Aus dem Lehrstuhl für Physiologie
der Technischen Universität München, Weihenstephan

Vorstand: Prof. Dr. Dr. H.H.D. Meyer

Vorgelegt über Univ. Prof. Dr. B. Kaspers aus dem
Institut für Physiologie, Physiologische Chemie und Tierernährung
Lehrstuhl für Physiologie
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

# Die Immunantwort boviner und capriner Euterepithelzellen auf verschiedene Mastitiserreger

Inaugural-Dissertation

Zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Peter Reith

aus Lüdenscheid

**München 2006**

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

| | |
|---|---|
| Dekan: | Univ.-Prof. Dr. E. P. Märtlbauer |
| Referent: | Univ.-Prof. Dr. B. Kaspers |
| Korreferent: | Univ.-Prof.Dr. H. Zerbe |

Tag der Promotion: 28.Juli 2006

*MEINEN ELTERN UND GINA*

# Inhaltsverzeichnis:

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS:.....7**

**1. EINLEITUNG UND AUFGABENSTELLUNG:.....10**

**2. LITERATURÜBERSICHT:.....12**

2.1 STÖRUNGEN DER EUTERGESUNDHEIT .....12
*2.1.1 Verschiedene Formen und ihre Bedeutung .....12*
2.2 MASTITIS.....12
*2.2.1 Definition und Einteilungen.....12*
*2.2.2 Bedeutung der Mastitis und wirtschaftliche Hintergründe .....13*
*2.2.3 Ätiologie und Pathogenese.....14*
*2.2.4 Escherichia coli Mastitis.....17*
2.2.4.1 Lipopolysaccharid .....19
2.2.4.2 Toxine.....20
2.2.4.3 Pathogenität von Mastitis-isolierten *E.coli*.....20
*2.2.5 Staphylokokken Mastitis:.....21*
2.2.5.1 Staphylococcus aureus:.....22
2.2.5.2 Lipoteichonsäure : .....23
2.2.5.3 Peptidoglykan und Muropeptide: .....25
2.2.5.4 Koagulase-negative Staphylokokken : .....25
*2.2.6 Streptokokken:.....26*
2.2.6.1 Streptococcus uberis.....26
*2.2.7 Bedeutung und Verlauf einer Mastitis bei der Ziege .....28*
2.3. DIE ANTWORT DES WIRTS AUF MASTITISERREGER.....29
*2.3.1 Das spezifische Immunsystem.....30*
*2.3.2 Das unspezifische Immunsystem.....30*
*2.3.3 Die Rolle der Epithelzellen bei der intramammären Immunabwehr.....32*
2.4 ZYTOKINE.....33
2.5 CHEMOKINE.....34
2.6 AKUT-PHASE PROTEINE .....35
2.7 CD45 .....36
2.8 TOLL-LIKE REZEPTOREN .....36

**3. MATERIAL UND METHODEN.....39**

3.1 MATERIAL .....39
*3.1.1 Lösungen, Puffer und Medien:.....39*
*3.1.2 Verbrauchsmaterialien:.....41*
*3.1.3 Geräte:.....42*
3.2 METHODEN:.....45
*3.2.1 Primäre Epithelzellkultur .....45*
*3.2.2: Gewinnung von primären bovinen Epithelzellkulturen aus Eutergewebe: .....45*
*3.2.3 Gewinnung von primären bovinen Epithelzellkulturen aus Milch: .....47*
*3.2.4 Gewinnung von primären caprinen Epithelzellkulturen aus Milch.....48*
*3.2.5 Passagieren von Zellen: .....49*
*3.2.6 Zellzahlbestimmung in der Neubauer Zählkammer:.....49*
*3.2.7 Einfrieren und Auftauen von Zellen:.....50*

3.3 ANZÜCHTUNG UND INAKTIVIERUNG VON *ESCHERICHIA COLI*, *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* UND *STREPTOCOCCUS UBERIS*: ..... 50
3.4 VERSUCHSMODELL: ..... 52
*3.4.1: Behandlung mit den verschiedenen Mastitis Erregern:* ..... *52*
*3.4.2: RNA Gewinnung:* ..... *53*
3.4.2.1: Überprüfung der RNA Quantität: ..... 54
3.4.2.2 Überprüfung der RNA Qualität: ..... 54
*3.4.3.: Reverse Transkription-quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR):* ..... *55*
3.4.3.1 PCR Protokoll: ..... 58
3.4.3.2 Gel – Elektrophorese: ..... 59
*3.4.4 Primer* ..... *60*
3.5. IMMUNOHISTOCHEMIE: ..... 61
3.6 STATISTIK ..... 62
3.7 INTERLEUKIN-8 ELISA ..... 62

