eigenschaften richten sich dosis-abhängig gegen unterschiedliche Erreger. Dagegen kann eine hochgradige Entzündung mit massiver Zytokinausschüttung neben der erwünschten Erregerabtötung zu einer erheblichen Zerstörung des Eutergewebes und einer ernsthaften Allgemeinerkrankung führen. In dieser Arbeit wurde die Wirkung ausgewählter euterspezifischer antimikrobieller Peptide (AMP) auf relevante Mastitispathogene beim Rind untersucht. Ein weiteres Ziel war es, die Auswirkung wiederholter Stimulation von Eutergewebe mit Mastitispathogenen und deren Bestandteilen auf die Ausschüttung von Zytokinen und antimikrobiellen Peptiden hin zu untersuchen, um Rückschlüsse auf die Pathogen-spezifische Modulation einer Entzündungsreaktion ableiten zu können. Es sollte untersucht werden, ob *in vitro* im Explantmodell der Zustand einer Endotoxintoleranz induziert werden kann, wo bei einer verringerten Expression proinflammatorischer Faktoren gleichzeitig eine Hochregulation antimikrobieller Wirkstoffe erfolgt.

### 1. Einfluss rekombinanter antimikrobieller Peptide/Proteine auf das Wachstum ausgewählter Mastitiserreger

Die Mastitis des Rindes kann durch eine Vielzahl verschiedener Erreger ausgelöst werden. Zu den häufigsten und wirtschaftlich bedeutsamsten Mastitispathogenen zählen die bakteriellen Spezies *Sc. uberis*, *S. aureus* und *E. coli*. Für schwere klinische Mastitiden mit systemischem Endotoxin-vermitteltem Schock sind häufig Umweltinfektionen mit *E. coli* verantwortlich, während *S. aureus* oftmals wiederkehrende, subklinische Mastitiden mit einer Erhöhung der Milchzellzahl hervorruft. *Sc. uberis* kann als häufiger Umwelterreger mit infektiösem Potential in (deutschen) Milchviehbetrieben sowohl zu subklinischen, wiederkehrenden Mastitiden, als auch zu akuten Erkrankungen führen (HILL, 1988; WILLIAMSON et al., 1995;

ZADOKS et al., 2001). Deshalb wurden für die Untersuchung der Wirksamkeit von AMP gegenüber relevanten Mastitiserregern die Stämme *E. coli* 1303, *S. aureus* 1027 und *Sc. uberis* 0140J verwendet, die jeweils aus infizierten und erkrankten Tieren isoliert und bereits für eine Vielzahl von Untersuchungen im Rahmen der Mastitisforschung beim Rind eingesetzt wurden (PETZL et al., 2008; GÜNTHER et al., 2009; GÜNTHER et al., 2011; PETZL et al., 2012; KRENITZ, 2018; MACÍAS LUACES, 2019). Dies sollte ein möglichst hohes Maß an Vergleichbarkeit zwischen den zahlreichen *In-vivo*- und *In-vitro*-Studien herstellen. Die bakterielle Wachstumsrate kann durch unterschiedliche Verfahren bestimmt werden. Über die Anfertigung von Verdünnungsreihen und das mehrfache Ausplattieren der Suspension lassen sich die KBE durch Auszählung nach der Inkubation bestimmen (SIEUWERTS et al., 2008). Sowohl technisch und finanziell weniger aufwendig, als auch einfacher umsetzbar stellt sich die regelmäßige photometrische Messung der OD mit Hilfe eines Microplatereaders dar. Hierüber können z. B. in der Routinediagnostik die minimalen Hemmstoffkonzentrationen von Antibiotika bestimmt werden (BOLLENBACH et al., 2009; KUROKAWA & YING, 2017; MATSUE et al., 2019). Um das Wachstumsverhalten unter Laborbedingungen zu ermitteln und Kontaminationen zu erkennen und zu vermeiden wurden im Vorfeld der Versuchsansätze wiederholt die Wachstumskurven der in dieser Studie eingesetzten Bakterienstämme gemessen. Gleichzeitig wurden regelmäßige Kontrollen durch erneutes Ausplattieren der eingesetzten Bakterienstämme nach Versuchsende durchgeführt. Die hier angewandte Methode des Time-Kill-Assays wurde innerhalb der Arbeitsgruppe bereits von KRENITZ (2018) etabliert und ist vergleichbar mit Protokollen anderer Arbeitsgruppen (RAMANI et al., 2014; ROGERS et al., 2022). KRENITZ (2018) konnte einen direkten Zusammenhang zwischen der KBE und dem Anstieg der OD bei der photometrischen Messung feststellen, weshalb im Rahmen dieser Arbeit fast ausschließlich die Messung der OD zur Analyse des bakteriellen Wachstums herangezogen wurde. Auf diese Weise konnten über sechs Stunden bis zur Verlangsamung der exponentiellen Phase die jeweiligen Wachstumskurven mittels stündlicher Messung aufgezeichnet werden (s. III.3.1). Der Versuchsaufbau erlaubt eine vergleichende Analyse der einzelnen Wachstumskurven mit unterschiedlichen Zusätzen von AMP innerhalb der Versuchsreihe, wobei eine Unterscheidung zwischen toten und lebenden Bakterien nicht möglich ist. Da bisher noch keine einheitliche etablierte Methodik für antimikrobielle Aktivität von AMP verwendet wird, ist ein direkter Vergleich oft schwierig, wodurch absolute Aussagen über die

Bakterienhemmung nur innerhalb des jeweiligen Versuchsaufbaus möglich sind (SCHONWETTER et al., 1995; WIEDOW et al., 1998; YANG et al., 2003; JOLY et al., 2004; LUTZOW et al., 2008; KRENITZ, 2018; ROGERS et al., 2022). Trotz dieser Nachteile stellt der hier eingesetzte Time-Kill-Assay eine zuverlässige und technisch gut umsetzbare Möglichkeit dar, innerhalb kurzer Zeit den Einfluss vieler AMP auf Erreger zu untersuchen (STEVENSON et al., 2016; KRISHNAMURTHI et al., 2021). Als relevante Kandidaten wurden AMP ausgewählt, die physiologisch im bovinen Euter vorkommen und im Rahmen von Entzündungsreaktionen bekanntermaßen auf mRNA-Ebene heraufreguliert werden. Neben den Defensinen DEFB1 und LAP wird bei der bovinen Mastitis unter anderem die Expression der S100-Proteine S100A9, S100A8/A9 und S100A12, von SLPI und des Chemokins CCL20 signifikant gesteigert (TETENS et al., 2010; BOUGARN et al., 2011; GÜNTHER et al., 2012; SMOLENSKI et al., 2015; GÜNTHER et al., 2017b; ZHONG et al., 2018). Neben ihrer Rolle als aktive Immunmodulatoren für das angeborene Immunsystem, besitzen diese eine breite antimikrobielle Wirksamkeit (HILCHIE et al., 2013). Die verwendeten Konzentrationen wurden experimentell im Sinne einer Dosis-Wirkungs-Kinetik ermittelt, da bisher nur wenige publizierte Daten zu Konzentrationen der untersuchten AMP in der Milch, aber keine verlässlichen Angaben zur Konzentration im bovinen Eutergewebe vorliegen (SEMBA, 2000; ISOBE et al., 2009; SHINOZUKA et al., 2022). Weiterhin fand eine grobe Orientierung an den Konzentrationen bisheriger Hemmversuche unter Berücksichtigung der methodischen Möglichkeiten statt (SCHONWETTER et al., 1995; KRENITZ, 2018).

Das Wachstumsverhalten der verwendeten Keime unterschied sich im verwendeten Medium stark. Während *E. coli* über den gemessenen Zeitraum die höchste optische Dichte aufwies, erreichten *S. aureus* und *Sc. uberis* geringere Werte (s. IV.1). In erneuten Vorversuchen wurde mit der Verwendung von BHI-Bouillon zwar eine geringgradige Verbesserung des Wachstums aller Bakterienstämme gemessen, jedoch trat gleichzeitig eine sehr hohe Varianz auf. Während LB-Medium mit 10 g/l NaCl verglichen mit Milch einer an Mastitis erkrankten Kuh einen hohen Salzgehalt besitzt, entspricht der pH-Wert von 7,0 +/- 0,2 annähernd dessen Werten (SALEEM et al., 2021). Auf Grund der stabilen Kultivierbarkeit und zum besseren Vergleich mit vorangegangenen Untersuchungen im Hinblick auf die wachstumshemmenden Eigenschaften antimikrobieller Peptide wurde LB-Medium eingesetzt (KRENITZ, 2018).

### *β-Defensine*

Als vielversprechender Kandidat der  $\beta$ -Defensine zur Eindämmung des Wachstums von *S. aureus* stellte sich in dieser Versuchsreihe rbDEFB1 heraus. Bereits in Konzentrationen ab 5  $\mu\text{g/ml}$  wurde eine signifikante Verringerung der OD im Vergleich zur Positivkontrolle festgestellt (s. IV.1.1). Da es sich hier um ein vergleichsweise teures rekombinantes Peptid handelt konnte hier weder dessen Einfluss auf *E. coli* und *Sc. uberis*, noch eine umfassende Dosis-Wirkungs-Kinetik untersucht werden. Dieses aussichtsreiche Ergebnis und die Tatsache, dass zu diesem Peptid bisher keine weiteren Ergebnisse veröffentlicht wurden, sollte Anlass für nachfolgende Studien geben. Entgegen der Erwartung führte die Zugabe von rbLAP und von rbbLAP bei fast allen Pathogenen zu einer statistisch signifikanten Erhöhung der OD in allen untersuchten Konzentrationen. Während bei rbLAP bei allen Bakterien die OD analog zur Peptidkonzentration anstieg, sank die OD bei zunehmender Konzentration von rbbLAP bei *S. aureus*. Einzig bei *Sc. uberis* ließ sich diese Wirkung durch den Zusatz von rbbLAP in der vergleichsweise hoch eingesetzten Konzentration von 40  $\mu\text{g/ml}$  umkehren und eine Hemmung des Wachstums hervorrufen (s. IV.1.3). Dieser Effekt kann zum einen durch eine Veränderung der Form und der Oberflächenstruktur der Bakterien hervorgerufen werden, was zu einer vermehrten Streuung des einstrahlenden Lichtes führen kann (STEVENSON et al., 2016). Zum anderen könnte LAP bei gleichzeitig fehlender antimikrobieller Wirksamkeit *in vitro* zu einer Aufwertung des Mediums führen und als Nährstoff das Wachstum der Pathogene fördern. Um die Ursache der erhöhten OD sicher festzustellen wäre daher für zukünftige Versuche mit LAP eine parallele Bestimmung der KBE erstrebenswert. Bei klinischen und subklinischen Mastitiden steigt nicht nur die somatische Zellzahl, sondern auch der Salzgehalt in Form von  $\text{Na}^+$  und  $\text{Cl}^-$  in der Milch an (OGOLA et al., 2007; HUANG et al., 2022). Der Gehalt von NaCl im verwendeten LB-Medium (10 g/l) und anderer häufig für Wachstumsstudien verwendeter Medien, wie TSB (5 g/l) ist jedoch dennoch um ein Vielfaches höher, als der messbare Anteil an Ionen in Milch (ca. 0,9 g/l (EL ZUBEIR et al., 2005; OGOLA et al., 2007) von Mastitis-Kühen. Hohe Salzgehalte können die Wirkungsweise von Defensinen zusätzlich einschränken, weshalb die hier durchgeführten Versuche zusätzlich noch mit anderen, weniger NaCl-haltigen Medien möglicherweise andere Ergebnisse brächten (LEHRER & GANZ, 2002). Im Übrigen sollte die Wachstumshemmung von *S. aureus* und *Sc. uberis* auf Grund der tendenziell sinkenden

OD mit zunehmender Peptidmenge zusätzlich mit höheren Konzentrationen untersucht werden. In ähnlichen Untersuchungen mit gleichem Medium, gleichen Bakterienstämmen und demselben Photometer wurde bei allen Pathogenen eine signifikante Wachstumshemmung erreicht (KRENITZ, 2018). Die Ursache dieser Differenz könnte von veränderten/unterschiedlichen Herstellungsbedingungen der antimikrobiellen Peptide, des Mediums oder von der Verwendung einer anderen Charge der Peptide herrühren. Des Weiteren wurde in der vorliegenden Arbeit aus Kostengründen die eingesetzte Höchstkonzentration auf 40 µg/ml begrenzt, wobei in der vorangegangenen Studie bereits ab 43 µg/ml eine signifikante Wachstumshemmung der drei Bakterienstämme aufgezeichnet werden konnte. Frühe Versuche mit LAP zeigten für *E. coli* D31 eine MICs von 16 – 32 µg/ml und für *S. aureus* 29213 von 63 – 125 µg/ml (SCHONWETTER et al., 1995). Abweichungen der Bestimmungsmethoden, der Herstellung eingesetzter AMP und Bakterienstämme könnten für die Unterschiede in den Ergebnissen also entscheidend sein. Mit Hilfe eines radialen Diffusionsassays konnte sowohl eine antibakterielle Wirkung humaner  $\beta$ -Defensine, als auch von LAP gegen andere *E. coli*-Stämme festgestellt werden (JOLY et al., 2004; ISOBE et al., 2009). JOLY et al. (2004) konnten mit Hilfe eines radialen Diffusionsassays eine antibakterielle Wirkung humaner  $\beta$ -Defensine gegen einen anderen *E. coli*-Stamm feststellen, wobei sie gleichzeitig Resistenzen anaerober Bakterien gegenüber Defensinen messen konnten. Trotz der hohen Genkonservation und somit einer geringen Resistenzlage von AMP kann auch diese Möglichkeit nicht komplett ausgeschlossen werden (VOUILLE et al., 1997; YEAMAN & YOUNT, 2003; CHANU et al., 2018; MARON et al., 2022).

### *S100-Proteine*

Die hier eingesetzten S100-Proteine zeigten großes Potential das Wachstum der Bakterien Pathogen- und Konzentrations-abhängig zu hemmen. Die humane Rekombinante des Heterodimers S100A8/A9 führte nur bei *E. coli* zu einer signifikanten Verringerung des Wachstums, wobei sich die Wachstumskurven aller Konzentrationen jedoch der Positivkontrolle annäherten (s. IV.1.4). Innerhalb der untersuchten S100-Proteine stellte sich rbS100A9 als Vertreter mit dem höchsten antimikrobiellen Potential dar. Während bei *S. aureus* eine Konzentrations-abhängige Verringerung der OD zu beobachten war, wurde das Wachstum von *Sc. uberis* in allen Konzentrationen komplett unterbunden (s. IV.1.5). Mit dem Zusatz von rbS100A12 konnten *S. aureus* und *Sc. uberis* mit zunehmender Konzentration

signifikant gehemmt werden, wobei das Protein bei *E. coli* und in der niedrigsten eingesetzten Dosis auch bei *S. aureus* zu einer Zunahme der OD führte (s. IV.1.6). LUTZOW et al. (2008) konnten anhand eines Bouillon-Mikrodilutionsassays *in vitro* bei 620 nm über 18 h ab Konzentrationen von 12,5 µg/ml rbS100A12 eine signifikante Verringerung des Wachstums von *E. coli*, aber nicht von *S. aureus* messen. Auch dieser Versuchsreihe kann bei *S. aureus* tendenziell eine Steigerung der OD durch den Zusatz von S100A12 entnommen werden. Die antimikrobielle Wirkung der Proteine scheint somit nicht nur Pathogen-, sondern auch Stamm-abhängig zu sein. Im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Arbeit konnte bereits eine direkte antimikrobielle Aktivität gegen *S. aureus* durch hrS100A8/A9 in Konzentrationen ab 25 µg/ml anhand eines Time-Kill-Assays nachgewiesen werden. Gleichzeitig wurde die OD von *S. aureus* durch den Zusatz des Homodimers S100A9 in der vorangegangenen Studie nicht verändert. Für *in vitro* Ansätze, wo nur die antimikrobiellen Eigenschaften der S100-Proteine zu tragen kommen und keine Verstärkung dieser Effekte durch Immunmodulation erreicht werden kann, ist die Kombination des verwendeten Peptids und des Bakterienstamms somit wahrscheinlich ausschlaggebend für eine erfolgreiche Wachstumshemmung. Auch das eingesetzte Kulturmedium ist entscheidend für die Wirkung. Da die antimikrobielle Wirkung auf der Bildung von Chelatkomplexen beruht, ist sowohl die Konzentration von Ionen, wie  $\text{Ca}^{2+}$  oder  $\text{Zn}^{2+}$ , als auch die Abwesenheit dieser bei der Isolation der S100-Proteine für ihre Wirkung entscheidend (CORBIN et al., 2008). Für das hier verwendete LB-Medium stehen vom Hersteller keine weiteren Mengenangaben zu den enthaltenen Ionen zur Verfügung. Bereits STEINBAKK et al. (1990) konnte bei der Kultivierung von *S. aureus* und *E. coli* mit S100A8/A9 Unterschiede der Hemmhofgrößen bei der Verwendung unterschiedlicher Agarböden nachweisen. Bei Versuchen mit Mueller-Hinton-Agar wurden mit den MHK von 256 µg/ml S100A8/A9 für *E. coli* und 46 µg/ml S100A8/A9 für *S. aureus* deutlich höhere Konzentrationen benötigt, als in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden. Werden die S100-Proteine im Organismus gebildet sorgen posttranslationale Veränderungen für die Entstehung verschiedener Isoformen mit unterschiedlichen biologischen Funktionen (VOGL et al., 2012). Abweichungen und Unterschiede bei der synthetischen Herstellung oder von isolierten tierischen Proteinen können somit ebenfalls eine Ursache für die abweichenden Ergebnisse unterschiedlicher Studien darstellen, wie SINGH and ALI (2022) zusammenfassend darstellten.