**4. ERGEBNISSE ..... 64**

4.1 ZELLKULTUREN ..... 64
*4.1.1 Morphologie und Wachstumsverhalten* ..... *64*
*4.1.2 Immunohistochemie:* ..... *67*
*4.1.3 quantitative RT-PCR mit CD45* ..... *68*
*4.1.4 Bakterien* ..... *70*
4.1.4.1 Wachstumskurven *E.coli* ..... 70
4.1.4.2 Wachstumskurven *S.aureus* ..... 71
4.1.4.3 Wachstumskurven *Str.uberis* ..... 72
4.1.4.4 Wachstumskurven *koagulase negative Staphylokokken* ..... 73
4.2 VERSUCHE ..... 74
*4.2.1 Behandlung der bovinen Epithelzellen mit Lipopolysaccharid, Lipoteichonsäure und Peptidoglykanen* ..... *74*
*4.2.2 Vergleich der TNF alpha mRNA-Expression von bovinen Epithelzellen aus der Milch mit denen aus dem Gewebe* ..... *77*
*4.2.3 Toll like Rezeptoren 2 und 4* ..... *78*
*4.2.4 mRNA-Expression der bovinen Epithelzellen für IL-8 und TNF bei Behandlungen mit verschiedenen MOI* ..... *81*
*4.2.5: mRNA-Expression der bovinen Epithelzellen für verschiedene Zytokine, Chemokine und Akut-Phase Proteine über verschiedene Zeiträume* ..... *84*
4.2.5.1: Behandlung über 30, 60 und 90 Minuten ..... 84
4.2.5.2: Behandlung über 1, 6 und 24 Stunden ..... 87
4.2.5.3: Behandlung über 3, 6 und 12 Stunden ..... 89
4.2.5.4 Behandlung der bovinen Epithelzellen mit koagulase negativen Staphylokokken ..... 90
4.3 EUTEREPITHELZELLEN AUS ZIEGENMILCH ..... 93
*4.3.1 Morphologie und Wachstumsverhalten* ..... *93*
*4.3.2 qRT-PCR für CD45* ..... *93*
*4.3.3 Toll like Rezeptoren 2 und 4* ..... *95*
*4.3.4 Behandlung der caprinen Euterepithelzellen mit hitzeinaktivierten S.aureus und LPS* ..... *96*

**5. DISKUSSION ..... 98**

5.1. BOVINE EUTEREPITHELZELLEN ..... 98
5.2. CAPRINE EUTEREPITHELZELLEN ..... 109

5.3 SCHLUSSFOLGERUNG ..... 113

**6. ZUSAMMENFASSUNG ..... 116**

**7. SUMMARY ..... 118**

**8. LITERATURANGABEN ..... 121**

**9. DANKSAGUNG ..... 139**

**10. LEBENSLAUF ..... 141**

**11. PUBLIKATIONEN: ..... 142**

**Abkürzungsverzeichnis:**

| | |
|---|---|
| 18S rRNA | RNA der 18S Ribosomen Untereinheit (18S) |
| 28S rRNA | RNA der 28S Ribosomen Untereinheit (28S) |
| APP | Akut-Phase Protein |
| ATCC | American Type Culture Collection |
| bp | Basenpaare |
| ℃ | Grad Celcius |
| ca. | zirka |
| CD | clusters of differentiation |
| cDNA | complementary DNA (Komplementärstrang DNA) |
| cfu | Koloniebildende Einheiten (colony forming unit) |
| $CHCl_3$ | Chloroform |
| CP | Crossing Point |
| DAB | 3,3 Diaminobenzidinehydrochlorid |
| DEPC | Diethylpyrocarbonat |
| DMEM/F12 | Dulbecco´s Modified Eagles Medium/ HAM F12 |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DNAse | Desoxyribonuklease |
| dNTP | Desoxiribonukleosid-Triphosphat |
| DVG | Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft |
| E.coli | Escherichia coli |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| ELISA | Enzym-gekoppelter Immuntest (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) |
| FKS | fetales Kälberserum |
| FP | French Press |
| GAPDH | Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase |
| G/C-Gehalt | Gehalt an Guanin- und Cytosin-Basen |
| GM-CSF | Granulozyten-Makrophagen-Koloniestimulierender Faktor |
| h | Stunde |
| HBSS | Hank´s Balanced salt solution |