### *SLPI*

Eine Stimulation der Ansätze mit rhSLPI führte bei allen Bakterien zu einer Steigerung der OD, welche mit den Ergebnissen von LAP vergleichbar waren (s. IV.1.7). In der Vergangenheit konnte anhand eines antibakteriellen Assays nach 2 h eine direkte antimikrobielle Aktivität von SLPI gegen *S. aureus* und *E. coli* gemessen werden, wobei die verwendeten Mengen mit 4,7 – 31,9  $\mu\text{M}$  deutlich über der hier eingesetzten Höchstmenge (umgerechnet 2,4  $\mu\text{M}$ ) lag. (HIEMSTRA et al., 1996). WIEDOW et al. (1998) konnte bereits ab einer Konzentration von 2,5  $\mu\text{M}$  eine Verringerung des Wachstums von *E. coli* um 50 % verursachen, wobei die Werte von *S. aureus* mit 4,5  $\mu\text{M}$  ebenso deutlich darüber lagen. In beiden Versuchen wurde mit TSB gearbeitet. Eine weitere Konzentrationserhöhung für Untersuchungen anhand des Time-Kill-Assays sollte somit in Zukunft in Betracht gezogen werden, um eine fehlende Wirkung gegenüber dieser Mastitispathogene sicher auszuschließen. Des Weiteren wurde auf Grund des fehlenden Angebots eine humane Rekombinante des Peptids verwendet, wodurch eine abweichende Wirkung der bovinen Rekombinante gegenüber der bovinen Mastitispathogene möglich wäre. Wie bei den Stimulationsansätzen mit LAP kann die Steigerung der OD bei zunehmender Konzentration mit einer Aufwertung des Mediums als Bakteriennährstoff oder einer Veränderung der Zelloberfläche erklärt werden.

### *CCL20*

Während in der Kombination von rbCCL20 mit *E. coli* sogar eine Steigerung des Wachstums auffiel, konnte bei *S. aureus* und *Sc. uberis* eine starke Annäherung an die Negativkontrolle und somit eine starke Wachstumshemmung bei zunehmender Konzentration gemessen werden (s. IV.1.2). Es wurde mit Hilfe eines antimikrobiellen Assays in der Vergangenheit bereits eine Reduktion des Wachstums von *E. coli* auf die Hälfte der Kolonien (LD(50)) mit einer Konzentration von 0,4  $\mu\text{g/ml}$  hrCCL20 und bei *S. aureus* mit 10  $\mu\text{g/ml}$  hrCCL20 erreicht. Ähnlich wie bei der Wirkung von  $\beta$ -Defensinen (s. LAP) konnten die Autoren der Studie gleichzeitig eine Verschlechterung der antimikrobiellen Aktivität ab einer NaCl-Konzentration von umgerechnet ca. 5,8 mg/l nachweisen (YANG et al., 2003). Die Natriumkonzentration des hier verwendeten Mediums enthielt mit 10 g/l deutlich höhere Werte, was sich somit negativ auf die Wirksamkeit des Peptids auswirken könnte. Dieser Effekt wurde bei *S. aureus* in dieser Arbeit dadurch sichtbar, dass höhere Werte als 20  $\mu\text{g/ml}$  notwendig waren um eine LD (50) zu erreichen (s. IV.1.2). Eine mögliche



Verringerung der Hemmkonzentrationen sollte in Zukunft auch mit salzarmen Medien untersucht werden. Somit konnten wir ebenfalls bestätigen, dass CCL20 zusätzlich zu seinen proinflammatorischen Eigenschaften wie beschrieben eine Pathogen-abhängige antimikrobielle Aktivität aufweist (RANASINGHE & ERI, 2018).

Mit Hilfe dieser Arbeit konnte folglich eine Pathogen-abhängige, Peptid-abhängige und Konzentrations-abhängige Veränderung des Wachstums von Bakterien *in vitro* nachgewiesen werden. Die Mastitispathogene *S. aureus* 1027 und *Sc. uberis* 0140J zeigten sich insgesamt sensitiver gegenüber der eingesetzten AMP, als *E. coli* 1303 (s. IV.1). Im Vergleich zu anderen Studien bestätigen die Ergebnisse zwar die antibakterielle Wirksamkeit von AMP, aber sie weisen ebenso auf eine starke Abhängigkeit der *In-vitro*-Wirksamkeit von unterschiedlichen Faktoren, wie der Beschaffenheit des Mediums, der Sensitivität unterschiedlicher Bakterienstämme und des Ursprungs der AMP hin. Das hier eingesetzte Medium stellte durch seinen hohen Salzgehalt zwar eine Annäherung an die Pathologie einer Euterentzündung dar, dieser Umstand kann aber gleichzeitig für eine Verringerung der antimikrobiellen Wirkung einiger AMP verantwortlich gemacht werden. Um eine wachstumshemmende Wirkung der eingesetzten Peptide LAP und SLPI gegenüber der Mastitispathogene definitiv auszuschließen, sollte in Zukunft zusätzlich eine Konzentrationssteigerung, ein Vergleich unterschiedlicher Hersteller der Peptide und ein Vergleich verschiedener Medien in Betracht gezogen werden. Für eine genauere Untersuchung der antimikrobiellen Wirkungsweise der AMP im infizierten Euter und um das Auftreten von Resistenzen zu vermeiden sollten auch Kombinationen der unterschiedlichen AMP, wie sie physiologisch vorkommen, untersucht werden (MARON et al., 2022). Im Moment stellen hohe Herstellungskosten, die verringerte Wirksamkeit bei höheren NaCl-Konzentrationen, und ihre Anfälligkeit für Proteolyse noch große Hürden für eine Einführung eines standardmäßigen Einsatzes in der Milchviehhaltung dar (STARR & WIMLEY, 2017). Es gibt aber z. B. durch eine Veränderung ihrer Molekularstruktur bereits mehrere Ansätze diese zu überwinden (SOUZA et al., 2018). Auf Grund der vielversprechenden Ergebnisse dieser Studie und der Eigenschaft einiger AMP im Organismus als Immunmodulatoren die Erregerabwehr zusätzlich zu unterstützen, stellen AMP potente Kandidaten im Einsatz und in der Prävention gegen bakterielle Mastitiden dar, um die Anwendung von Antibiotika in Zukunft zu verringern (BOWDISH et al., 2005;

ZHANG et al., 2007; ROQUE-BORDA et al., 2021).

## **2. Untersuchungen zum Einfluss einer bakteriellen Restimulation auf die Reaktivität mammären Gewebes (Explantmodell)**

Zur Vermeidung von unnötigen Schmerzen und Schäden der Versuchstiere wurde auf einen Tierversuch verzichtet und es wurden nur die Organe bereits geschlachtete Tiere verwendet (EU, 2010). Anhand eines Explantmodells wurde die Reaktion der Zitzenzisterne und des Eutergewebes auf eine Stimulation mit LPS und einer Restimulation mit *S. aureus* oder *E. coli* untersucht. Die Methodik der Explantentnahme wurde in Anlehnung an MACÍAS LUACES (2019) durchgeführt und war bereits innerhalb der Arbeitsgruppe mehrfach erfolgreich eingesetzt worden (LIND et al., 2015; ROHMEIER, 2018). Ungewollte Einflüsse auf die Gewebereaktivität durch eine natürliche intramammäre Infektion sollten größtmöglich vermieden werden. Um Explants eutergesunder Tiere zu erhalten erfolgte vor der Auswahl eine adspektorische und palpatorische Begutachtung des Euters. Die Milch ausgewählter Eutervierviertel betrug immer < 500.000 Zellen/ml, um klinische und subklinische Mastitiden auszuschließen, und wies in der anschließenden bakteriellen Untersuchung ein negatives Ergebnis auf (s. III.2.7). Organe, die diese Kriterien nicht erfüllten wurden im Weiteren nicht verwendet. Der Grenzwert für die Zellzahl der Milch wurde auf Grund von Faktoren, wie der steigenden Zellzahlen durch den Stress vor der Schlachtung und durch Zellstress *post mortem*, vom Grenzwert für subklinische Mastitiden von 200.000 angehoben (BRADLEY & GREEN, 2005; ATAKISI et al., 2010; OBERBERGER, 2019). Alle Untersuchungen mussten unmittelbar nach der Schlachtung des Tieres durchgeführt werden. Um die vollständige Perfusion des Gewebes durch das Medium und gleichzeitig eine ausreichende Menge an mRNA zu erhalten wurden die Explants auf die gleiche definierte Größe von 2 x 2 mm zugeschnitten und zusätzlich für eine optimale Glukoseversorgung der Zellen Insulin hinzugefügt. Der Zusatz von Antimykotikum und Antibiotikum sollte mikrobielle Besiedelung unterbinden (LIND, 2011). Da die physiologische Sauerstoffkonzentration in Milchdrüsengewebe mit ca. 8 % beim Menschen, die von Milch mit ca. 3 % und die des Blutes aus der Milchvene mit ca. 4-9 % deutlich von der des Raumsauerstoffgehalts von ca. 16 % des Inkubators abweicht wurden Vorversuche mit unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen durchgeführt

(MAYER et al., 1988; TATUM et al., 2006; FENG et al., 2022; PAWLIŃSKI et al., 2023). Nach der signifikanten Verbesserung der Stoffwechselaktivität durch eine Verringerung der Sauerstoffkonzentration auf 5,5 % wurde diese Konzentration für alle Versuche beibehalten (s. IV.2.1.3) (SCHABMEYER et al., 2021; KNEIDL, 2022). Die Stimulation der Explants orientierte sich an einem vorangegangenen *In-vivo*-Versuch der Arbeitsgruppe (PETZL et al., 2012). Auf Grund seiner Eigenschaften als PAMP/Endotoxin, welches gleichzeitig Bestandteil der Zellmembran von *E. coli* ist, wurde LPS für die erste Stimulation verwendet (WU et al., 2020). Für die Restimulation wurde in Anbetracht ihrer hohen Relevanz bei Mastitiden *E. coli* 1303 und *S. aureus* 1027 - dieselben Bakterienstämme, wie beim Time Kill Assay - verwendet. Da bei Vorversuchen mit der angewandten Methodik bei *Sc. uberis* kein Einfluss auf die Gewebereaktivität gemessen worden war, wurde aus technischen Gründen auf die Versuchsansätze mit *Sc. uberis* verzichtet. Die Konzentration der hitzeinaktivierten Bakterien betrug  $10^8$  KBE/ml (MACÍAS LUACES, 2019). Die eingesetzten Inkubationszeiten orientierten sich einerseits an ähnlichen Studien am lebenden Tier und in der Zellkultur und andererseits an der zeitlichen Umsetzbarkeit im Labor (GÜNTHER et al., 2012; PETZL et al., 2012). Wenn Zellen nach vorangegangenem Kontakt zu einem Endotoxin nicht mehr vollumfänglich auf eine erneute Auseinandersetzung mit einem Endotoxin durch die Expression von Zytokinen reagieren, spricht man von einer Endotoxintoleranz (PENA et al., 2011). In vorangegangenen *In-vivo*- und *In-vitro*-Versuchen wurde die Etablierung einer Endotoxintoleranz von Eutergewebe nach einer primären Stimulation mit LPS und einer Restimulation mit *E. coli* bereits nachgewiesen. Im Falle einer Endotoxintoleranz des Gewebes wäre mit einer Senkung der Zytokin-Transkription bei gleichzeitiger Steigerung der AMP-Transkription nach Restimulation durch die eingesetzten hitzeinaktivierten Bakterien zu rechnen. Durch die verringerte Konzentration an Chemokinen würde auch die chemotaktische Aktivität gegenüber PMN abnehmen. (KALIVODA, 2010; GÜNTHER et al., 2012; PETZL et al., 2012; GÜNTHER et al., 2017b). Zur Kontrolle der Vitalität wurde bei drei Kühen parallel die Änderung der Stoffwechselaktivität im Vergleich zum Beginn des Versuchs gemessen, wobei die ZZ deutlich höhere Werte, als das EP aufwies. Des Weiteren wurden die jeweiligen RQI-Werte der Gesamt-RNA gemessen, um über die RNA-Integrität Hinweise auf die Explant-Qualität zu erhalten. Auch hier waren die Werte der Zitzenzisterne deutlich höher, als die des Euterparenchyms. Dieser Lokalisations-abhängige Unterschied konnte

bereits bei MACÍAS LUACES (2019) beobachtet werden. Vermutlich hat die unterschiedliche Gewebezusammensetzung einen großen Anteil an diesem Unterschied, wobei bis zum jetzigen Zeitpunkt keine genaue Analyse zur Zusammensetzung und Funktion der Zellen vorliegt (WHELEHAN et al., 2011; ZALEWSKA et al., 2020). Bekannt ist jedoch, dass sich in den Explants der Zitenzisterne neben Schleimhautepithel vor allem Bindegewebszellen und Muskelzellen befinden. In Explants des Drüsengewebes sind dagegen vermutlich größtenteils funktionelle Milchdrüsenepithelzellen vorhanden, wobei das Gewebe durch die vorhandenen Alveolen insgesamt weniger dicht aufgebaut ist (LIMA et al., 2016; HUANG et al., 2019). Erschwerte Bedingungen, wie z. B. die Auswahl der Tiere nach der Schlachtung sorgten für längere Wartezeiten bei der Gewinnung des Gewebes. Dies könnte ebenso zu einer Verschlechterung der RQI-Werte und der Stoffwechselaktivität führen. Beide Gewebearten befinden sich bei diesen Messungen dennoch innerhalb der erforderlichen Grenzwerte (s. IV.2.1.2, IV.2.1.4) (BUSTIN et al., 2009; MACÍAS LUACES, 2019). Diese Tatsache und eine signifikante Stimulierbarkeit des Gewebes lassen auf einen intakten Stoffwechsel aller untersuchten Explants schließen.

### **2.1. Einfluss der Explantstimulation auf die Reaktivität von PMN**

Die am Ende des Versuchs gewonnenen Überstände der Explants wurden nach Beendigung des Stimulationsversuchs auf ihre chemotaktische Funktionalität untersucht. Da erfahrungsgemäß die Separierbarkeit und die Funktionalität gewonnener PMN von Spendertieren interindividuellen und intraindividuellen Schwankungen unterliegen wurde im Gegensatz zu vorangegangenen Versuchen das Blut zur Separation der immer gleichen drei Tiere gepoolt. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von MACÍAS LUACES (2019), von welcher Arbeit auch die Methodik für den Chemotaxisassay übernommen wurde, zeigten die Überstände von Explants beider Gewebe, die nicht stimuliert wurden, keine chemotaktische Aktivität und somit auch keinen signifikanten Unterschied zur Negativkontrolle. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass kein voraktiviertes Gewebe verwendet wurde. Auch migrierten insgesamt mehr PMN in Richtung der Überstände der Zitenzisterne, als in die des Euterparenchyms (s. IV.2.1.1). Folglich sezernierte das Gewebe der Zitenzisterne auch mehr chemotaktisch aktive Substanzen nach Bakterienkontakt, als das Gewebe des EPs. Als Gewebe, das als erstes mit eintretenden Pathogenen in Kontakt kommt, reagiert die Zitenzisterne auf molekularer Ebene sehr schnell

durch Änderung der Transkription (PETZL et al., 2016). In den ersten 12 h nach der Infektion mit *E. coli* wird die Expression von *CXCL8* und anderer Chemokine in der Zitzenzisterne und in der Drüsenzisterne *in vivo* im Vergleich zum Euterparenchym sehr stark heraufreguliert. Das Euterparenchym folgt dieser Entwicklung zeitversetzt nach 24 h (RINALDI et al., 2010). Die Entnahme der Überstände erfolgte ebenso 12 h nach der Bakterienstimulation, wobei der Kontakt *in vitro*, anders als *in vivo* zeitgleich stattfand (s. III.3.2.5). Während in den Überständen der Zitzenzisterne kein Unterschied zwischen allen Ansätzen messbar war, die Bakterien enthielten, zeigte sich die Zahl an gewanderten PMN in den Überständen des Euterparenchyms differenzierter. Durch vorherige Stimulation mit LPS in den Stimulationsansätzen mit *E. coli* konnte eine Tendenz zu einer verringerten chemotaktischen Aktivität der Überstände gemessen werden, was tendenziell auf eine eingetretene Endotoxintoleranz hindeutet (s. IV.2.1.1) (FOSTER et al., 2007). Die Reaktivität der PMN in Ansätzen mit *S. aureus* im EP war im Vergleich zu *E. coli* jedoch signifikant niedriger, wobei sie sich mit zunehmender Konzentration bei zugesetztem LPS signifikant verstärkte (s. IV.2.1.1). Dieses Phänomen kann damit erklärt werden, dass die Lipopeptide und die LTA der Zellwand von *S. aureus* eine geringere stimulierende Wirkung, als LPS aufweisen und somit eine differente und geringere (Zytokin-) und Chemokinausschüttung im Gewebe hervorrufen (WELLNITZ et al., 2011). Symptomatisch äußert sich eine Infektion mit *S. aureus* je nach Stamm beim Rind deshalb in den meisten Fällen als subklinische Mastitis (MAITY et al., 2020). Der hier verwendete Stamm löst klinisch *in vivo* bekanntermaßen ebenso subklinische Mastitiden aus (PETZL et al., 2018).

## **2.2. Expressionssteigerung von Zytokinen und antimikrobiellen Peptiden nach wiederholter Stimulation**

Auf molekularer Ebene wurde die Chemokin- und Zytokinexpression durch die mRNA-Extraktion und durch anschließende RT-qPCR untersucht, wobei die Proben des Doppelansatzes jeweils gepoolt wurden, um lokalisationsbedingte Unterschiede des gewonnenen Gewebes auszugleichen. Zur Untersuchung des Gewebes auf die Etablierung einer möglichen Endotoxintoleranz wurde zum einen die Expression der Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 und TNF- $\alpha$  und zum anderen die Expression der AMP S100A9 und LAP untersucht. Die ausgewählten Gene spielen für den Verlauf von Euterentzündungen eine große Rolle und ihre Transkription wird in Zuge dessen Erreger-abhängig gesteigert (PETZL et al., 2016). Weiterhin

unterliegen die untersuchten Gene einer Endotoxintoleranz im Eutergewebe (GÜNTHER et al., 2012; PETZL et al., 2012).