| | |
|---|---|
| $HCO_{3-}$ | Bicarbonat |
| HI | hitzeinaktiviert |
| HKG | Housekeeping Gene |
| $H_2O$ | Wasser |
| $H_2O_2$ | Wasserstoffperoxid |
| IE | internationale Einheiten |
| IL | Interleukin |
| KNS | koagulase negative Staphylokokken |
| LB-Medium | Luria-Bertani Medium |
| LBP | Lipopolysaccharid-bindendes Protein |
| LPS | Lipopolysaccharid |
| LTA | Lipoteichonsäure |
| MOI | Bakterien pro Zelle (multiplicity of infection) |
| mRNA | messenger RNA (Boten-RNA) |
| MZ | aus Milch gewonnene Euterepithelzellen |
| OD | optische Dichte |
| PAMP | pathogen-associated molecular patterns |
| PBS | Phosphat-Kochsalz-Puffer (phosphat-buffered-saline) |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion |
| pET | aus Gewebe gewonnene Euterepithelzellen |
| PGN | Peptidoglykan |
| RIN | RNA Integrity Number |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RNase | Ribonuklease |
| rRNA | ribosomale RNA |
| rpm | rounds per minute (Umdrehungen pro Minute) |
| RT | Reverse Transkription |
| s | Sekunde |
| SAA | Serum Amyloid A |
| S.aureus | Staphylococcus aureus |
| Str. | Streptococcus |
| TLR | Toll like Rezeptoren |
| TNF | Tumor Nekrose Faktor alpha |

| | |
|---|---|
| TSB | Trypticase Soja Bouillon |

## 1. Einleitung und Aufgabenstellung:

Mastitis ist eine der verlustreichsten Erkrankungen in der Milchwirtschaft, deren Schaden auf eine halbe bis eine Milliarde Euro p.a. geschätzt wird. Ein Großteil dieser Verluste wird den subklinischen und chronischen Mastitiden zugeschrieben, die oft unbemerkt bleiben, aber eine erhöhte Zellzahl und eine verminderte Milchmenge verursachen. Zu den am häufigsten isolierten Erregern solcher Mastitiden gehören *Staphylococcus aureus* und *koagulase negative Staphylokokken*. Die Heilungsrate von *S.aureus*-Mastitiden durch Antibiotikabehandlung beträgt meistens weniger als 30 %, wobei der Anteil der Antibiotikaresistenzen dieses Erregers in den letzten Jahren steigend ist. Neben den Problemen von Rückständen in der Milch nach Antibiotikabehandlungen, stellen nicht abgeheilte Infektionen ein hohes Risiko für weitere Kühe im Bestand dar, da diese Erreger kontagiöse Verbreitungen aufweisen. Aufgrund der schlechten Therapieerfolge einer Staphylokokken-Mastitis, und Misserfolge in der Herstellung von Impfstoffen, wird eine Erhöhung der angeborenen Resistenz gegenüber diesen Keimen angestrebt.

Im Gegensatz zu den Staphylokokken ruft *Escherichia coli* einen meist akuten Verlauf einer Mastitis bei Kühen hervor, der nicht selten zum Tod des Tieres führt. Ausserdem spielt *Streptococcus uberis* eine bedeutende Rolle. Dieser Erreger ist bekannt dafür sowohl chronische, als auch akute Mastitiden hervorzurufen.

Da auch das Interesse an Ziegenmilch und deren Produkten stetig steigt, haben auch diese Zuchtbetriebe immer mehr mit dem Problem der Mastitissanierung zu kämpfen. Im Gegensatz zu den Kühen löst *S.aureus* bei der Ziege häufig sehr akut verlaufende Euterentzündungen aus.

In der akuten Phase einer Infektion steht die unspezifische Immunantwort im Vordergrund, und die Milchdrüse bildet verschiedene Immunkomponenten. Dadurch werden Leukozyten angelockt und aus dem Blut rekrutiert. Den Leukozyten wird die Hauptfunktion bei der Bekämpfung von eindringenden Mikroorganismen zugeschrieben. In letzter Zeit wurden aber vermehrt Hinweise darauf gefunden, dass auch das milchbildende Epithel eine wesentliche Rolle spielt. Während einer Immunantwort bildet es Laktoferrin, Zytokine und Akut-Phase Proteine. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die

Unterschiede in der Immunantwort der Euterepitelzellen auf die verschiedenen Erreger anhand einer primären Epithelzellkultur gemessen, um die Ursachen für die ungenügende Abwehr, und die daraus resultierenden chronischen Infektionen von *S.aureus*, den *koagulase negativen Staphylokokken* und *Str.uberis* und den teilweise entgegengesetzten Wirkungen bei der Ziege zu finden. Zellkulturen haben den Vorteil, dass dabei alle Zellen dem gleichen definierten Infektionsdruck ausgesetzt sind, was *in vivo* nicht gegeben ist, da eine Infektion in der Milchdrüse in dieser nicht gleichmäßig verteilt ist. Außerdem handelt es sich bei primären Zellkulturen um im Wesentlichen unveränderte Euterzellen. Durch die Verwendung von Zellen mehrerer Kühe und Ziegen war die biologische Wiederholbarkeit gegeben und individuelle Einflüsse konnten korrigiert werden.

Für die Versuche wurden primäre Euterepithelzellen aus dem Gewebe und der Milch von zwölf verschiedenen Kühen und vier verschiedenen Ziegen genommen und gleichzeitig, aber getrennt voneinander kultiviert und mit den unterschiedlichen inaktivierten Erregern behandelt. Die Immunantwort der Euterepithelzellen wurde anhand der mRNA-Expression verschiedener Zytokine, Chemokine und Akut-Phase Proteine mittels quantitativer RT-PCR gemessen.

# 2. Literaturübersicht:

## 2.1 Störungen der Eutergesundheit

### 2.1.1 Verschiedene Formen und ihre Bedeutung

Die Gesundheitsstörungen des Euters umfassen Entzündungen von Drüsenparenchym (Mastitis), Gangsystem (Galaktophoritis) und Zitze (Thelitis) sowie Verletzungen der Zitzen und des Drüsenkörpers, Funktionsstörungen, Missbildungen, Affektionen der Euterhaut (selbstständig oder als Symptome von Grundkrankheiten), pathologische Euterödeme und Erkrankungen des Lymphsystems des Euters. Oft handelt es sich aber auch um eine pathologische Verknüpfung mehrerer Krankheitsbilder. Die Mastitis ist zweifelsfrei in jeder Hinsicht (Verbreitung, wirtschaftliche Bedeutung, Behandlungsaufwand) die bedeutsamste Eutergesundheitsstörung (Schulz 1994)

## 2.2 Mastitis

### 2.2.1 Definition und Einteilungen

Als Mastitis wird die Entzündung der Milchdrüse in der Gesamtheit ihrer milchbildenden, speichernden und ableitenden Abschnitte bezeichnet. Es sind sowohl akute als auch chronische Abläufe, sowie klinische und subklinische Verläufe möglich. Eine weitere Einteilung kann anhand ihrer Ätiologie und Morphologie erfolgen. Abzugrenzen sind Reizzustände, latente Infektionen der Milchdrüse und Besiedlungen des Zitzenkanals durch Mastitiserreger (Schulz 1994). Es handelt sich bei einer Mastitis um eine infektiöse Faktorenkrankheit (Seffner & Bergmann 1994). Als entzündliche Reaktion der Milchdrüse definiert die IDF (1987) eine Mastitis. Eine scharfe Trennung zwischen einem gesunden und einem kranken Euter ist wie bei jedem anderen Organ nicht möglich (Hamann & Fehlings 2003). Um eine Orientierung dennoch möglich zu machen, hat die Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft (DVG) auf Grundlage der Erkenntisse von Hess und Egger (1969) sowie Reichmuth (1975) vier Kategorien der

Eutergesundheit definiert, wobei für die Beurteilung zytologisch-mikrobiologischer Befunde von Viertelanfangsgemelkproben festgelegt wurden (Tabelle 1, DVG 1994).