Die Basisexpression war bei allen untersuchten Genen mit Ausnahme von LAP signifikant niedriger, als nach der Zugabe von eingesetzten Zusätzen. Somit war die Stimulation der Explants durch Bakterien oder ihre Bestandteile erfolgreich und die niedrigen Basisexpressionen deuten gleichzeitig darauf hin, dass das Ausgangsgewebe nicht voraktiviert war (LAHOUASSA et al., 2007).

Je nach Gen unterschied sich die Expression in den einzelnen Geweben stark voneinander. Während bei *CXCL8*, *TNF* und *IL-6* keine gewebespezifischen Unterschiede erkennbar waren, wurden *IL-1 $\beta$* , *LAP* und *S100A9* in der Zitenzisterne signifikant höher exprimiert, als im Euterparenchym (s. IV.2.1.2). Starke Unterschiede im Aufbau der Gewebe sind vermutlich der Hauptgrund für diese Resultate (s. V.2). Bereits innerhalb der Lokalisation Zitze gibt es zwischen dem Gewebe der Zitenzisterne und der Fürstenberg'schen Rosette Lokalisations-abhängige signifikante Unterschiede in der Zytokinexpression (LIND, 2011). Die erhöhte Expression in der Zitenzisterne kann vermutlich ebenso erklärt werden, wie die erhöhte Wanderung von PMN im Chemotaxisassay in die Überstände der Zitenzisterne, da es sich um ein Grenzgewebe handelt, welches konstanter Pathogen-Exposition ausgesetzt ist (s. V.2.1) (RINALDI et al., 2010). Das Ergebnis der RT-qPCR könnte ebenso die geringere chemotaktische Aktivität der Überstände des Euterparenchyms begründen. IL-8 wurde als hauptverantwortliches Chemokin zwar in beiden Geweben gleich stark exprimiert, aber IL-1 $\beta$ , das unter anderem für die Hochregulation von Chemokinen verantwortlich ist, wurde im Euterparenchym signifikant geringer exprimiert. Weitere chemotaktisch aktive Moleküle, wie z. B. andere CXC-Chemokine, die bei einer Entzündung sezerniert werden (z. B. *CXCL3*) wurden hier nicht untersucht, könnten aber für eine gesteigerte Migration von PMN in der Zitenzisterne verantwortlich sein (CARRERO et al., 2012; DE FILIPPO et al., 2013). PETZL et al. (2016) konnten nachweisen, dass *in vivo* nach dreistündiger Infektion mit *S. aureus* und *E. coli* sowohl Lokalisations-abhängige, als auch Erreger-abhängige Unterschiede in der Expression von Zytokinen und AMP bestehen. In deren Studie wurden *S100A9*, *LAP* und *TNF* in der Zitenzisterne signifikant höher exprimiert, als im Euterparenchym. Das deckt sich mit den vorliegenden Ergebnissen, wobei *S100A9* und *LAP* im Euterparenchym ebenfalls signifikant geringer transkribiert wurden, als in der Zitenzisterne.

Im Gegensatz zu anderen *In-vitro*- und *In-vivo*-Versuchen wurde die Expression von *TNF* nur sehr geringgradig durch die bakterielle Stimulation gesteigert und es wurde insgesamt am niedrigsten exprimiert, wodurch kein signifikanter Unterschied zwischen den Geweben messbar war (s. IV.2.1.2) (WELLNITZ & KERR, 2004; LAHOUASSA et al., 2007; MURPHY et al., 2019; AKHTAR et al., 2020; FILOR et al., 2022). In einer Studie von RABOT et al. (2007) konnte die Stimulation mit 10 µg/ml LPS von Eutereexplants mit ähnlicher Inkubationszeit ebenfalls keine Steigerung der *TNF*-Expression auslösen. Für die fehlende Reaktion des Gewebes könnte eine zu niedrige eingesetzte Konzentration der Bakterienverantwortlich sein, da für die übrigen genannten Studien jeweils eine vielfache Konzentration verwendet wurde. Eine frühzeitige Herabregulation nach einer initialen Steigerung der Expression ist ebenfalls nicht auszuschließen. Während die Ergebnisse der anderen untersuchten Gene für die Stimulation mit *E. coli* und *S. aureus* ungefähr denen des Vorgängerprojekts von MACÍAS LUACES (2019) entsprachen, waren die erzielten Ergebnisse in der vorliegenden Studie zur *TNF*-Expression wider Erwarten niedrig. Dort wurde in beiden Geweben und bei Zugabe derselben Bakterienkonzentrationen eine signifikante Steigerung der *TNF*-Expression gemessen, wobei die Inkubationszeit um sechs Stunden länger war, als in diesem Versuch. Das lässt darauf schließen, dass die Expression nicht nur von der Konzentration, sondern auch von der Länge der Inkubationszeit abhängt. Dieser Vermutung steht das Ergebnis von LIND (2011) entgegen, welche bereits nach dreistündiger Stimulation mit 20 µg/ml LPS eine signifikante Steigerung der *TNF*-Expression nachweisen konnte. In allen drei Studien wurde die gleiche Primer-Sequenz verwendet.

Bei allen untersuchten Zytokinen, außer bei *TNF* war die Expression von Geweben, die mit *S. aureus* stimuliert wurden im Vergleich zu Geweben, die mit *E. coli* stimuliert wurden tendenziell bis signifikant geringer. Mit zunehmender LPS-Konzentration stieg sie bei der Restimulation mit *S. aureus* jedoch ebenso tendenziell an (s. IV.2.1.2). Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen des Chemotaxisassays (s. IV.2.1.1). GÜNTHER et al. (2011) konnten feststellen, dass *E. coli* in pbMEC die Transkription schneller und von mehr Genen aktivieren kann, als eine Stimulation mit *S. aureus*. Darunter fallen unter anderem auch die hier untersuchten Zytokine. Dieses Ergebnis konnte in einigen *In-vitro*-Studien in ähnlicher Weise reproduziert werden (BANNERMAN et al., 2004; GILBERT et al., 2013; ISLAM et al., 2020). Ein Grund für die geringere Antwort des Gewebes auf *S. aureus*, als

auf *E. coli* kann ein schneller Abfall der Immunreaktion nach der Infektion sein, während die Expression nach Kontakt mit *E. coli* auf einem hohen Niveau andauert, wobei im vorliegenden Versuch die Untersuchung des Gewebes direkt im Anschluss an die Inkubation der Bakterien durchgeführt wurde (LAHOUASSA et al., 2007). Die Ursache für die unterschiedliche Zytokinexpression und damit auch für die unterschiedliche klinische Ausprägung liegt höchstwahrscheinlich an der Aktivierung unterschiedlicher Signalwege mit unterschiedlicher Stärke des angeborenen Immunsystems. (YANG et al., 2008; GILBERT et al., 2013; GÜNTHER et al., 2017a; TSUGAMI et al., 2021). Während *E. coli* nach Bindung von TLR3-Rezeptoren über NF- $\kappa$ B eine starke und schnelle Induktion von Zytokinen auslöst, bindet *S. aureus* häufig nur schwach an TLR2 oder ist sogar dazu in der Lage diesen Signalweg komplett zu unterbinden (MURPHY et al., 2019).

GRIESBECK-ZILCH et al. (2008) konnten zwar ebenso feststellen, dass *E. coli* bei MEC ebenso zu einer tendenziell bis signifikant höheren Steigerung der Zytokinexpression führt, als *S. aureus*, aber *CXCL8* und *IL-6* wurden dort deutlich geringer exprimiert, als *IL-1 $\beta$*  und *TNF*. In der vorliegenden Arbeit wurde *IL-8* als wichtiges Chemokin in beiden Gewebe-Lokalisationen signifikant höher, als die anderen untersuchten Zytokine exprimiert (CASWELL et al., 1999). In ähnlichen *In-vitro*-Studien war die Expression dieses Gens ebenfalls vergleichsweise hoch ausgeprägt (MCCLENAHAN et al., 2005; GÜNTHER et al., 2011; MACÍAS LUACES, 2019; CHEN et al., 2022). Wie zu erwarten war, zeigte sich die Expression nach der Stimulation mit *S. aureus* zwar tendenziell niedriger, als mit *E. coli*, aber es wurde kein signifikanter Unterschied gemessen. Der Zusatz von *E. coli* konnte die Expression im Vergleich zu LPS 1  $\mu$ g/ml und LPS 20  $\mu$ g/ml bei *IL-6*, *IL-8* und *IL-1 $\beta$*  signifikant steigern (s. IV.2.1.2), was vermutlich an der höheren LPS-Konzentration der Bakteriensuspension lag (LOPES et al., 2010).

Die beiden untersuchten AMP *LAP* und *S100A9* wurden in der Zitzenzisterne signifikant höher exprimiert, als im Euterparenchym. Somit sind die Ergebnisse der Stimulation mit *S. aureus* und *E. coli* den gemessenen mRNA-Werten von MACÍAS LUACES (2019) sehr ähnlich und damit innerhalb der Methodik gut reproduzierbar. *S100A9* wurde mit allen Zusätzen in beiden Geweben und auch in der Basisexpression signifikant höher exprimiert, als *LAP*. Im Euterparenchym zeigte sich bei der Stimulation mit *S. aureus* abermals eine tendenziell geringere Expression von *S100A9*, wobei ansonsten keine Unterschiede in der Expression nach der



Zugabe der Zusätze erkennbar war (s. IV.2.1.2). Dass jeweils mit dem Zusatz von *S. aureus* keine signifikante Hochregulation der AMP-Expression stimuliert werden konnte deckt sich mit den Ergebnissen von FILOR et al. (2022), die anhand von „Precision cut bovine udder slices“ (PCBUS, Präzisionsschnitte von bovinen Euterstücken) die Stimulation mit *S. aureus* im Vergleich zu pbMEC untersuchte. Sowohl *SI00A9* als auch *LAP*, aber auch *CXCL8* zeigten keine signifikante Änderung der Expression nach Zugabe von  $2,5 \times 10^7$  *S. aureus* nach einer Inkubationszeit von 6 h.

Es konnte demnach weder eine signifikante Reduktion der Zytokin-Expression, noch eine Steigerung der AMP-Expression durch eine Restimulation der Explants gemessen und somit auch keine Endotoxintoleranz in den unterschiedlichen Geweben induziert werden. Lediglich die tendenzielle Abnahme der Expression bei mit LPS prästimulierten Explants im Vergleich zu Explants, die nur durch *E. coli* stimuliert wurden lässt vermuten, dass sich durch Modifikationen in einem Explantmodell möglicherweise eine Endotoxintoleranz induzieren lässt. Eine Möglichkeit wäre eine Angleichung der Inkubationszeiten an die *In-vitro*-Versuche mit MEC, z. B. die Verlängerung der LPS-Inkubationszeit auf 12 Stunden oder eine Verkürzung der Inkubationszeit nach Zugabe der Bakteriensuspensionen. Für die Prästimulation der MEC wurden mit  $0,1 \mu\text{g/ml}$  LPS außerdem sehr viel geringere Konzentrationen als in diesem Versuch verwendet (GÜNTHER et al., 2012). Aus methodischen Gründen wurde hier auf eine Untersuchung der Produktebene verzichtet. Um in Zukunft im Anschluss an eine eventuell erfolgreiche Herabregulation der mRNA genauere Aussagen über das Erreichen einer Endotoxintoleranz zu erhalten, könnte z. B. über einen ELISA oder einen Alpha-LISA nicht nur die Transkription, sondern auch die Translation überprüft werden (BUSTIN et al., 2009). Die Anpassung des verwendeten Mediums durch das Hinzufügen oder Weglassen bestimmter Komponenten könnte ebenfalls zu einer Änderung der Ergebnisse führen. Das hinzugefügte Hydrocortison könnte insgesamt zu einer Einschränkung der Expression von Entzündungsfaktoren und vor allem von *TNF* und somit zu weniger signifikanten Unterschieden geführt haben (SILVA et al., 2017). Eine Anreicherung des Mediums mit fetalem Kälberserum könnte durch die verbesserte Versorgung der Explants deren Lebenszeit und den Stoffwechsel länger aufrechterhalten und im Umkehrschluss für eine gesteigerte Reaktivität sorgen. Da für dessen Gewinnung jedoch lebende Tiere verwendet werden müssen, was wiederum nicht mit dem

Konzept der 3R vereinbar ist und somit zusätzliche Schwankungen der Qualität und der Zusammensetzung auftreten können, wurde hier auf dessen Einsatz verzichtet. Diese Punkte werden in dem Übersichtsartikel von VAN DER VALK et al. (2010) deutlich. Da das Euterparenchym insgesamt sensibler auf die Bearbeitung im Labor reagierte, als die Zitzenzisterne, was an den im Vergleich niedrigeren Stoffwechsel- und RQI-Werten sichtbar wurde, könnte außerdem eine Anpassung der Probengröße und -dicke zur Verbesserung der Gewebepfusion in Erwägung gezogen werden. Damit könnten auch längere Inkubationszeiten umgesetzt werden, um z. B. die Inkubationszeiten des *In-vivo*-Versuchs auf das Explantmodell zu übertragen (PETZL et al., 2012; FILOR et al., 2021). Um die Variabilität in den Ergebnissen der Euterexplants weiter zu minimieren, könnten Explants unterschiedlicher Lokalisationen innerhalb eines Euterviertels gewonnen und für die anschließenden Analysen gepoolt werden (LIND et al., 2015). Eine Erhöhung der Probenanzahl, um tierindividuelle Unterschiede auszugleichen, könnte ebenso für homogenere Ergebnisse sorgen, wobei die methodischen Einschränkungen aus Tierschutzgründen bei der Tierauswahl im Schlachthof eine Hürde darstellen (BURVENICH et al., 2003). Dass kein Vorbericht und keine Daten über das Alter und die Krankheitsgeschichte der verwendeten Tiere zur Verfügung standen erschwerte die Auswahl erheblich und etwaige Vorerkrankungen konnten nie ausgeschlossen werden. Während bei der Verwendung nativer Tiere alle Daten bekannt wären, wäre das mit sehr viel höheren Kosten verbunden und ein Tierversuchsantrag notwendig, da diese nur zum Zweck der Gewebegewinnung geschlachtet würden (PETZL et al., 2016). Das widerspricht außerdem dem Ziel der 3 R, Tierversuche zu vermeiden (EU, 2010).

Mit dem vorliegenden Explantmodell konnte *in vitro* erfolgreich die inflammatorische Reaktion von Geweben der Zitzenzisterne und des Euterparenchyms auf die Mastitispathogene *S. aureus* und *E. coli* reproduziert werden. Eine Endotoxintoleranz konnte jedoch in diesem Modellansatz nicht messbar induziert werden. Durch weitere Anpassungen der Methodik könnte es jedoch zukünftig möglich sein, tendenziell abzeichnende Hinweise auf eine sich einstellende Endotoxintoleranz herauszuarbeiten. Hierdurch könnten Kandidaten potentieller Immunmodulatoren *in vitro* geprüft werden, in ihren Eigenschaften eine verringerte Expression inflammatorischer Zytokine zu induzieren bei gleichzeitiger Steigerung endogener antimikrobieller Mechanismen. Übergeordnetes Ziel dieses experimentellen Ansatzes ist hierbei die Linderung akuter Mastitis-Symptome bei gleichzeitiger

Steigerung der aktiven Erregerbekämpfung und der weiteren Reduktion des Einsatzes antimikrobieller Wirkstoffe in der Tiermedizin.

## VI. ZUSAMMENFASSUNG

### **Untersuchungen zur Wirksamkeit antimikrobieller Peptide gegen bovine Mastitispathogene *in vitro* und zu Komponenten des angeborenen Immunsystems in einem bovinen mammären Explantmodell**

In der Milchviehhaltung sind intramammäre Infektionen mit *E. coli*, *S. aureus* und *Sc. uberis* sehr häufig die Ursache für klinische und subklinische Mastitiden. Neben der Belastung durch hohe Betriebskosten und Auswirkungen auf das Tierwohl, sind sowohl ihre Prävention, als auch ihre Behandlung einer der Hauptgründe für den Einsatz von Antibiotika bei der Milchkuh. Da in den letzten Jahrzehnten sowohl in der Veterinär- als auch in der Humanmedizin ein Anstieg an antibiotikaresistenten Keimen beobachtet werden konnte, sollte Anwendung von Antibiotika in Zukunft weiterhin reduziert werden. Vor allem prophylaktische Maßnahmen können zur Verringerung des Antibiotikaeinsatzes beitragen, wie beispielsweise die Förderung körpereigener Abwehrmechanismen. Hierzu gehören Antimikrobielle Peptide (AMP), die ein wichtiger Faktor des angeborenen Immunsystems sind und bei der bovinen Mastitis stark heraufreguliert werden.

Ein Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss physiologisch im Euter vorkommender AMP auf das Wachstum der relevantesten Mastitispathogene beim Rind zu untersuchen. Mit Hilfe eines Time-Kill-Assays wurden S100-Proteine (S100A9, S100A8/A9, S100A12),  $\beta$ -Defensine (linguales antimikrobielles Peptid (LAP),  $\beta$ -Defensin 1 (DEFB1)), die Antileukoproteinase (SLPI) und das CC-Chemokin 20 (CCL20) auf ihre antimikrobielle Wirksamkeit gegenüber den Mastitispathogenen *E. coli*, *S. aureus* und *Sc. uberis* untersucht. Diese wurden mit jeweils mehreren unterschiedlichen Konzentrationen von AMP (zwischen 5  $\mu\text{g/ml}$  und 40  $\mu\text{g/ml}$ ) kultiviert. Als Positivkontrolle (PK) diente jeweils ein Bakterienansatz ohne weitere Zusätze und als Negativkontrolle (NK) wurden je 5  $\mu\text{g/ml}$  Penicillin-Streptomycin hinzugefügt. Die Inkubation fand bei 37°C über 6 h unter Luftabschluss in einem Photometer mit stündlicher Messung der optischen Dichte (OD) bei 600 nm statt ( $n = 6-9$ ).

Das Wachstum von *Sc. uberis* wurde mit der Zugabe von CCL20 (ab 10  $\mu\text{g/ml}$ ), rbb LAP (ab 40  $\mu\text{g/ml}$ ), S100A9 (ab 5  $\mu\text{g/ml}$ ), S100A12 (ab 10  $\mu\text{g/ml}$ ) signifikant gehemmt. Bei *S. aureus* konnte durch DEFB1 (ab 5  $\mu\text{g/ml}$ ), CCL20 (ab 20  $\mu\text{g/ml}$ ), S100A9 (ab 10  $\mu\text{g/ml}$ ) und S100A12 (ab 30  $\mu\text{g/ml}$ ) mit steigender Konzentration

der AMP teilweise bereits nach zwei Stunden eine signifikante Hemmung des Wachstums gemessen werden. Während auf den Zusatz von S100A8/A9 keine Änderung des Wachstums von *S. aureus* folgte, steigerten sowohl die bovine, als auch die bubaline Rekombinate von LAP und SLPI das Wachstum signifikant. Das Wachstum des Mastitiserregers *E. coli* wurde signifikant durch die Zugabe aller AMP gesteigert, außer durch S100A8/A9, das zu Stunde sechs nach Inkubationsbeginn eine signifikante Hemmung hervorrief.

In der vorliegenden Arbeit konnte eine Konzentrations-abhängige, Erreger-abhängige Veränderung des Wachstums euterspezifischer Pathogene durch den Zusatz von physiologisch im Euter vorkommender AMP *in vitro* nachgewiesen werden. Es konnte gezeigt werden, dass sie peptidspezifisch mit zunehmender Konzentration signifikant bis komplett vor allem das Wachstum grampositiver Mastitispathogene hemmen können. Ihr Potential bei der Erregerabwehr und als vielversprechender Ersatz für antibiotische Stoffe bei der bovinen Mastitis wird somit weiter bestärkt. Diese Studie gibt Anlass für weitere Untersuchungen vor allem in Bezug auf die Wirkung weiterer relevanter AMP bei der Mastitis und ihrer Induzierbarkeit.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, zu prüfen, ob durch Prästimulation mit LPS und anschließender Restimulation mit *E. coli* oder *S. aureus* anhand eines Explantmodells eine Endotoxintoleranz in mammärem Geweben des Euters induziert werden kann. Es wurden adspektorisch und palpatorisch gesunde Euter (n = 12) frisch geschlachteter Kühe verwendet, deren Milch eine Zellzahl < 500.000 und einen negativen bakteriologischen Befund aufwies. Mit einer Biopsiestanze (Ø 2,76 mm) wurden jeweils Explants aus der Zitzenzisterne und dem Euterparenchyms entnommen und anschließend im Labor präpariert und kultiviert. Nach einer 5-stündigen Inkubation mit LPS folgte eine 12-stündige Stimulationspause und anschließend eine Restimulation mit  $10^8$  KBE/ml *S. aureus* oder *E. coli* (beide hitzeinaktiviert) für weitere 12 h. Die Ansätze wurden entweder kombiniert oder einzeln hinzugefügt. Ein Ansatz ohne weitere Zusätze wurde als Negativkontrolle verwendet. Pro Ansatz und Gewebe-Lokalisation wurden die Explants jeweils im Doppelansatz bei 37°C, einer O<sub>2</sub>-Konzentration von 5,5 % und einer CO<sub>2</sub>-Konzentration von 5 % inkubiert. Im Anschluss wurde die mRNA der gepoolten Ansätze extrahiert und mittels einer RT-qPCR die Genexpression der Zytokine IL-8, IL-6, IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  und der AMP S100A9 und LAP untersucht. Die Überstände der Explants wurden mit Hilfe eines Chemotaxisassays bezüglich ihrer chemotaktischen

Wirkung auf PMN aus Rinderblut untersucht.

Bei der Überprüfung der Überstände auf chemotaktisch aktive Faktoren konnte eine signifikante Steigerung der chemotaktischen Aktivität der PMN bei der Zugabe von *E. coli* im Vergleich zur Zugabe von LPS in beiden Gewebe-Lokalisationen nachgewiesen werden. Der Anteil an gewanderten PMN war bei Überständen des Euterparenchyms mit *S. aureus* signifikant niedriger, als mit *E. coli*, wobei die Anzahl mit steigendem Zusatz von LPS ebenso anstieg. Insgesamt konnte bei der Genexpression der Zytokine IL-8, IL-1 $\beta$ , IL-6 ebenso eine Steigerung bei Explants, die mit *E. coli* stimuliert wurden, gegenüber Explants, die nur mit LPS stimuliert wurden, gemessen werden. Ebenso wurden diese Zytokine bei der Zugabe von *S. aureus* vor allem im Euterparenchym tendenziell bis signifikant niedriger exprimiert, als bei der Zugabe von *E. coli*, wobei ebenso eine tendenzielle Expressionssteigerung bei der Zugabe von LPS erkannt werden konnte. Bei der Expression von *LAP* konnte im Euterparenchym nach der Stimulation keine signifikante Änderung gemessen werden. Sowohl die Expression von *LAP* in der Zitzenzisterne, als auch die Expression von *S100A9* wurde in beiden Gewebe-Lokalisationen durch die Zugabe der Zusätze gesteigert, aber es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Stimulationsansätzen gemessen werden. Die Expression des Gens *TNF* wurde wider Erwarten durch Zugabe der Stimulationszusätze kaum heraufreguliert. Die Expression der Gene für IL-1 $\beta$ , *LAP* und *S100A9* war in der Zitzenzisterne signifikant höher, als im Euterparenchym.

Anhand des Explantmodells konnte eine Gewebe-abhängige und Gen-abhängige Expressionssteigerung relevanter Zytokine und AMP nach Stimulation mit LPS, *E. coli* und *S. aureus* nachgewiesen werden. Durch eine Prästimulation mit LPS und eine Restimulation mit *E. coli* konnte vor allem im Euterparenchym nur teilweise eine tendenzielle Verringerung der Expression von Zytokinen und der chemotaktischen Aktivität im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit *E. coli* gemessen werden. Bei der Zugabe von LPS zu *S. aureus* konnte sogar ein tendenzieller Anstieg der Expression der Zytokine und der chemotaktischen Aktivität beobachtet werden. Die vorliegende Studie konnte eine reproduzierbare *In-vitro*-Stimulierbarkeit von Euterexplants nachweisen, aber es konnte keine signifikant messbare Endotoxintoleranz induziert werden. Das in dieser Arbeit weiterentwickelte *In-vitro*-Modell trägt dazu bei, dass zukünftig weitere Untersuchungen zur Mastitispathogenese und zur Regulation immunrelevanter Faktoren nach dem Prinzip der 3 R untersucht

werden können und stellt neben den neu erworbenen Erkenntnissen dadurch auch einen Beitrag zum Tierwohl dar.

## VII. SUMMARY

### **Studies on the efficacy of antimicrobial peptides against bovine mastitis pathogens *in vitro* and on components of the innate immune system in a bovine mammary explant model**

Intramammary infections with *E. coli*, *S. aureus* and *Sc. uberis* are very common causes of clinical and subclinical mastitis in dairy farming. Apart from the high costs and the impact on animal welfare, both their prevention and treatment are one of the main reasons for the use of antibiotics in dairy cows. Since an increase in antibiotic-resistant bacteria has been observed in both veterinary and human medicine in recent decades, the former should be applied more restrictively in the future. Especially prophylactic measures can contribute to reducing the use of antibiotics. One approach is to specifically stimulate endogenous defence mechanisms. Antimicrobial peptides (AMP) are an important factor of the innate immune system and are strongly up-regulated during bovine mastitis.

The aim of the study was to investigate the influence of physiologically occurring AMP in the udder on the growth of the most relevant mastitis pathogens in cattle. S100 proteins (S100A9, S100A8/A9, S100A12),  $\beta$  defensins (lingual antimicrobial peptide (LAP),  $\beta$  defensin 1 (DEFB1)), antileukoproteinase (SLPI) and CC chemokine 20 (CCL20) were examined for their antimicrobial efficacy against the mastitis pathogens *E. coli*, *S. aureus* and *Sc. uberis* using a time kill assay. Bacteria were co-cultured with several different concentrations of AMP (between 5  $\mu\text{g/ml}$  and 40  $\mu\text{g/ml}$ ) respectively. A bacterial batch without further supplements served as positive control (PK) and 5  $\mu\text{g/ml}$  penicillin streptomycin were added as negative control (NK). Incubation took place at 37°C for 6 h under exclusion of air in a photometer with hourly measurement of the optical density (OD) at 600 nm (n = 6-9).

The growth of *Sc. uberis* was significantly inhibited with the addition of CCL20 (from 10  $\mu\text{g/ml}$ ), rbb LAP (from 40  $\mu\text{g/ml}$ ), S100A9 (from 5  $\mu\text{g/ml}$ ), S100A12 (from 10  $\mu\text{g/ml}$ ), DEFB1 (from 5  $\mu\text{g/ml}$ ), CCL20 (from 20  $\mu\text{g/ml}$ ), S100A9 (from 10  $\mu\text{g/ml}$ ) and S100A12 (from 30  $\mu\text{g/ml}$ ) could in some cases inhibit the growth of *S. aureus* significantly with increasing concentrations of AMP after only two hours. While the addition of S100A8/A9 did not initiate any changes in the growth of *S. aureus*, both, bovine and bubaline recombinants of LAP and SLPI significantly



increased its growth. The growth of the mastitis pathogen *E. coli* was significantly increased by the addition of all AMPs except S100A8/A9, which caused significant inhibition six hours after the start of incubation.

In the present study we have demonstrated a concentration-dependent, pathogen-dependent change in the growth of udder-specific pathogens by the addition of physiologically occurring AMP in the udder *in vitro*. It was shown that they can significantly inhibit the growth of gram-positive mastitis pathogens in a peptide-specific manner with increasing concentration. Their potential in pathogen defence and their role as a promising substitute for antibiotics in bovine mastitis is thus further confirmed. This study gives rise to additional investigations, especially with regard to the effect of other relevant AMPs in mastitis and their inducibility.

Another aim of this trial was to test whether endotoxin tolerance can be induced in mammary tissues of the udder by prestimulation with LPS and subsequent restimulation with *E. coli* or *S. aureus* using an explant model. Adspectory and palpatory healthy udders (n = 12) of freshly slaughtered cows with a somatic cell count < 500,000 and negative bacteriological results were used. Explants were taken from the teat cistern and the udder parenchyma with a biopsy punch (Ø 2.76 mm) and subsequently prepared and cultured in the laboratory. A 5 h incubation with LPS was followed by a 12 h stimulation pause then a restimulation with 10<sup>8</sup> CFU/ml (colony forming units) *S. aureus* or *E. coli* (both heat-inactivated) for further 12 h was undertaken. The experimental setup included cultures with or without pre- or restimulation respectively. One batch without additives was used as a negative control. For each batch and for each tissue localisation, the explants were incubated in duplicates at 37°C, an O<sub>2</sub>-concentration of 5.5 % and a CO<sub>2</sub>-concentration of 5 %. Afterwards the mRNA of the pooled preparations was extracted and the gene expression of the cytokines IL-8, IL-6, IL-1β and TNF-α and of the AMPs S100A9 and LAP was examined by means of RT-qPCR. The supernatants of the explants were examined for their chemotactic effect on PMN from bovine blood using a chemotaxis assay.

When the supernatants were tested for chemotactically active factors, a significant increase in the chemotactic activity of PMNs was detected with the addition of *E. coli* compared to the addition of LPS in both tissue-localisations. The proportion of migrated PMN was significantly lower in supernatants of the udder parenchyma incubated with *S. aureus* than with *E. coli*, whereupon their number also rose with

increasing addition of LPS. Overall, an increase in the gene expression of the cytokines IL-8, IL-1 $\beta$ , IL-6 could also be measured in explants stimulated with *E. coli* compared to explants stimulated with LPS only. Similarly, these cytokines tended to be expressed at significantly lower levels in the udder parenchyma when *S. aureus* was added compared to when *E. coli* was added. Furthermore a trend of an increase in expression could be detected when LPS was added. No significant change in the expression of LAP could be measured in the udder parenchyma after stimulation. Both the expression of *LAP* in the teat cistern and the expression of *S100A9* were increased in both tissue localisations by the addition of the supplements, but no significant differences between the stimuli could be measured. Contrary to expectations, the expression of the gene *TNF* was hardly up-regulated by the addition of the stimulation supplements. The expression of the genes for IL-1 $\beta$ , LAP and S100A9 was significantly higher in the teat cistern than in the udder parenchyma.

On the basis of an explant model, a tissue-dependent and gene-dependent increase in expression of relevant cytokines and AMP could be demonstrated after stimulation with LPS, *E. coli* and *S. aureus*. Prestimulation with LPS and restimulation with *E. coli* tended to reduce the expression of cytokines and chemotactic activity only partially, especially in the udder parenchyma, compared to stimulation with *E. coli* alone. When LPS was added to *S. aureus*, there was even observed a tendency towards an increase in the expression of cytokines and chemotactic activity. The present study was able to demonstrate a reproducible *in vitro* responsiveness of udder explants, but no significantly measurable endotoxin tolerance could be induced. The *in vitro* model refined in this study contributes to the chance of further investigating mastitis pathogenesis and the regulation of immune-relevant factors according to the principle of 3R and thus, in addition to the newly acquired knowledge, also represents a contribution to animal welfare.

## VIII. LITERATURVERZEICHNIS

- Aalipour F, Mirlohi M, Jalali M. Prevalence of antibiotic residues in commercial milk and its variation by season and thermal processing methods. *International Journal of Environmental Health Engineering* 2013; 2: 41-.
- Abu El-Asrar AM, Berghmans N, Al-Obeidan SA, Gikandi PW, Opdenakker G, Van Damme J, Struyf S. The CC chemokines CCL8, CCL13 and CCL20 are local inflammatory biomarkers of HLA-B27-associated uveitis. *Acta Ophthalmol* 2019; 97: e122-e8.
- Akhtar M, Guo S, Guo YF, Zahoor A, Shaukat A, Chen Y, Umar T, Deng PG, Guo M. Upregulated-gene expression of pro-inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6) via TLRs following NF- $\kappa$ B and MAPKs in bovine mastitis. *Acta Trop* 2020; 207: 105458.
- Alberola J, Rodriguez A, Francino O, Roura X, Rivas L, Andreu D. Safety and efficacy of antimicrobial peptides against naturally acquired leishmaniasis. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2004; 48: 641-3.
- Alva-Murillo N, Téllez-Pérez AD, Sagrero-Cisneros E, López-Meza JE, Ochoa-Zarzosa A. Expression of antimicrobial peptides by bovine endothelial cells. *Cell Immunol* 2012; 280: 108-12.
- Aono S, Li C, Zhang G, Kemppainen RJ, Gard J, Lu W, Hu X, Schwartz DD, Morrison EE, Dykstra C, Shi J. Molecular and functional characterization of bovine beta-defensin-1. *Vet Immunol Immunopathol* 2006; 113: 181-90.
- Ashcroft GS, Lei K, Jin W, Longenecker G, Kulkarni AB, Greenwell-Wild T, Hale-Donze H, McGrady G, Song X-Y, Wahl SM. Secretory leukocyte protease inhibitor mediates non-redundant functions necessary for normal wound healing. *Nature medicine* 2000; 6: 1147-53.
- Atakisi O, Oral H, Atakisi E, Merhan O, Metin Pancarci S, Ozcan A, Marasli S, Polat B, Colak A, Kaya S. Subclinical mastitis causes alterations in nitric oxide, total oxidant and antioxidant capacity in cow milk. *Res Vet Sci* 2010; 89: 10-3.
- Ayyanan A, Laribi O, Schuepbach-Mallepell S, Schrick C, Gutierrez M, Tanos T, Lefebvre G, Rougemont J, Yalcin-Ozuysal O, Brisken C. Perinatal exposure to bisphenol A increases adult mammary gland progesterone response and cell number. *Mol Endocrinol* 2011; 25: 1915-23.
- Bannerman DD, Paape MJ, Lee JW, Zhao X, Hope JC, Rainard P. *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* elicit differential innate immune responses following intramammary infection. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004; 11: 463-72.
- Barber MR, Yang TJ. Chemotactic activities in nonmastitic and mastitic mammary secretions: presence of interleukin-8 in mastitic but not nonmastitic secretions. *Clin Diagn Lab Immunol* 1998; 5: 82-6.
- Bäumer W, Kietzmann M. The isolated perfused bovine udder as a model of dermal eicosanoid release. *Altern Lab Anim* 2000; 28: 643-9.
- Beeson PB, Wall MJ, Heyman A. Isolation of virus of lymphogranuloma venereum from blood and spinal fluid of a human being. *Proc Soc Exp Biol Med* 1946; 62: 306.