Tab. 1: Beurteilung zytologisch-mikrobiologischer Befunde im Rahmen der Mastitis-Kategorisierung

| Zellgehalt pro ml Milch | Euterpathogene Mikroorganismen | |
|---|---|---|
| | Nicht nachgewiesen | nachgewiesen |
| < 100.000 | Normale Sekretion | Latente Infektion |
| > 100.000 | Unspezifische Mastitis | Mastitis |

Die Festlegung des Zellzahlgrenzwertes beruht auf Untersuchungen, in denen der Zellgehalt aus Viertelanfangsgemelken ungeschädigter Euter von Erstkalbinnen untersucht wurde (Doggweiler & Hess 1983; Hess & Egger 1969; Reichmuth 1975). Der Modalwert (Maximum der Häufigkeitsverteilung) betrug 20.000 Zellen/ml; die zweifache Standardabweichung, die in der Medizin übliche Sicherheitsgrenze der Norm, umfasste als obersten Wert 100.000 Zellen/ml.

### 2.2.2 Bedeutung der Mastitis und wirtschaftliche Hintergründe

Mastitiden machen weltweit 20 bis 30% der vorzeitigen krankheitsbedingten Kuhabgänge aus (Schulz 1994). 15,5% der Merzungen wurden 1996 bei deutschen milchleistungsgeprüften (MLP-) Kühen wegen Eutererkrankungen vorgenommen (Arbeitsgemeinschaft deutscher Rinderzüchter e.V., ADR, 1996). Schulz (1994) beschreibt die Prävalenz klinischer Mastitiden auch in gut geführten Milchkuhherden mit ständig 1 bis 2%. Prozentual sind 10 bis 15% der Euterviertel subklinisch infiziert. Kleinschrot *et al.* (1994) gehen davon aus, dass jede zweite Kuh in einer Laktation mindestens einmal eine klinische oder subklinische Mastitis durchmacht. Die subklinische Mastitis

kommt dabei 20- bis 50mal häufiger vor als die klinische Form. Als Folge und erhebliche wirtschaftliche Konsequenz gilt vor allem der Milchverlust bei akut verlaufenden Mastitiden (nicht verkehrsfähige Milch, Milchleistungs-rückgang), sowie die Milchminderleistung bei chronischen und subklinischen Mastitiden . Weitere Verluste entstehen durch die Merzung von infizierten Färsen und Kühen, die mastitisbedingte Minderung der Rohmilchqualität, die Behandlungs- und Sanierungskosten und die Gefahr der Übertragung der Erreger auf Kälber und andere Kühe (Schulz 1994). Durch die vorzeitige Merzung wird eine Erhöhung der Kosten für die Bestandsremontierung verursacht sowie die Ausschöpfung des wirtschaftlichen Potentials von fünf Laktationen deutlich unterschritten (∅ der Nutzungsdauer: drei Laktationen). Hinzu kommt in einigen Fällen der Verlust wichtiger genetischer Informationen, z.B. durch die Schlachtung von Bullenmüttern. Damit wird dem Zuchtfortschritt in der Herde entgegengewirkt (DVG, 1994). Ein exakter finanzieller Nachweis dieser Schadwirkungen von Eutererkrankungen auf betriebswirtschaftlicher Ebene ist offensichtlich sehr kompliziert, da fast unüberschaubare Variablen berücksichtigt werden müssen (Schulz 1994). Allein die subklinischen Mastitiden, die immerhin 95% aller Euterentzündungen ausmachen (Kleinschroth *et al*., 1994), verursachen jährlich Kosten in Höhe von einer halben bis einer Milliarde Euro (Sordillo & Streicher 2002).

### 2.2.3 Ätiologie und Pathogenese

Als Ursache von Mastitiden dienen verschiedene mikrobielle Krankheiterreger. Überwiegend gehören Bakterien dazu, aber auch Pilze (ihre einzelligen Vertreter, die Hefen) und Algen (*Prototheken*) verursachen gelegentlich Mastitiden. Der Nachweis von Viren als Mastitiserreger ist schwer zu führen. Eine Einteilung der verschiedenen Erreger kann nach der Hauptquelle, aus der sie kommen, erfolgen. Dabei ergibt sich die Einteilung in euterassoziierte Erreger, die sich nicht außerhalb des Euters vermehren können, und solche, die außerhalb des Euters siedeln. Zu den erst genannten gehören zum Beispiel *Streptococcus agalactiae* und