- Belaid A, Aouni M, Khelifa R, Trabelsi A, Jemmali M, Hani K. In vitro antiviral activity of dermaseptins against herpes simplex virus type 1. *Journal of medical virology* 2002; 66: 229-34.
- Benedyk M, Sopalla C, Nacken W, Bode G, Melkonyan H, Banfi B, Kerkhoff C. HaCaT keratinocytes overexpressing the S100 proteins S100A8 and S100A9 show increased NADPH oxidase and NF-kappaB activities. *J Invest Dermatol* 2007; 127: 2001-11.
- Bergenfeldt M, Nyström M, Bohe M, Lindström C, Polling Å, Ohlsson K. Localization of immunoreactive secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) in intestinal mucosa. *Journal of gastroenterology* 1996; 31: 18-23.
- Biswas SK, Banerjee S, Baker GW, Kuo CY, Chowdhury I. The Mammary Gland: Basic Structure and Molecular Signaling during Development. *Int J Mol Sci* 2022; 23
- Blum SE, Heller ED, Jacoby S, Krifucks O, Leitner G. Comparison of the immune responses associated with experimental bovine mastitis caused by different strains of *Escherichia coli*. *J Dairy Res* 2017; 84: 190-7.
- Boam GC, Weber WJ, Benjamin A, Kahl S, Allen Bridges G, Elsasser TH, Kerr D, Crooker BA. Effect of bovine genotype on innate immune response of heifers to repeated lipopolysaccharide (LPS) administration. *Vet Immunol Immunopathol* 2019; 215: 109914.
- Boehmer JL, Bannerman DD, Shefcheck K, Ward JL. Proteomic analysis of differentially expressed proteins in bovine milk during experimentally induced *Escherichia coli* mastitis. *J Dairy Sci* 2008; 91: 4206-18.
- Boireau C, Cazeau G, Jarrige N, Calavas D, Madec J-Y, Leblond A, Haenni M, Gay É. Antimicrobial resistance in bacteria isolated from mastitis in dairy cattle in France, 2006–2016. *J Dairy Sci* 2018; 101: 9451-62.
- Bollenbach T, Quan S, Chait R, Kishony R. Nonoptimal microbial response to antibiotics underlies suppressive drug interactions. *Cell* 2009; 139: 707-18.
- Bougarn S, Cunha P, Gilbert FB, Harmache A, Foucras G, Rainard P. Staphylococcal-associated molecular patterns enhance expression of immune defense genes induced by IL-17 in mammary epithelial cells. *Cytokine* 2011; 56: 749-59.
- Bowdish DM, Davidson DJ, Scott MG, Hancock RE. Immunomodulatory activities of small host defense peptides. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 1727-32.
- Bradley A, Green M. Use and interpretation of somatic cell count data in dairy cows. *In practice* 2005; 27: 310-5.
- Braff MH, Zaiou M, Fierer J, Nizet V, Gallo RL. Keratinocyte production of cathelicidin provides direct activity against bacterial skin pathogens. *Infect Immun* 2005; 73: 6771-81.
- Brand KS, Filor V, Bäumer W. Early inflammatory events of mastitis-a pilot study with the isolated perfused bovine udder. *BMC Vet Res* 2021; 17: 356.
- Brosseron F, May C, Schoenebeck B, Tippler B, Woitalla D, Kauth M, Brockmann K, Meyer HE, Berg D, Bufe A, Marcus K. Stepwise isolation of human peripheral erythrocytes, T lymphocytes, and monocytes for blood cell proteomics. *Proteomics Clin Appl* 2012; 6: 497-501.

- Brouillette E, Grondin G, Lefebvre C, Talbot BG, Malouin F. Mouse mastitis model of infection for antimicrobial compound efficacy studies against intracellular and extracellular forms of *Staphylococcus aureus*. *Vet Microbiol* 2004a; 101: 253-62.
- Brouillette E, Martinez A, Boyll BJ, Allen NE, Malouin F. Persistence of a *Staphylococcus aureus* small-colony variant under antibiotic pressure in vivo. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2004b; 41: 35-41.
- Burvenich C, Van Merris V, Mehrzad J, Diez-Fraile A, Duchateau L. Severity of *E. coli* mastitis is mainly determined by cow factors. *Vet Res* 2003; 34: 521-64.
- Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 2009; 55: 611-22.
- Capuco AV, Bright SA, Pankey JW, Wood DL, Miller RH, Bitman J. Increased susceptibility to intramammary infection following removal of teat canal keratin. *J Dairy Sci* 1992; 75: 2126-30.
- Carrero R, Cerrada I, Lledó E, Dopazo J, García-García F, Rubio M-P, Trigueros C, Dorronsoró A, Ruiz-Sauri A, Montero JA. IL1 $\beta$  induces mesenchymal stem cells migration and leucocyte chemotaxis through NF- $\kappa$ B. *Stem Cell Reviews and Reports* 2012; 8: 905-16.
- Castell JV, Gómez-Lechón MJ, David M, Fabra R, Trullenque R, Heinrich PC. Acute-phase response of human hepatocytes: regulation of acute-phase protein synthesis by interleukin-6. *Hepatology* 1990; 12: 1179-86.
- Caswell JL, Middleton DM, Gordon JR. Production and functional characterization of recombinant bovine interleukin-8 as a specific neutrophil activator and chemoattractant. *Vet Immunol Immunopathol* 1999; 67: 327-40.
- Caverly JM, Radi ZA, Andreasen CB, Dixon RA, Brogden KA, Ackermann MR. Comparison of bronchoalveolar lavage fluid obtained from *Mannheimia haemolytica*-inoculated calves with and without prior treatment with the selectin inhibitor TBC1269. *Am J Vet Res* 2001; 62: 665-72.
- Chan YR, Gallo RL. PR-39, a syndecan-inducing antimicrobial peptide, binds and affects p130(Cas). *J Biol Chem* 1998; 273: 28978-85.
- Chanu KV, Thakuria D, Kumar S. Antimicrobial peptides of buffalo and their role in host defenses. *Vet World* 2018; 11: 192-200.
- Chen L, Liu X, Li Z, Wang J, Tian R, Zhang H. Integrated Analysis of Transcriptome mRNA and miRNA Profiles Reveals Self-Protective Mechanism of Bovine MECs Induced by LPS. *Front Vet Sci* 2022; 9: 890043.
- Cheng Z, Palma-Vera S, Buggiotti L, Salavati M, Becker F, Werling D, Wathes DC, Gplus EC. Transcriptomic Analysis of Circulating Leukocytes Obtained during the Recovery from Clinical Mastitis Caused by *Escherichia coli* in Holstein Dairy Cows. *Animals (Basel)* 2022; 12
- Christensen B, Fink J, Merrifield RB, Mauzerall D. Channel-forming properties of cecropins and related model compounds incorporated into planar lipid membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85: 5072-6.

- Clarkson RW, Wayland MT, Lee J, Freeman T, Watson CJ. Gene expression profiling of mammary gland development reveals putative roles for death receptors and immune mediators in post-lactational regression. *Breast Cancer Res* 2004; 6: R92-109.
- Collignon PC, Conly JM, Andremont A, McEwen SA, Aidara-Kane A, for the World Health Organization Advisory Group BMoISoAR, Agerso Y, Andremont A, Collignon P, Conly J, Dang Ninh T, Donado-Godoy P, Fedorka-Cray P, Fernandez H, Galas M, Irwin R, Karp B, Matar G, McDermott P, McEwen S, Mitema E, Reid-Smith R, Scott HM, Singh R, DeWaal CS, Stelling J, Toleman M, Watanabe H, Woo G-J, for the World Health Organization Advisory Group BMoISoAR. World Health Organization Ranking of Antimicrobials According to Their Importance in Human Medicine: A Critical Step for Developing Risk Management Strategies to Control Antimicrobial Resistance From Food Animal Production. *Clinical Infectious Diseases* 2016; 63: 1087-93.
- Connolly M, Marrelli A, Blades M, McCormick J, Maderna P, Godson C, Mullan R, FitzGerald O, Bresnihan B, Pitzalis C, Veale DJ, Fearon U. Acute serum amyloid A induces migration, angiogenesis, and inflammation in synovial cells in vitro and in a human rheumatoid arthritis/SCID mouse chimera model. *J Immunol* 2010; 184: 6427-37.
- Corbin BD, Seeley EH, Raab A, Feldmann J, Miller MR, Torres VJ, Anderson KL, Dattilo BM, Dunman PM, Gerads R, Caprioli RM, Nacken W, Chazin WJ, Skaar EP. Metal chelation and inhibition of bacterial growth in tissue abscesses. *Science* 2008; 319: 962-5.
- Cressier B, Bissonnette N. Assessment of an extraction protocol to detect the major mastitis-causing pathogens in bovine milk. *J Dairy Sci* 2011; 94: 2171-84.
- Cunden LS, Gaillard A, Nolan EM. Calcium Ions Tune the Zinc-Sequestering Properties and Antimicrobial Activity of Human S100A12. *Chem Sci* 2016; 7: 1338-48.
- Das H, Swamy N, Sahoo G, Ahmed SU, More T. Beta-defensin antibiotic peptides in the innate immunity of the buffalo: in vivo and in vitro studies. *Altern Lab Anim* 2008; 36: 429-40.
- Davies D, Meade KG, Herath S, Eckersall PD, Gonzalez D, White JO, Conlan RS, O'Farrelly C, Sheldon IM. Toll-like receptor and antimicrobial peptide expression in the bovine endometrium. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2008; 6: 1-12.
- De Buck M, Berghmans N, Pörtner N, Vanbrabant L, Cockx M, Struyf S, Opdenakker G, Proost P, Van Damme J, Gouwy M. Serum amyloid A1 $\alpha$  induces paracrine IL-8/CXCL8 via TLR2 and directly synergizes with this chemokine via CXCR2 and formyl peptide receptor 2 to recruit neutrophils. *J Leukoc Biol* 2015; 98: 1049-60.
- De Filippo K, Dudeck A, Hasenberg M, Nye E, van Rooijen N, Hartmann K, Gunzer M, Roers A, Hogg N. Mast cell and macrophage chemokines CXCL1/CXCL2 control the early stage of neutrophil recruitment during tissue inflammation. *Blood* 2013; 121: 4930-7.
- De Lucca A, Bland J, Jacks T, Grimm C, Walsh T. Fungicidal and binding properties of the natural peptides cecropin B and dermaseptin. *Medical mycology* 1998; 36: 291-8.
- del Campo R, Martínez E, del Fresno C, Alenda R, Gómez-Piña V, Fernández-Ruiz I,

- Siliceo M, Jurado T, Toledano V, Arnalich F, García-Río F, López-Collazo E. Translocated LPS might cause endotoxin tolerance in circulating monocytes of cystic fibrosis patients. *PLoS One* 2011; 6: e29577.
- del Fresno C, Soler-Rangel L, Soares-Schanoski A, Gómez-Piña V, González-León MC, Gómez-García L, Mendoza-Barberá E, Rodríguez-Rojas A, García F, Fuentes-Prior P, Arnalich F, López-Collazo E. Inflammatory responses associated with acute coronary syndrome up-regulate IRAK-M and induce endotoxin tolerance in circulating monocytes. *J Endotoxin Res* 2007; 13: 39-52.
- Denisov V, Strong W, Walder M, Gingrich J, Wintz H. Development and validation of RQI: an RNA quality indicator for the Experion automated electrophoresis system. *Bio-Rad Bulletin* 2008; 5761
- Diarra MS, Petitclerc D, Lacasse P. Response of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis to exogenous iron sources. *J Dairy Sci* 2002; 85: 2141-8.
- Dorschner RA, Pestonjamas VK, Tamakuwala S, Ohtake T, Rudisill J, Nizet V, Agerberth B, Gudmundsson GH, Gallo RL. Cutaneous injury induces the release of cathelicidin anti-microbial peptides active against group A *Streptococcus*. *Journal of Investigative Dermatology* 2001; 117: 91-7.
- Dotiwala F, Mulik S, Polidoro RB, Ansara JA, Burleigh BA, Walch M, Gazzinelli RT, Lieberman J. Killer lymphocytes use granulysin, perforin and granzymes to kill intracellular parasites. *Nat Med* 2016; 22: 210-6.
- Duncan MR, Berman B. Stimulation of collagen and glycosaminoglycan production in cultured human adult dermal fibroblasts by recombinant human interleukin 6. *J Invest Dermatol* 1991; 97: 686-92.
- El-Dirany R, Shahrour H, Dirany Z, Abdel-Sater F, Gonzalez-Gaitano G, Brandenburg K, Martinez de Tejada G, Nguewa PA. Activity of Anti-Microbial Peptides (AMPs) against *Leishmania* and Other Parasites: An Overview. *Biomolecules* 2021; 11
- El Zubeir IE, ElOwni OA, Mohamed GE. Effect of mastitis on macro-minerals of bovine milk and blood serum in Sudan. *J S Afr Vet Assoc* 2005; 76: 22-5.
- Elnabawi YA, Garshick MS, Tawil M, Barrett TJ, Fisher EA, Lo Sicco K, Neimann AL, Scher JU, Krueger J, Berger JS. CCL20 in psoriasis: A potential biomarker of disease severity, inflammation, and impaired vascular health. *J Am Acad Dermatol* 2021; 84: 913-20.
- EU (2010) RICHTLINIE 2010/63/EU DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES vom 22. September 2010 zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere Eds EUROPÄI- DEPU DRD, UNION S. Amtsblatt der Europäischen Union
- EU (2019) Verordnung (EU) 2019/6 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 11. Dezember 2018 über Tierarzneimittel und zur Aufhebung der Richtlinie 2001/82/EG. Ed UNION DEPU DRDE, Amtsblatt der Europäischen Union
- Felipe V, Morgante CA, Somale PS, Varroni F, Zingaretti ML, Bachetti RA, Correa SG, Porporatto C. Evaluation of the biofilm forming ability and its associated genes in *Staphylococcus* species isolates from bovine mastitis in Argentinean dairy farms. *Microb Pathog* 2017; 104: 278-86.
- Feng J, Peng W, Hu Z, Cai J, Liu J, Wang D. Multiple-Vessel-Based Blood Gas Profiles

- Analysis Revealed the Potential of Blood Oxygen in Mammary Vein as Indicator of Mammary Gland Health Risk of High-Yielding Dairy Cows. *Animals* 2022; 12: 1484.
- Fernandez DI, Le Brun AP, Whitwell TC, Sani M-A, James M, Separovic F. The antimicrobial peptide aurein 1.2 disrupts model membranes via the carpet mechanism. *Physical Chemistry Chemical Physics* 2012; 14: 15739-51.
- Filipe J, Inglesi A, Amadori M, Guarneri F, Menchetti L, Curone G, Brecchia G, Vigo D, Riva F. Preliminary Evidence of Endotoxin Tolerance in Dairy Cows during the Transition Period. *Genes (Basel)* 2021; 12
- Filor V, Petry M, Meißner J, Kietzmann M. Precision-cut bovine udder slices (PCBUS) as an in-vitro-model of an early phase of infection of bovine mastitis. *BMC Vet Res* 2021; 17: 120.
- Filor V, Seeger B, de Buhr N, von Köckritz-Blickwede M, Kietzmann M, Oltmanns H, Meißner J. Investigation of the pathophysiology of bacterial mastitis using precision-cut bovine udder slices. *J Dairy Sci* 2022; 105: 7705-18.
- Fiordalisi SAL, Honorato LA, Loiko MR, Avancini CAM, Veleirinho MBR, Filho L, Kuhnen S. The effects of Brazilian propolis on etiological agents of mastitis and the viability of bovine mammary gland explants. *J Dairy Sci* 2016; 99: 2308-18.
- Fitzgerald DC, Meade KG, McEvoy AN, Lillis L, Murphy EP, MacHugh DE, Baird AW. Tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) increases nuclear factor kappaB (NFkappaB) activity in and interleukin-8 (IL-8) release from bovine mammary epithelial cells. *Vet Immunol Immunopathol* 2007; 116: 59-68.
- Fogsgaard K, Røntved C, Sørensen P, Herskin M. Sickness behavior in dairy cows during *Escherichia coli* mastitis. *J Dairy Sci* 2012; 95: 630-8.
- Foster SL, Hargreaves DC, Medzhitov R. Gene-specific control of inflammation by TLR-induced chromatin modifications. *Nature* 2007; 447: 972-8.
- Gilbert FB, Cunha P, Jensen K, Glass EJ, Foucras G, Robert-Granic C, Rupp R, Rainard P. Differential response of bovine mammary epithelial cells to *Staphylococcus aureus* or *Escherichia coli* agonists of the innate immune system. *Vet Res* 2013; 44: 40.
- Golder HM, Hodge A, Lean IJ. Effects of antibiotic dry-cow therapy and internal teat sealant on milk somatic cell counts and clinical and subclinical mastitis in early lactation. *J Dairy Sci* 2016; 99: 7370-80.
- Gonzalez LL, Garrie K, Turner MD. Role of S100 proteins in health and disease. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 2020; 1867: 118677.
- González RN, Cullor JS, Jasper DE, Farver TB, Bushnell RB, Oliver MN. Prevention of clinical coliform mastitis in dairy cows by a mutant *Escherichia coli* vaccine. *Can J Vet Res* 1989; 53: 301-5.
- Griesbeck-Zilch B, Meyer HH, Kühn CH, Schwerin M, Wellnitz O. *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* cause deviating expression profiles of cytokines and lactoferrin messenger ribonucleic acid in mammary epithelial cells. *J Dairy Sci* 2008; 91: 2215-24.
- Grönlund U, Hultén C, Eckersall PD, Hogarth C, Persson Waller K. Haptoglobin and serum