euterpathogene *Mycoplasmen.* Zu der zweiten Gruppe gehören Erreger wie *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, *Arcanobacterium pyogenes*, aber auch *Hefen* und *Prototheken*. Man bezeichnet sie auch als Umweltkeime. Die Vermehrung und Ansiedlung dieser Keime findet im Magen- und Darmtrakt, den Genitalorganen oder nach außen offenen, infektiösen Wunden statt. Als Überträger der Keime dienen Stalleinrichtungen oder das Einstreu. Aber die Erreger lassen sich auch nach ihrer Pathogenität einteilen. Dabei werden sie in sogenannte „major pathogenes" zu denen unter anderem alle oben genannten Pathogene gehören, sowie „minor pathogenes" zu denen unter anderem *koagulase nagative Staphylokokken* und *Corynebacterium bovis* gehören (Schulz 1994). Eine dritte Einteilungsmöglichkeit schlägt die DVG (1994) vor. Sie unterteilt nach Reservoiren. Dabei wird einmal die infizierte Milchdrüse als Infektionsherd genannt, über den die Keime, z.B. *S.aureus*, *Str.agalactiae* oder *Str.dysgalactiae*, übertragen werden. Dies erfolgt in erster Linie in der Melkzeit über Melkmaschinen oder den Melker. Das zweite Reservoir ist wieder die Umwelt. Haupterreger sind dabei *E.coli*, *Str.uberis* oder *Klebsiellen*. Das Infektionsrisiko liegt hier vor allem in der Zwischenmelkzeit. Die Übertragung wird überwiegend durch die hygienischen Rahmenbedingungen bestimmt. Schulz (1994) berichtet, dass nach einer Untersuchung (Schällibaum 1991) bei Mastitiden besonders häufig *Staphylokokken* und *Streptokokken* in der Milch nachgewiesen werden (etwa 30% *Streptokokken* und 40-60% *Staphylokokken*). Heute werden 65% der klinischen Fälle durch Umwelterreger hervorgerufen (Radostits *et al.* 2000). Die Pathogenität und Virulenz der Erreger, prädisponierende Faktoren und das Wirken der körpereigenen Abwehrmechanismen, der Funktionszustand des Milchdrüsengewebes, die Ausprägung der Blut-Euter-Schranke und der Behandlungserfolg spielen in komplexer Weise zusammen und bestimmen die Ausprägung klinischer Symptome und den Euterentzündungsverlauf (Seffner & Schulz, 1994). Pathogenität und Virulenz der Krankheitserreger variiert erheblich je nach Spezies, Typ und Standortvariante der fast 200 Bakterienarten und der Vertreter von Pilzen und Algen, die bereits als Mastitiserreger beschrieben worden sind. Die Menge an Erregern die eine

Infektion auslöst (Infektionsdruck) ist zwischen ihnen unterschiedlich (Wendt et al., 1994).
Eine Kategorisierung der verschiedenen Stadien der Eutergesundheit wurden von der DVG (1994) wie folgt vorgeschlagen:

**-** Normale Sekretion
Gesunde Euterviertel zeigen keine äußerlichen pathologischen Veränderungen und ihre Milch weist keine euterpathogenen Mikroorganismen, sowie einen normalen Zellgehalt auf.

- Latente Infektion
Eine latente Infektion liegt vor, wenn sich die Zellzahl in der Norm bewegt, jedoch Mastitiserreger nachgewiesen werden.

- Unspezifische Mastitis
Werden keine Mastitiserreger nachgewiesen, aber eine erhöhte Zellzahl, so spricht man von einer unspezifischen Mastitis.

- Mastitis
Werden gleichzeitig Mastitiserreger und erhöhte Zellzahlen in Viertelanfangsgemelken festgestellt, handelt es sich um eine Mastitis.

Besondere Beachtung sollte auch dem Weg der Erreger in das Euter geschenkt werden. Dies kann galaktogen, hämatogen und lymphogen erfolgen. Den galaktogenen Weg können fast alle Mastitiserreger nehmen. Nachdem der Entzündungsprozess zunächst die zisternennahe Euterregion erfasst, dehnt er sich nach und nach Richtung Euterbasis aus (Wendt *et al.* 1994). Auf hämatogenem Weg gelangen unter anderem humane und bovine Mykobakterien, Brucellen und Listerien ins Euter. Der primäre Ort der Auseinandersetzung ist dabei das interalveoläre und interlobuläre Bindegewebe des Euters in der Nähe von Blutgefäßen. Nach Wendt (1994) ist eine definierte Lokalisation der initialen Entzündungsherde nicht zu erwarten.

### 2.2.4 Escherichia coli Mastitis

*E.coli* ist ein gram-negatives Stäbchen, dass keine Sporen bildet. Es gehört zu der Familie der *Enterobacteriaceae*. Dieser Erreger ist dafür bekannt hochgradige, klinische Mastitiden hervorzurufen, die von einer massenhaften Rekrutierung neutrophiler Granulozyten begleitet werden. Diese tragen wiederum zur Vernichtung der Bakterien bei (Riollet *et al.* 2000). Schätzungsweise 40% der jährlich auftretenden bovinen Euterentzündungen werden von gram-negativen Bakterien hervorgerufen (Erskine *et al.* 1991; Ziv 1992). Klinisch kommt es zu einer *Mastitis acuta gravis* die durch eine starke Schwellung des Euterparenchyms und ein erheblich gestörtes Allgemeinbefinden mit hochgradigem Fieber gekennzeichnet ist. Das Sekret ist wässrig-blutig, eitrig-blutig oder sogar jauchig. Fibrinbeimengungen sind die Regel. Das Bindegewebe ist ödematös und es kommt zu diffusen oder herdförmigen Rötungen und Nekrosen. Durch die häufig vorkommenden Thromben in den Blut- und Lymphgefäßen können einzelne Bezirke des Euters absterben und Sequesterbildungen kommen vor. *Eine akute hämorrhagisch-nekrotisierende Mastitis* verläuft anfangs ähnlich, doch schon nach wenigen Tagen kann diese zum Tod des Tieres oder zur Abstoßung einzelner Euterviertel führen (Dahme & Weiss 1999). Die Zellwand gram-negativer Bakterien besteht typischerweise aus drei Schichten: der Zytoplasmaschicht, der Außenmembran und eine Peptidoglycanschicht, welche die beiden anderen Schichten voneinander trennt (Abbildung 1). Die äußere Zellmembran enthält Phospholipide, Membranproteine und Lipopolysaccharid (LPS). LPS besteht aus Lipid A, dem Lipopolysaccharid Kern und sich wiederholenden Polysaccharid-Einheiten, sogenannten O-Antigenen (Cullor & Tyler 2001). Lipid A ist der lipophile innere Teil des LPS. Von ihm geht der toxische Effekt des LPS aus und es wird auch als Endotoxin bezeichnet (Tyler *et al.* 1992). LPS wird während der bakteriellen Vermehrung und dem bakteriellen Tod freigesetzt. Die Milchdrüse reagiert sehr empfindlich auf LPS und eine Mastitis kann schon durch geringe Dosen LPS induziert werden (Harmon 1994; Jackson *et al.* 1990; Shuster *et al.* 1991). An der äußeren Oberfläche der Bakterien ragen zudem Fimbrien aus der Zellwand. Die Oberfläche ist mit einer dicken Polysaccharidschicht, wie

mit einer Kapsel, bedeckt. Ausgehend von den verschiedenen Antigenstrukturen O-Antigene, K-Antigene (Kapsel) und H-Antigene („mit **H**auch wachsend“, Geißelantigene) können *die E.coli* Stämme in O:H:K Serotypen eingeteilt werden (Cullor & Tyler 2001). *E.coli* gehört zur normalen und gesunden Darmflora des Menschen und der Tiere. Es ist der bekannteste fakultative Anaerobier im Verdauungstrakt und wird konstant über die Fäzes an die Umwelt abgegeben. Pathogene *E.coli* Bakterien können intestinale und extraintestinale Infektionen im Säugetier- und Vogelwirt hervorrufen (Cullor & Tyler 2001). Infektionen des Gastrointestinaltrakts können zu den verschiedensten Durchfallerkrankungen führen, die, im Falle des vom Bakterium gebildeten Shiga-Toxins, zum systemischen, hämolytisch-urämischen Syndrom beim Menschen und zur Ödemkrankheit beim Schwein führen können (Cullor & Tyler 2001). *E.coli* ist der Hauptverursacher von Erkrankungen der harnableitenden Wege beim Menschen. Außerdem ist *E.coli* an invasiven Erkrankungen wie einer Bakteriämie oder Meningitis bei Mensch und Tier beteiligt. Bei Vögeln ist *E.coli* ein wichtiger Grund für Atemwegs- und Eileitererkrankungen (Cullor & Tyler 2001).