- amyloid A in milk and serum during acute and chronic experimentally induced *Staphylococcus aureus* mastitis. *J Dairy Res* 2003; 70: 379-86.
- Guesdon W, Auray G, Pezier T, Bussi re FI, Drouet F, Le Vern Y, Marquis M, Potiron L, Rabot S, Bruneau A, Werts C, Laurent F, Lacroix-Lamand  S. CCL20 Displays Antimicrobial Activity Against *Cryptosporidium parvum*, but Its Expression Is Reduced During Infection in the Intestine of Neonatal Mice. *J Infect Dis* 2015; 212: 1332-40.
- G nther J, Koczan D, Yang W, N rnberg G, Repsilber D, Schuberth HJ, Park Z, Maqbool N, Molenaar A, Seyfert HM. Assessment of the immune capacity of mammary epithelial cells: comparison with mammary tissue after challenge with *Escherichia coli*. *Vet Res* 2009; 40: 31.
- G nther J, Esch K, Poschadel N, Petzl W, Zerbe H, Mitterhuemer S, Blum H, Seyfert HM. 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* 2011; 79: 695-707.
- G nther J, Petzl W, Zerbe H, Schuberth HJ, Koczan D, Goetze L, Seyfert HM. Lipopolysaccharide priming enhances expression of effectors of immune defence while decreasing expression of pro-inflammatory cytokines in mammary epithelia cells from cows. *BMC Genomics* 2012; 13: 17.
- G nther J, Petzl W, Bauer I, Ponsuksili S, Zerbe H, Schuberth HJ, Brunner RM, Seyfert HM. Differentiating *Staphylococcus aureus* from *Escherichia coli* mastitis: *S. aureus* triggers unbalanced immune-dampening and host cell invasion immediately after udder infection. *Sci Rep* 2017a; 7: 4811.
- G nther J, Petzl W, Zerbe H, Schuberth HJ, Seyfert HM. TLR ligands, but not modulators of histone modifiers, can induce the complex immune response pattern of endotoxin tolerance in mammary epithelial cells. *Innate Immun* 2017b; 23: 155-64.
- Gurao A, Kashyap SK, Singh R. beta-defensins: An innate defense for bovine mastitis. *Vet World* 2017; 10: 990-8.
- Haider DG, Leuchten N, Schaller G, Gouya G, Kolodjaschna J, Schmetterer L, Kapiotis S, Wolzt M. C-reactive protein is expressed and secreted by peripheral blood mononuclear cells. *Clin Exp Immunol* 2006; 146: 533-9.
- Halasa T, Huijps K,  ster s O, Hogeveen H. Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: a review. *Vet Q* 2007; 29: 18-31.
- Harbarth S, Balkhy HH, Goossens H, Jarlier V, Kluytmans J, Laxminarayan R, Saam M, Van Belkum A, Pittet D (2015) Antimicrobial resistance: one world, one fight! BioMed Central
- Harjanti DW, Sambodho P (2020) Effects of mastitis on milk production and composition in dairy cows. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. 012032
- Heikkil  AM, Nousiainen JI, Py r l  S. Costs of clinical mastitis with special reference to premature culling. *J Dairy Sci* 2012; 95: 139-50.
- Heikkil  AM, Liski E, Py r l  S, Taponen S. Pathogen-specific production losses in bovine mastitis. *J Dairy Sci* 2018; 101: 9493-504.

- Heinrich PC, Castell JV, Andus T. Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J* 1990; 265: 621-36.
- HEINZEL R, APPELHANS H, GASSEN G, SEEMÜLLER U, MACHLEIDT W, FRITZ H, STEFFENS G. Molecular cloning and expression of cDNA for human antileukoprotease from cervix uterus. *European journal of biochemistry* 1986; 160: 61-7.
- Hiemstra PS, Maassen RJ, Stolk J, Heinzl-Wieland R, Steffens GJ, Dijkman JH. Antibacterial activity of antileukoprotease. *Infect Immun* 1996; 64: 4520-4.
- Hilchie AL, Wuerth K, Hancock RE. Immune modulation by multifaceted cationic host defense (antimicrobial) peptides. *Nat Chem Biol* 2013; 9: 761-8.
- Hill A. Pathogenicity of two strains of *Streptococcus uberis* infused into lactating and non-lactating bovine mammary glands. *Research in veterinary science* 1988; 45: 400-4.
- Hillmer M. Uterussektret zur Diagnostik und Pathogeneseforschung der chronischen Endometritis beim Rind. Dissertation. LMU München: Tierärztliche Fakultät 2018;
- Hoekstra J, Zomer AL, Rutten VPMG, Benedictus L, Stegeman A, Spaninks MP, Bennedsgaard TW, Biggs A, De Vlieghe S, Mateo DH, Huber-Schlenstedt R, Katholm J, Kovács P, Krömker V, Lequeux G, Moroni P, Pinho L, Smulski S, Supré K, Swinkels JM, Holmes MA, Lam TJGM, Koop G. Genomic analysis of European bovine *Staphylococcus aureus* from clinical versus subclinical mastitis. *Sci Rep* 2020; 10: 18172.
- Hsu K, Champaiboon C, Guenther BD, Sorenson BS, Khammanivong A, Ross KF, Geczy CL, Herzberg MC. ANTI-INFECTIVE PROTECTIVE PROPERTIES OF S100 CALGRANULINS. *Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem* 2009; 8: 290-305.
- Huang F, An Z, Moran MJ, Liu F. Recognition of typical antibiotic residues in environmental media related to groundwater in China (2009– 2019). *Journal of hazardous materials* 2020a; 399: 122813.
- Huang J, Khademi M, Fugger L, Lindhe Ö, Novakova L, Axelsson M, Malmeström C, Constantinescu C, Lycke J, Piehl F, Olsson T, Kockum I. Inflammation-related plasma and CSF biomarkers for multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2020b; 117: 12952-60.
- Huang Q, Zheng XM, Zhang ML, Ning P, Wu MJ. Lactation mastitis: Promising alternative indicators for early diagnosis. *World J Clin Cases* 2022; 10: 11252-9.
- Huang Y, Shen L, Jiang J, Xu Q, Luo Z, Luo Q, Yu S, Yao X, Ren Z, Hu Y, Yang Y, Cao S. Metabolomic Profiles of Bovine Mammary Epithelial Cells Stimulated by Lipopolysaccharide. *Sci Rep* 2019; 9: 19131.
- Hughes K, Watson CJ. The Mammary Microenvironment in Mastitis in Humans, Dairy Ruminants, Rabbits and Rodents: A One Health Focus. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2018;
- Huynh HT, Robitaille G, Turner JD. Establishment of bovine mammary epithelial cells (MAC-T): an in vitro model for bovine lactation. *Exp Cell Res* 1991; 197: 191-9.

- Islam MA, Takagi M, Fukuyama K, Komatsu R, Albarracin L, Nochi T, Suda Y, Ikeda-Ohtsubo W, Rutten V, Eden WV, Villena J, Aso H, Kitazawa H. Transcriptome Analysis of The Inflammatory Responses of Bovine Mammary Epithelial Cells: Exploring Immunomodulatory Target Genes for Bovine Mastitis. *Pathogens* 2020; 9
- Isoe N, Nakamura J, Nakano H, Yoshimura Y. Existence of functional lingual antimicrobial peptide in bovine milk. *J Dairy Sci* 2009; 92: 2691-5.
- Iwano H, Inoue Y, Takasago T, Kobayashi H, Furusawa T, Taniguchi K, Fujiki J, Yokota H, Usui M, Tanji Y, Hagiwara K, Higuchi H, Tamura Y. Bacteriophage  $\Phi$ SA012 Has a Broad Host Range against *Staphylococcus aureus* and Effective Lytic Capacity in a Mouse Mastitis Model. *Biology (Basel)* 2018; 7
- Jedrzejczak M, Szatkowska I. Bovine mammary epithelial cell cultures for the study of mammary gland functions. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal* 2014; 50: 389-98.
- Joly S, Maze C, McCray PB, Jr., Guthmiller JM. Human beta-defensins 2 and 3 demonstrate strain-selective activity against oral microorganisms. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 1024-9.
- Kalivoda EM. Funktionelle Untersuchungen zur Endotoxintoleranz bei der Mastitis des Rindes. 2010;
- Kang JJ, Lyu Y, Zhao DM, Tian LH, Yin XM, Yang LF, Teng KD, Zhou XM. Antimicrobial activity of recombinant mature bovine neutrophil  $\beta$ -defensin 4 on mycobacterial infection. *Int J Tuberc Lung Dis* 2015; 19: 711-6.
- Kerro Deogo O, Pacha PA, Gillespie BE, Pighetti GM. Experimental *Staphylococcus aureus* Mastitis Infection Model by Teat Dipping in Bacterial Culture Suspension in Dairy Cows. *Animals (Basel)* 2020; 10
- Kester HJ, Sorter DE, Hogan JS. Activity and milk compositional changes following experimentally induced *Streptococcus uberis* bovine mastitis. *J Dairy Sci* 2015; 98: 999-1004.
- Khazandi M, Eats P, Trott D, Ebrahimie E, Perry J, Hickey E, Page S, Garg S, Petrovski KR. Development of an improved *Streptococcus uberis* experimental mastitis challenge model using different doses and strains in lactating dairy cows. *J Dairy Res* 2015; 82: 470-7.
- Kneidl AM. Untersuchungen zur entzündungsbedingten Regulation der Interleukine IL1B und IL1RA im Uterus des Rindes. 2022;
- Kobayashi K, Hernandez LD, Galán JE, Janeway CA, Jr., Medzhitov R, Flavell RA. IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling. *Cell* 2002; 110: 191-202.
- Kobayashi K, Matsunaga K, Tsugami Y, Wakasa H, Nishimura T. IL-1 $\beta$  is a key inflammatory cytokine that weakens lactation-specific tight junctions of mammary epithelial cells. *Exp Cell Res* 2021; 409: 112938.
- Kosciuczuk EM, Lisowski P, Jarczak J, Krzyzewski J, Zwierzchowski L, Bagnicka E. Expression patterns of beta-defensin and cathelicidin genes in parenchyma of bovine mammary gland infected with coagulase-positive or coagulase-negative *Staphylococci*. *BMC Vet Res* 2014; 10: 246.

- Koskenniemi H, Laakkonen J. Estimating the amount of collagen and elastic fibres in bovine teats. *Anat Histol Embryol* 2020; 49: 859-62.
- Krenitz J (2018) Untersuchungen zu endogenen antimikrobiellen Peptiden in der bovinen Milchdrüse. *Imu*
- Krishnamoorthy P, Suresh KP, Jayamma KS, Shome BR, Patil SS, Amachawadi RG. An Understanding of the Global Status of Major Bacterial Pathogens of Milk Concerning Bovine Mastitis: A Systematic Review and Meta-Analysis (Scientometrics). *Pathogens* 2021; 10
- Krishnamurthi VR, Niyonshuti, II, Chen J, Wang Y. A new analysis method for evaluating bacterial growth with microplate readers. *PLoS One* 2021; 16: e0245205.
- Kuipers A, Koops WJ, Wemmenhove H. Antibiotic use in dairy herds in the Netherlands from 2005 to 2012. *J Dairy Sci* 2016; 99: 1632-48.
- Kurokawa M, Ying BW. Precise, High-throughput Analysis of Bacterial Growth. *J Vis Exp* 2017;
- Kweh MF, Merriman KE, Nelson CD. Short communication: Inhibition of DNA methyltransferase and histone deacetylase increases  $\beta$ -defensin expression but not the effects of lipopolysaccharide or 1,25-dihydroxyvitamin D(3) in bovine mammary epithelial cells. *J Dairy Sci* 2019; 102: 5706-12.
- Lahouassa H, Moussay E, Rainard P, Riollet C. Differential cytokine and chemokine responses of bovine mammary epithelial cells to *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Cytokine* 2007; 38: 12-21.
- Lam NH, Ma Z, Ha B-Y. Electrostatic modification of the lipopolysaccharide layer: competing effects of divalent cations and polycationic or polyanionic molecules. *Soft Matter* 2014; 10: 7528-44.
- Lee MJ, Bae J, Lee JH, Park YJ, Lee HAR, Mun S, Kim YS, Yune CJ, Chung TN, Kim K. Serial Change of Endotoxin Tolerance in a Polymicrobial Sepsis Model. *Int J Mol Sci* 2022; 23
- Lee RK, Spielman J, Zhao DY, Olsen KJ, Podack ER. Perforin, Fas ligand, and tumor necrosis factor are the major cytotoxic molecules used by lymphokine-activated killer cells. *The Journal of Immunology* 1996; 157: 1919-25.
- Lehrer RI, Ganz T. Defensins of vertebrate animals. *Curr Opin Immunol* 2002; 14: 96-102.
- Leligdowicz A, Kamm J, Kalantar K, Jauregui A, Vessel K, Caldera S, Serpa PH, Abbott J, Fang X, Tian X, Prakash A, Kangelaris KN, Liu KD, Calfee CS, Langelier C, Matthay MA. Functional Transcriptomic Studies of Immune Responses and Endotoxin Tolerance in Early Human Sepsis. *Shock* 2022; 57: 180-90.
- Liang D, Arnold LM, Stowe CJ, Harmon RJ, Bewley JM. Estimating US dairy clinical disease costs with a stochastic simulation model. *J Dairy Sci* 2017; 100: 1472-86.
- Lima JA, Ruas JR, Vasconcelos AC, Silper BF, Lana AM, Gheller VA, Saturnino HM, Reis RB, Coelho SG. Effects of bovine mammary gland biopsy and increased milking frequency on post-procedure udder health, histology, and milk yield. *Animal* 2016; 10: 838-46.
- Lind M. Etablierung und Anwendung einer Explantkultur der Zitze zur Analyse initialer

Vorgänge bei der Mastitis des Rindes. 2011;

- Lind M, Sipka AS, Schuberth HJ, Blutke A, Wanke R, Sauter-Louis C, Duda KA, Holst O, Rainard P, Germon P, Zerbe H, Petzl W. Location-specific expression of chemokines, TNF-alpha and S100 proteins in a teat explant model. *Innate Immun* 2015; 21: 322-31.
- Liu D, Cao S, Zhou Y, Xiong Y. Recent advances in endotoxin tolerance. *J Cell Biochem* 2019; 120: 56-70.
- Liu ZJ, Yan LN, Li XH, Xu FL, Chen XF, You HB, Gong JP. Up-regulation of IRAK-M is essential for endotoxin tolerance induced by a low dose of lipopolysaccharide in Kupffer cells. *J Surg Res* 2008; 150: 34-9.
- Lopes AM, Magalhães PO, Mazzola PG, Rangel-Yagui CO, de Carvalho JC, Penna TC, Pessoa Jr A. LPS removal from an E. coli fermentation broth using aqueous two-phase micellar system. *Biotechnology progress* 2010; 26: 1644-53.
- Lotz S, Aga E, Wilde I, van Zandbergen G, Hartung T, Solbach W, Laskay T. Highly purified lipoteichoic acid activates neutrophil granulocytes and delays their spontaneous apoptosis via CD14 and TLR2. *J Leukoc Biol* 2004; 75: 467-77.
- Lutzow YC, Donaldson L, Gray CP, Vuocolo T, Pearson RD, Reverter A, Byrne KA, Sheehy PA, Windon R, Tellam RL. Identification of immune genes and proteins involved in the response of bovine mammary tissue to *Staphylococcus aureus* infection. *BMC Vet Res* 2008; 4: 18.
- Macías Luaces L. Untersuchungen in vitro zu epigenetisch wirksamen Immunmodulatoren bei der Pathogen-spezifischen Mastitis des Rindes. 2019;
- Maeda K, Mehta H, Drevets DA, Coggeshall KM. IL-6 increases B-cell IgG production in a feed-forward proinflammatory mechanism to skew hematopoiesis and elevate myeloid production. *Blood* 2010; 115: 4699-706.
- Mahlapu M, Håkansson J, Ringstad L, Björn C. Antimicrobial Peptides: An Emerging Category of Therapeutic Agents. *Front Cell Infect Microbiol* 2016; 6: 194.
- Maity S, Das D, Ambatipudi K. Quantitative alterations in bovine milk proteome from healthy, subclinical and clinical mastitis during *S. aureus* infection. *J Proteomics* 2020; 223: 103815.
- Mangoni ML, Papo N, Barra D, Simmaco M, Bozzi A, Di Giulio A, Rinaldi AC. Effects of the antimicrobial peptide temporin L on cell morphology, membrane permeability and viability of *Escherichia coli*. *Biochemical Journal* 2004; 380: 859-65.
- Maron B, Rolff J, Friedman J, Hayouka Z. Antimicrobial Peptide Combination Can Hinder Resistance Evolution. *Microbiol Spectr* 2022; 10: e0097322.
- Matsue M, Mori Y, Nagase S, Sugiyama Y, Hirano R, Ogai K, Ogura K, Kurihara S, Okamoto S. Measuring the Antimicrobial Activity of Lauric Acid against Various Bacteria in Human Gut Microbiota Using a New Method. *Cell Transplant* 2019; 28: 1528-41.
- Mattar EH, Almehdar HA, Uversky VN, Redwan EM. Virucidal activity of human  $\alpha$ - and  $\beta$ -defensins against hepatitis C virus genotype 4. *Mol Biosyst* 2016; 12: 2785-97.

- Mayer SJ, Waterman AE, Keen PM, Craven N, Bourne FJ. Oxygen concentration in milk of healthy and mastitic cows and implications of low oxygen tension for the killing of *Staphylococcus aureus* by bovine neutrophils. *J Dairy Res* 1988; 55: 513-9.
- McClenahan DJ, Sotos JP, Czuprynski CJ. Cytokine response of bovine mammary gland epithelial cells to *Escherichia coli*, coliform culture filtrate, or lipopolysaccharide. *Am J Vet Res* 2005; 66: 1590-7.
- McDonald PP, Fadok VA, Bratton D, Henson PM. Transcriptional and translational regulation of inflammatory mediator production by endogenous TGF-beta in macrophages that have ingested apoptotic cells. *J Immunol* 1999; 163: 6164-72.
- Medvedev AE, Lentschat A, Wahl LM, Golenbock DT, Vogel SN. Dysregulation of LPS-induced Toll-like receptor 4-MyD88 complex formation and IL-1 receptor-associated kinase 1 activation in endotoxin-tolerant cells. *J Immunol* 2002; 169: 5209-16.
- Mehrzad J, Duchateau L, Burvenich C. Viability of milk neutrophils and severity of bovine coliform mastitis. *J Dairy Sci* 2004; 87: 4150-62.
- Miller KW, Evans RJ, Eisenberg SP, Thompson R. Secretory leukocyte protease inhibitor binding to mRNA and DNA as a possible cause of toxicity to *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* 1989; 171: 2166-72.
- Mitterhuemer S, Petzl W, Krebs S, Mehne D, Klanner A, Wolf E, Zerbe H, Blum H. *Escherichia coli* infection induces distinct local and systemic transcriptome responses in the mammary gland. *BMC Genomics* 2010; 11: 138.
- Moerman L, Bosteels S, Noppe W, Willems J, Clynen E, Schoofs L, Thevissen K, Tytgat J, Van Eldere J, Van Der Walt J. Antibacterial and antifungal properties of  $\alpha$ -helical, cationic peptides in the venom of scorpions from southern Africa. *European journal of biochemistry* 2002; 269: 4799-810.
- Moroz OV, Antson AA, Grist SJ, Maitland NJ, Dodson GG, Wilson KS, Lukanidin E, Bronstein IB. Structure of the human S100A12-copper complex: implications for host-parasite defence. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2003; 59: 859-67.
- Murphy MP, Niedziela DA, Leonard FC, Keane OM. The in vitro host cell immune response to bovine-adapted *Staphylococcus aureus* varies according to bacterial lineage. *Sci Rep* 2019; 9: 6134.
- Nakamura A, Mori Y, Hagiwara K, Suzuki T, Sakakibara T, Kikuchi T, Igarashi T, Ebina M, Abe T, Miyazaki J. Increased susceptibility to LPS-induced endotoxin shock in secretory leukoprotease inhibitor (SLPI)-deficient mice. *The Journal of experimental medicine* 2003; 197: 669-74.
- Nakashige TG, Zhang B, Krebs C, Nolan EM. Human calprotectin is an iron-sequestering host-defense protein. *Nature Chemical Biology* 2015; 11: 765-71.
- Nakatsuji T, Hata TR, Tong Y, Cheng JY, Shafiq F, Butcher AM, Salem SS, Brinton SL, Rudman Spergel AK, Johnson K, Jepson B, Calatroni A, David G, Ramirez-Gama M, Taylor P, Leung DYM, Gallo RL. Development of a human skin commensal microbe for bacteriotherapy of atopic dermatitis and use in a phase 1 randomized clinical trial. *Nat Med* 2021; 27: 700-9.
- Neuvians TP, Schams D, Berisha B, Pfaffl MW. Involvement of pro-inflammatory cytokines, mediators of inflammation, and basic fibroblast growth factor in

- prostaglandin F2alpha-induced luteolysis in bovine corpus luteum. *Biol Reprod* 2004; 70: 473-80.
- Ngassam-Tchamba C, Duprez JN, Fergestad M, De Visscher A, L'Abée-Lund T, De Vlieghe S, Wasteson Y, Touzain F, Blanchard Y, Lavigne R, Chanishvili N, Cassart D, Mainil J, Thiry D. In vitro and in vivo assessment of phage therapy against *Staphylococcus aureus* causing bovine mastitis. *J Glob Antimicrob Resist* 2020; 22: 762-70.
- Nugteren S, Samsom JN. Secretory Leukocyte Protease Inhibitor (SLPI) in mucosal tissues: Protects against inflammation, but promotes cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 2021; 59: 22-35.
- Oard S, Enright F. Expression of the antimicrobial peptides in plants to control phytopathogenic bacteria and fungi. *Plant cell reports* 2006; 25: 561-72.
- Oberberger L. Durchflusszytometrische Analyse des Milch-Differentialzellbildes in-vivo und post mortem. *Vetresearch Retreat 2019 LMU 2019*;
- Ogola H, Shitandi A, Nanua J. Effect of mastitis on raw milk compositional quality. *J Vet Sci* 2007; 8: 237-42.
- Oguiura N, Corrêa PG, Rosmino IL, de Souza AO, Pasqualoto KFM. Antimicrobial Activity of Snake  $\beta$ -Defensins and Derived Peptides. *Toxins (Basel)* 2021; 14
- Ohlsson S, Ljungkrantz I, Ohlsson K, Segelmark M, Wieslander J. Novel distribution of the secretory leucocyte proteinase inhibitor in kidney. *Mediators of inflammation* 2001; 10: 347-50.
- Okada M, Kitahara M, Kishimoto S, Matsuda T, Hirano T, Kishimoto T. IL-6/BSF-2 functions as a killer helper factor in the in vitro induction of cytotoxic T cells. *The Journal of Immunology* 1988; 141: 1543-9.
- Olson ME, Ceri H, Morck DW, Buret AG, Read RR. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Can J Vet Res* 2002; 66: 86-92.
- Oviedo-Boyso J, Valdez-Alarcón JJ, Cajero-Juárez M, Ochoa-Zarzosa A, López-Meza JE, Bravo-Patiño A, Baizabal-Aguirre VM. Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. *Journal of infection* 2007; 54: 399-409.
- Paape MJ, Bannerman DD, Zhao X, Lee J-W. The bovine neutrophil: Structure and function in blood and milk. *Vet Res* 2003; 34: 597-627.
- Pawliński B, Gołębiowski M, Trela M, Witkowska-Piłaszewicz O. Comparison of blood gas parameters, ions, and glucose concentration in polish Holstein-Friesian Dairy cows at different milk production levels. *Sci Rep* 2023; 13: 1414.
- Pena OM, Pistolic J, Raj D, Fjell CD, Hancock RE. Endotoxin tolerance represents a distinctive state of alternative polarization (M2) in human mononuclear cells. *J Immunol* 2011; 186: 7243-54.
- Peng L, Li L, He XL, Yu JY, Zeng ZJ, Yang WJ, Zhang B, Zhang TS, Cao H, Huang SH, Liu LQ. Memantine Displays Antimicrobial Activity by Enhancing *Escherichia coli* Pathogen-Induced Formation of Neutrophil Extracellular Traps. *Front Cell Infect Microbiol* 2020; 10: 47.

- Persson K, Larsson I, Hallén Sandgren C. Effects of certain inflammatory mediators on bovine neutrophil migration in vivo and in vitro. *Vet Immunol Immunopathol* 1993; 37: 99-112.
- Petersson-Wolfe CS, Leslie KE, Swartz TH. An Update on the Effect of Clinical Mastitis on the Welfare of Dairy Cows and Potential Therapies. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 2018; 34: 525-35.
- Petzl W, Zerbe H, Günther J, Yang W, Seyfert HM, Nürnberg G, Schuberth HJ. *Escherichia coli*, but not *Staphylococcus aureus* triggers an early increased expression of factors contributing to the innate immune defense in the udder of the cow. *Vet Res* 2008; 39: 18.
- Petzl W, Gunther J, Pfister T, Sauter-Louis C, Goetze L, von Aulock S, Hafner-Marx A, Schuberth HJ, Seyfert HM, Zerbe H. Lipopolysaccharide pretreatment of the udder protects against experimental *Escherichia coli* mastitis. *Innate Immun* 2012; 18: 467-77.
- Petzl W, Günther J, Mühlbauer K, Seyfert HM, Schuberth HJ, Hussen J, Sauter-Louis C, Hafner-Marx A, Zerbe H. Early transcriptional events in the udder and teat after intra-mammary *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* challenge. *Innate Immun* 2016; 22: 294-304.
- Petzl W, Zerbe H, Günther J, Seyfert HM, Hussen J, Schuberth HJ. Pathogen-specific responses in the bovine udder. Models and immunoprophylactic concepts. *Res Vet Sci* 2018; 116: 55-61.
- Pinto IS, Fonseca I, Brandão HM, Gern JC, Guimarães AS, Carvalho WA, Brito MA, Viccini LF, Martins MF. SHORT-COMMUNICATION Evaluation of perfused bovine udder for gene expression studies in dairy cows. *Genet Mol Res* 2017; 16
- Pirr S, Richter M, Fehlhaber B, Pagel J, Härtel C, Roth J, Vogl T, Viemann D. High Amounts of S100-Alarmins Confer Antimicrobial Activity on Human Breast Milk Targeting Pathogens Relevant in Neonatal Sepsis. *Front Immunol* 2017; 8: 1822.
- Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu M-Y, Huffel CV, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B. Defective LPS Signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr Mice: Mutations in *Tlr4* Gene. *Science* 1998; 282: 2085-8.
- Price LB, Stegger M, Hasman H, Aziz M, Larsen J, Andersen PS, Pearson T, Waters AE, Foster JT, Schupp J, Gillece J, Driebe E, Liu CM, Springer B, Zdovc I, Battisti A, Franco A, Żmudzki J, Schwarz S, Butaye P, Jouy E, Pomba C, Porrero MC, Ruimy R, Smith TC, Robinson DA, Weese JS, Arriola CS, Yu F, Laurent F, Keim P, Skov R, Aarestrup FM, Baquero F. *Staphylococcus aureus* CC398: Host Adaptation and Emergence of Methicillin Resistance in Livestock. *mBio* 2012; 3: e00305-11.
- Rabot A, Wellnitz O, Meyer HH, Bruckmaier RM. Use and relevance of a bovine mammary gland explant model to study infection responses in bovine mammary tissue. *J Dairy Res* 2007; 74: 93-9.
- Raj A, Kulangara V, Vareed TP, Melepat DP, Chattothayil L, Chullipparambil S. Variations in the levels of acute-phase proteins and lactoferrin in serum and milk during bovine subclinical mastitis. *J Dairy Res* 2021; 88: 321-5.
- Ramachander Turaga V. Peptaibols: antimicrobial peptides from fungi. *Bioactive Natural Products in Drug Discovery* 2020: 713-30.



- Ramani M, Ponnusamy S, Muthamizhchelvan C, Marsili E. Amino acid-mediated synthesis of zinc oxide nanostructures and evaluation of their facet-dependent antimicrobial activity. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2014; 117: 233-9.
- Ranasinghe R, Eri R. Modulation of the CCR6-CCL20 Axis: A Potential Therapeutic Target in Inflammation and Cancer. *Medicina (Kaunas)* 2018; 54
- Regenhard P, Petzl W, Zerbe H, Sauerwein H. The antibacterial psoriasin is induced by *E. coli* infection in the bovine udder. *Vet Microbiol* 2010; 143: 293-8.
- Rinaldi M, Li RW, Bannerman DD, Daniels KM, Evock-Clover C, Silva MV, Paape MJ, Van Ryssen B, Burvenich C, Capuco AV. A sentinel function for teat tissues in dairy cows: dominant innate immune response elements define early response to *E. coli* mastitis. *Funct Integr Genomics* 2010; 10: 21-38.
- Riollet C, Rainard P, Poutrel B. Differential induction of complement fragment C5a and inflammatory cytokines during intramammary infections with *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology* 2000; 7: 161-7.
- Rogers AT, Bullard KR, Dod AC, Wang Y. Bacterial Growth Curve Measurements with a Multimode Microplate Reader. *Bio Protoc* 2022; 12: e4410.
- Rohmeier L. Etablierung eines Mastitisinfektionsmodells zur Untersuchung vorteilhafter Wirtsdeterminanten bei der Kuh. 2018;
- Roque-Borda CA, da Silva PB, Rodrigues MC, Azevedo RB, Di Filippo L, Duarte JL, Chorilli M, Festozo Vicente E, Pavan FR. Challenge in the Discovery of New Drugs: Antimicrobial Peptides against WHO-List of Critical and High-Priority Bacteria. *Pharmaceutics* 2021; 13
- Rosen T, Nolan EM. Metal Sequestration and Antimicrobial Activity of Human Calprotectin Are pH-Dependent. *Biochemistry* 2020; 59: 2468-78.
- Rosenberger G. Die klinische Untersuchung des Rindes. 1990;
- Ryan LK, Rhodes J, Bhat M, Diamond G. Expression of beta-defensin genes in bovine alveolar macrophages. *Infect Immun* 1998; 66: 878-81.
- Ryman VE, Pighetti GM, Lippolis JD, Gandy JC, Applegate CM, Sordillo LM. Quantification of bovine oxylipids during intramammary *Streptococcus uberis* infection. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2015; 121: 207-17.
- Saleem HD, Razooqi MA, Gharban HAJ. Cumulative Effect of Subclinical Mastitis on Immunological and Biochemical Parameters in Cow Milk. *Arch Razi Inst* 2021; 76: 1629-38.
- Sallenave J-M, Shulmann J, Crossley J, Jordana M, Gauldie J. Regulation of secretory leukocyte proteinase inhibitor (SLPI) and elastase-specific inhibitor (ESI/elafin) in human airway epithelial cells by cytokines and neutrophilic enzymes. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 1994; 11: 733-41.
- Samaniego R, Gutiérrez-González A, Gutiérrez-Seijo A, Sánchez-Gregorio S, García-Giménez J, Mercader E, Márquez-Rodas I, Avilés JA, Relloso M, Sánchez-Mateos P. CCL20 Expression by Tumor-Associated Macrophages Predicts Progression of Human Primary Cutaneous Melanoma Role of CCR6/CCL20 in Melanoma Progression. *Cancer Immunology Research* 2018; 6: 267-75.

- Scapini P, Laudanna C, Pinardi C, Allavena P, Mantovani A, Sozzani S, Cassatella MA. Neutrophils produce biologically active macrophage inflammatory protein-3alpha (MIP-3alpha)/CCL20 and MIP-3beta/CCL19. *Eur J Immunol* 2001; 31: 1981-8.
- Schabmeyer ST, Kneidl AM, Schneider JK, Kirsch S, Zablotzki Y, Petzl W, Weber F, Zerbe H, Meyerholz MM. Concentration-Dependent Type 1 Interferon-Induced Regulation of MX1 and FABP3 in Bovine Endometrial Explants. *Animals (Basel)* 2021; 11
- Schaer CA, Deuel JW, Bittermann AG, Rubio IG, Schoedon G, Spahn DR, Wepf RA, Vallelian F, Schaer DJ. Mechanisms of haptoglobin protection against hemoglobin peroxidation triggered endothelial damage. *Cell Death Differ* 2013; 20: 1569-79.
- Schonwetter BS, Stolzenberg ED, Zasloff MA. Epithelial antibiotics induced at sites of inflammation. *Science* 1995; 267: 1645-8.
- Schrag NFD, Godden SM, Apley MD, Singer RS, Lubbers BV. Antimicrobial use quantification in adult dairy cows - Part 3 - Use measured by standardized regimens and grams on 29 dairies in the United States. *Zoonoses Public Health* 2020; 67 Suppl 1: 82-93.
- Semba RD, Kumwenda N, Taha TE, Hoover DR, Lan Y, Eisinger W, Mtimavalye L, Broadhead R, Miotti PG, Van Der Hoeven L, Chipangwi JD. Mastitis and immunological factors in breast milk of lactating women in Malawi. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999; 6: 671-4.
- Semba RD. Mastitis and transmission of human immunodeficiency virus through breast milk. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 918: 156-62.
- Shandilya UK, Sharma A, Sodhi M, Kapila N, Kishore A, Mohanty A, Kataria R, Malakar D, Mukesh M. Matrix-based three-dimensional culture of buffalo mammary epithelial cells showed higher induction of genes related to milk protein and fatty acid metabolism. *Cell Biol Int* 2016; 40: 232-8.
- Sharifi S, Pakdel A, Ebrahimi M, Reecy JM, Fazeli Farsani S, Ebrahimie E. Integration of machine learning and meta-analysis identifies the transcriptomic bio-signature of mastitis disease in cattle. *PLoS One* 2018; 13: e0191227.
- Shinozuka Y, Suzuki N, Kaneko S, Kawai K, Kurumisawa T, Shimizu Y, Imanishi T, Ohno A, Takahashi M, Isobe N. Regression tree analysis of the relationship between the concentrations of antimicrobial components and the microbiota of normal milk from dairy cows. *J Vet Med Sci* 2022; 84: 310-8.
- Shuster DE, Kehrli Jr ME, Rainard P, Paape M. Complement fragment C5a and inflammatory cytokines in neutrophil recruitment during intramammary infection with *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1997; 65: 3286-92.
- Sieuwert S, De Bok FAM, Mols E, De Vos WM, Van Hylckama Vlieg JET. A simple and fast method for determining colony forming units. *Letters in Applied Microbiology* 2008; 47: 275-8.
- Silva DM, Costa PAD, Ribon AOB, Purgato GA, Gaspar DM, Diaz MAN. Plant Extracts Display Synergism with Different Classes of Antibiotics. *An Acad Bras Cienc* 2019; 91: e20180117.
- Silva LG, Ferguson BS, Faciola AP. Rapid Communication: Prolactin and hydrocortisone impact TNF $\alpha$ -mediated mitogen-activated protein kinase signaling and

- inflammation of bovine mammary epithelial (MAC-T) cells. *J Anim Sci* 2017; 95: 5524-31.
- Singh P, Ali SA. Multifunctional Role of S100 Protein Family in the Immune System: An Update. *Cells* 2022; 11
- Sipka A, Pomeroy B, Klaessig S, Schukken Y. Bovine natural killer cells are present in *Escherichia coli* infected mammary gland tissue and show antimicrobial activity in vitro. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases* 2016; 48: 54-60.
- Skott P, Lucht E, Ehnlund M, Björling E. Inhibitory function of secretory leukocyte proteinase inhibitor (SLPI) in human saliva is HIV-1 specific and varies with virus tropism. *Oral Dis* 2002; 8: 160-7.
- Smolenski GA, Cursons RT, Hine BC, Wheeler TT. Keratin and S100 calcium-binding proteins are major constituents of the bovine teat canal lining. *Vet Res* 2015; 46: 113.
- Sorge US, Huber-Schlenstedt R, Schierling K. In vitro antimicrobial resistance profiles of *Streptococcus uberis*, *Lactococcus* spp., and *Enterococcus* spp. from quarter milk samples of cows between 2015 and 2019 in Southern Germany. *J Dairy Sci* 2021; 104: 5998-6012.
- Souza LMP, Nascimento JB, Romeu AL, Estrada-López ED, Pimentel AS. Penetration of antimicrobial peptides in a lung surfactant model. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2018; 167: 345-53.
- Starr CG, Wimley WC. Antimicrobial peptides are degraded by the cytosolic proteases of human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 2017; 1859: 2319-26.
- Steel DM, Rogers JT, DeBeer MC, DeBeer FC, Whitehead AS. Biosynthesis of human acute-phase serum amyloid A protein (A-SAA) in vitro: the roles of mRNA accumulation, poly(A) tail shortening and translational efficiency. *Biochem J* 1993; 291 ( Pt 3): 701-7.
- Steinbakk M, Naess-Andresen CF, Lingaas E, Dale I, Brandtzaeg P, Fagerhol MK. Antimicrobial actions of calcium binding leucocyte L1 protein, calprotectin. *Lancet* 1990; 336: 763-5.
- Stevenson K, McVey AF, Clark IBN, Swain PS, Pilizota T. General calibration of microbial growth in microplate readers. *Sci Rep* 2016; 6: 38828.
- Sun Y, Shang D. Inhibitory Effects of Antimicrobial Peptides on Lipopolysaccharide-Induced Inflammation. *Mediators Inflamm* 2015; 2015: 167572.
- Svensson D, Aidoukovitch A, Anders E, Jonsson D, Nebel D, Nilsson BO. Secretory leukocyte protease inhibitor regulates human periodontal ligament cell production of pro-inflammatory cytokines. *Inflamm Res* 2017; 66: 823-31.
- Taggart CC, Cryan SA, Weldon S, Gibbons A, Greene CM, Kelly E, Low TB, O'Neill S J, McElvaney NG. Secretory leucoprotease inhibitor binds to NF-kappaB binding sites in monocytes and inhibits p65 binding. *J Exp Med* 2005; 202: 1659-68.
- Tan J, Xu T, Gou Y, Wang H, Liang Z, Cao Y, Wang H, Yu Y, Jiao N, Zhang Z. CCL20/CCR6 axis mediates macrophages to promote proliferation and migration of ESCs by blocking autophagic flux in endometriosis. *Stem Cell Res Ther* 2022;

13: 294.

- Tang KL, Caffrey NP, Nóbrega DB, Cork SC, Ronksley PE, Barkema HW, Polachek AJ, Ganshorn H, Sharma N, Kellner JD. Restricting the use of antibiotics in food-producing animals and its associations with antibiotic resistance in food-producing animals and human beings: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Planetary Health* 2017; 1: e316-e27.
- Tatum JL, Kelloff GJ, Gillies RJ, Arbeit JM, Brown JM, Chao KS, Chapman JD, Eckelman WC, Fyles AW, Giaccia AJ, Hill RP, Koch CJ, Krishna MC, Krohn KA, Lewis JS, Mason RP, Melillo G, Padhani AR, Powis G, Rajendran JG, Reba R, Robinson SP, Semenza GL, Swartz HM, Vaupel P, Yang D, Croft B, Hoffman J, Liu G, Stone H, Sullivan D. Hypoxia: importance in tumor biology, noninvasive measurement by imaging, and value of its measurement in the management of cancer therapy. *Int J Radiat Biol* 2006; 82: 699-757.
- Tetens J, Friedrich JJ, Hartmann A, Schwerin M, Kalm E, Thaller G. The spatial expression pattern of antimicrobial peptides across the healthy bovine udder. *J Dairy Sci* 2010; 93: 775-83.
- Thomas CJ, Schroder K. Pattern recognition receptor function in neutrophils. *Trends Immunol* 2013; 34: 317-28.
- Thomas FC, Geraghty T, Simões PBA, Mshelbwala FM, Haining H, Eckersall PD. A pilot study of acute phase proteins as indicators of bovine mastitis caused by different pathogens. *Res Vet Sci* 2018; 119: 176-81.
- Titze I, Lehnherr T, Lehnherr H, Krömker V. Efficacy of Bacteriophages Against *Staphylococcus aureus* Isolates from Bovine Mastitis. *Pharmaceuticals (Basel)* 2020; 13
- Tot T, Kibel S, Sardelić S, Nemer K, Benčić A, Vraneš J, Krilanović M, Jelić M, Tripković M, Bubonja-Šonje M, Bedenić B. Polyclonal spread of colistin resistant *Klebsiella pneumoniae* in Croatian hospitals and outpatient setting. *Germs* 2021; 11: 163-78.
- Tsugami Y, Wakasa H, Kawahara M, Nishimura T, Kobayashi K. Lipopolysaccharide and lipoteichoic acid influence milk production ability via different early responses in bovine mammary epithelial cells. *Exp Cell Res* 2021; 400: 112472.
- vaccin, Sharun K, Dhama K, Tiwari R, Gugjoo MB, Iqbal Yattoo M, Patel SK, Pathak M, Karthik K, Khurana SK, Singh R, Puvvala B, Amarpal, Singh R, Singh KP, Chaicumpa W. Advances in therapeutic and management approaches of bovine mastitis: a comprehensive review. *Vet Q* 2021; 41: 107-36.
- Valdez-Miramontes C, De Haro-Acosta J, Aréchiga-Flores C, Verdiguél-Fernández L, Rivas-Santiago B. Antimicrobial peptides in domestic animals and their applications in veterinary medicine. *Peptides* 2021; 142: 170576.
- Van der Valk J, Brunner D, De Smet K, Svenningsen ÅF, Honegger P, Knudsen LE, Lindl T, Noraberg J, Price A, Scarino M. Optimization of chemically defined cell culture media—replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods. *Toxicology in vitro* 2010; 24: 1053-63.
- van Soest FJS, Abbeloos E, McDougall S, Hogeveen H. Addition of meloxicam to the treatment of bovine clinical mastitis results in a net economic benefit to the dairy farmer. *J Dairy Sci* 2018; 101: 3387-97.

- Vesterinen HM, Corfe IJ, Sinkkonen V, Iivanainen A, Jernvall J, Laakkonen J. Teat Morphology Characterization With 3D Imaging. *Anat Rec (Hoboken)* 2015; 298: 1359-66.
- Vogl T, Gharibyan AL, Morozova-Roche LA. Pro-inflammatory S100A8 and S100A9 proteins: self-assembly into multifunctional native and amyloid complexes. *Int J Mol Sci* 2012; 13: 2893-917.
- Vouille V, Amiche M, Nicolas P. Structure of genes for dermaseptins B, antimicrobial peptides from frog skin. Exon 1-encoded prepropeptide is conserved in genes for peptides of highly different structures and activities. *FEBS Lett* 1997; 414: 27-32.
- Wang D, Liu L, Augustino SMA, Duan T, Hall TJ, MacHugh DE, Dou J, Zhang Y, Wang Y, Yu Y. Identification of novel molecular markers of mastitis caused by *Staphylococcus aureus* using gene expression profiling in two consecutive generations of Chinese Holstein dairy cattle. *Journal of animal science and biotechnology* 2020; 11: 98.
- Wang S, Song R, Wang Z, Jing Z, Wang S, Ma J. S100A8/A9 in Inflammation. *Front Immunol* 2018; 9: 1298.
- Weller M, Fonseca I, Sbardella AP, Pinto ISB, Viccini LF, Brandão HM, Gern JC, Carvalho WA, Guimarães AS, Brito M, Munari DP, Silva M, Martins MF. Isolated perfused udder model for transcriptome analysis in response to *Streptococcus agalactiae*. *J Dairy Res* 2019; 86: 307-14.
- Wellnitz O, Kerr DE. Cryopreserved bovine mammary cells to model epithelial response to infection. *Vet Immunol Immunopathol* 2004; 101: 191-202.
- Wellnitz O, Arnold ET, Bruckmaier RM. Lipopolysaccharide and lipoteichoic acid induce different immune responses in the bovine mammary gland. *J Dairy Sci* 2011; 94: 5405-12.
- Whelehan CJ, Meade KG, Eckersall PD, Young FJ, O'Farrelly C. Experimental *Staphylococcus aureus* infection of the mammary gland induces region-specific changes in innate immune gene expression. *Vet Immunol Immunopathol* 2011; 140: 181-9.
- Wiedow O, Harder J, Bartels J, Streit V, Christophers E. Antileukoprotease in human skin: an antibiotic peptide constitutively produced by keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 248: 904-9.
- Wieland T, Assmann J, Bethe A, Fidelak C, Gmoser H, Janßen T, Kotthaus K, Lübke-Becker A, Wieler LH, Urban GA. A Real-Time Thermal Sensor System for Quantifying the Inhibitory Effect of Antimicrobial Peptides on Bacterial Adhesion and Biofilm Formation. *Sensors* 2021; 21: 2771.
- Williamson JH, Woolford MW, Day AM. The prophylactic effect of a dry-cow antibiotic against *Streptococcus uberis*. *N Z Vet J* 1995; 43: 228-34.
- Wilson DJ, Mallard BA, Burton JL, Schukken YH, Grohn YT. Association of *Escherichia coli* J5-specific serum antibody responses with clinical mastitis outcome for J5 vaccinate and control dairy cattle. *Clin Vaccine Immunol* 2009; 16: 209-17.
- Wu HH, Zhao XJ, Zhang CQ, Liu JX. Establishment of mammary tissue culture: an in vitro model for bovine lactation. *Journal of Animal and Feed Sciences* 2004; 13: 575-8.

- Wu Y, Sun Y, Dong X, Chen J, Wang Z, Chen J, Dong G. The Synergism of PGN, LTA and LPS in Inducing Transcriptome Changes, Inflammatory Responses and a Decrease in Lactation as Well as the Associated Epigenetic Mechanisms in Bovine Mammary Epithelial Cells. *Toxins (Basel)* 2020; 12
- Xu T, Dong Z, Wang X, Qi S, Li X, Cheng R, Liu X, Zhang Y, Gao MQ. IL-1 $\beta$  induces increased tight junction permeability in bovine mammary epithelial cells via the IL-1 $\beta$ -ERK1/2-MLCK axis upon blood-milk barrier damage. *J Cell Biochem* 2018; 119: 9028-41.
- Yang D, Chen Q, Schmidt AP, Anderson GM, Wang JM, Wooters J, Oppenheim JJ, Chertov O. LL-37, the neutrophil granule- and epithelial cell-derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T cells. *The Journal of experimental medicine* 2000; 192: 1069-74.
- Yang D, Chen Q, Hoover DM, Staley P, Tucker KD, Lubkowski J, Oppenheim JJ. Many chemokines including CCL20/MIP-3 $\alpha$  display antimicrobial activity. *J Leukoc Biol* 2003; 74: 448-55.
- Yang W, Zerbe H, Petzl W, Brunner RM, Günther J, Draing C, von Aulock S, Schubert HJ, Seyfert HM. Bovine TLR2 and TLR4 properly transduce signals from *Staphylococcus aureus* and *E. coli*, but *S. aureus* fails to both activate NF-kappaB in mammary epithelial cells and to quickly induce TNF $\alpha$  and interleukin-8 (CXCL8) expression in the udder. *Mol Immunol* 2008; 45: 1385-97.
- Yeaman MR, Yount NY. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol Rev* 2003; 55: 27-55.
- Yoshioka M, Watanabe A, Shimada N, Murata H, Yokomizo Y, Nakajima Y. Regulation of haptoglobin secretion by recombinant bovine cytokines in primary cultured bovine hepatocytes. *Domest Anim Endocrinol* 2002; 23: 425-33.
- Zabieglo K, Majewski P, Majchrzak-Gorecka M, Włodarczyk A, Grygier B, Zegar A, Kapinska-Mrowiecka M, Naskalska A, Pyrc K, Dubin A. The inhibitory effect of secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) on formation of neutrophil extracellular traps. *Journal of Leukocyte Biology* 2015; 98: 99-106.
- Zadoks RN, Allore HG, Barkema HW, Sampimon OC, Gröhn YT, Schukken YH. Analysis of an outbreak of *Streptococcus uberis* mastitis. *J Dairy Sci* 2001; 84: 590-9.
- Zalewska M, Kawecka-Grochocka E, Słoniewska D, Kościuczuk E, Marczak S, Jarmuż W, Zwierzchowski L, Bagnicka E. Acute phase protein expressions in secretory and cistern lining epithelium tissues of the dairy cattle mammary gland during chronic mastitis caused by staphylococci. *BMC Vet Res* 2020; 16: 320.
- Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 2002; 415: 389-95.
- Zhang JX, Zhang SF, Wang TD, Guo XJ, Hu RL. Mammary gland expression of antibacterial peptide genes to inhibit bacterial pathogens causing mastitis. *J Dairy Sci* 2007; 90: 5218-25.
- Zhang W, Li X, Xu T, Ma M, Zhang Y, Gao MQ. Inflammatory responses of stromal fibroblasts to inflammatory epithelial cells are involved in the pathogenesis of bovine mastitis. *Exp Cell Res* 2016; 349: 45-52.
- Zhang Y, DeWitt DL, McNeely TB, Wahl SM, Wahl LM. Secretory leukocyte protease

- inhibitor suppresses the production of monocyte prostaglandin H synthase-2, prostaglandin E2, and matrix metalloproteinases. *J Clin Invest* 1997; 99: 894-900.
- Zhong K, Zhang CY, Zha GM, Wang XJ, Jiao XQ, Zhu HS, Wang YY. S100 calcium-binding protein A12 as a diagnostic index for subclinical mastitis in cows. *Reprod Domest Anim* 2018; 53: 1442-7.
- Zhu J, Nathan C, Jin W, Sim D, Ashcroft GS, Wahl SM, Lacomis L, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Wright CD. Conversion of proepithelin to epithelins: roles of SLPI and elastase in host defense and wound repair. *Cell* 2002; 111: 867-78.
- Zhylkaidar A, Oryntaev K, Altenov A, Kylpybai E, Chayxmet E. Prevention of Bovine Mastitis through Vaccination. *Arch Razi Inst* 2021; 76: 1381-7.
- Zimov JL, Botheras NA, Weiss WP, Hogan JS. Associations among behavioral and acute physiologic responses to lipopolysaccharide-induced clinical mastitis in lactating dairy cows. *Am J Vet Res* 2011; 72: 620-7

## IX. DANKSAGUNG

Allen voran möchte ich mich ganz herzlich bei meinem Betreuer Herrn Univ.-Prof. Dr. Wolfram Petzl bedanken, dass ich dieses spannende Projekt bearbeiten durfte. Danke für die immer positive Einstellung, unsere konstruktiven Gespräche und die zuverlässige, super Betreuung durch alle Höhen und Tiefen. Nicht zu vergessen ist natürlich auch seine unbezahlbare Beratung in allen Lebenslagen.

Besonders möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. Holm Zerbe bedanken für die selbstverständliche Aufnahme an den Lehrstuhl und in das Forschungsteam.

Mein Dank gilt dem gesamten SeMasttau-Team, das durch angeregte Diskussionen stets positive Impulse für die Laborarbeit geben konnte. Ein Labor ohne Frau Sandra Kirsch – das ist einfach unvorstellbar. Danke für deinen unermüdlichen Einsatz, deine produktiven Ideen, die unzähligen philosophischen Gespräche mit Keksen und Tee und deine Freundschaft. Ein großes Dankeschön auch an Herrn Dr. Frank Weber für die immer konstruktive Kritik, das ausdauernde Interesse und die wertvolle Korrekturarbeit. Ein riesiges Dankeschön gilt außerdem Frau Dr. Anna Kneidl und Frau Dr. Simone Schabmeyer für die unzähligen Fahrten zum Schlachthof und die Stunden im Labor mit allem was dazu gehört: Kiloweise Süßigkeiten, lautstarkem Mitgrölen, angeregten Gesprächen, hysterischem Gelächter, kalten Zehen, und manchmal einer kleinen Prise Verzweiflung. Danke Simone für die tolle Korrekturarbeit und für die vielen schönen (tierischen und musikalischen) gemeinsamen Jahre.

Mit der Hilfe von Herrn Dr. Yury Zablotzki ist Statistik und vor allem „R“ kein unbekanntes Schreckgespenst mehr, sondern zu einem sehr hilfreichen Tool geworden, ein großes Dankeschön hierfür.

Vielen Dank an die H. Wilhelm Schaumannstiftung, die dieses Projekt unterstützt und somit finanziell für mich möglich gemacht hat.

Vielen Dank auch an die amtliche Fleischhygieneüberwachung des Schlachthofs und die Mitarbeiter des LVGs, die eine reibungslose Probenentnahme ermöglichten.

Ein besonderes Dankeschön geht an meine Arbeitskollegen, für euer Verständnis



und die immer gute Laune.

Danke an alle meine treuen Freunde, die immer für mich da waren. Vor allem natürlich Carina, Elena und Vreni für die regelmäßige (gegenseitige) Telefonseelsorge. Es ist schön zu wissen, dass man nie alleine dasteht (oder -liegt).

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meiner Familie und vor allem bei meinen Eltern und meiner Tante bedanken, für euren bedingungslosen Rückhalt, euren Optimismus und eure beständige Unterstützung. Lieber Robert, danke, für die vielen wunderbaren Jahre, die du nun schon mit mir durch dick und dünn gegangen bist. Du bist und warst immer mein Ruhepol und hast mir außerdem durch deinen zuverlässigen technischen Support das Leben mit der Dissertation jeden Tag erleichtert.