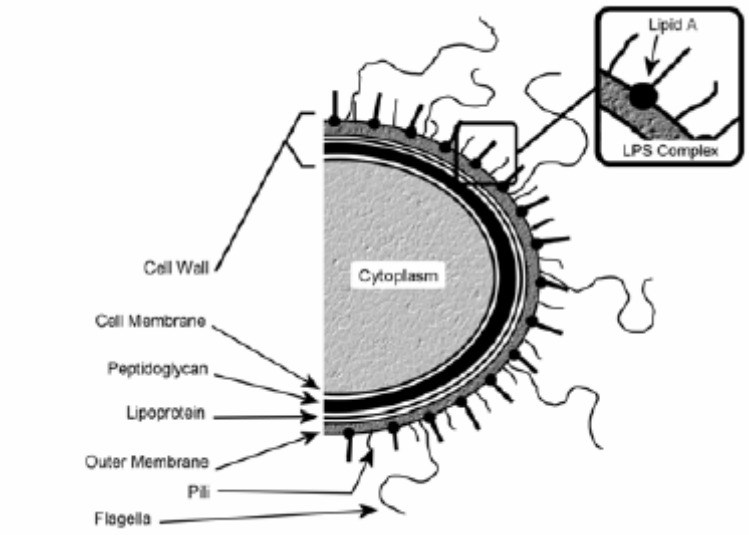


**Abb.1: schematische Darstellung der Bestandteile gram-negativer Bakterien (verändert von Cullor, 1996)**

### 2.2.4.1 Lipopolysaccharid

Das Lipopolysaccharid ist der Hauptpathogenitätsfaktor gram-negativer Bakterien. Es weist bei verschiedenen Bakterienspezies das gleiche Aufbauprinzip auf. Das klassische LPS besteht aus einem O-Antigen, einem Kernpolysaccharid und dem Lipid A (Cullor & Tyler 2001). Bei dem außen liegenden O-Antigen handelt es sich um ein Polymer aus sich wiederholenden Oligosacchariden. Sein antigener Charakter unterscheidet sich zwischen den Bakterienspezies. Fehlt das O-Antigen, so wird diese Art von LPS „rough-LPS“ (R-LPS) genannt. Ist es vorhanden spricht man von „smooth-LPS“ (S-LPS). Das Kernpolysaccharid liegt proximal des O-Antigens und wird in einen inneren und einen äußeren Kern unterteilt. Das Kernpolysaccharid ist, im Gegensatz zum O-Antigen, bei vielen gram-negativen Bakterien gleichartig aufgebaut. Im inneren Kern des Kernpolysaccharids befindet sich immer Keto-desoxy-oktonat (KDO). Fehlt dieses, sterben die Bakterien (Raetz 1990).

Das Lipid A ist der kovalent gebundene Lipidanteil des LPS, dient als sein Membrananker und ist ein amphiphiles Molekül. Die hydrophile Kopfgruppe besteht aus zwei b1-6-glykosidisch verknüpften N-Acetylglukosamin (GlcNAc)-Molekülen, die zusätzlich mindestens zwei Phosphatreste und oft auch noch weitere polare Gruppen enthalten. Der hydrophobe Teil des Lipid A besteht aus vier Hydroxyfettsäureketten. Einige Hydroxyfettsäuren werden manchmal auch mit weiteren, nicht hydroxilierten Fettsäuren substituiert (Raetz 1990). Das Lipid A, das Endotoxin von dem die meisten pathophysiologieschen Wirkungen ausgehen, dient vor allem der Interaktion zwischen LPS und dem Lipopolysaccharid-bindenden-Protein (LBP) und der Interaktion mit Lipoproteinen sowie der Aktivierung des Komplementsystems (Cullor & Tyler 2001). Die Erkennung des an das LBP gebundenen LPS läuft CD14 abhängig über den Toll-like Rezeptor 4 der PMN und Epithelzellen der Milchdrüse (Strandberg *et al.* 2005; Takeuchi *et al.* 1999).

Die aktivierten Zellen produzieren Entzündungsmediatoren, wie Zytokine, Chemokine und Akut-Phase Proteine. Dies ruft die typischen Endotoxineffekte aus. Bezogen auf die Milchdrüse sind das die oben beschriebenen gravierenden Mastitis Symptome. Systemisch kommt es zu Akut-Phase Reaktionen, Blutdruckabfall und Schocksymptomen, die in eine

disseminierte intravasale Koagulopathie (DIC) mit hämorrhagischen Diathesen übergehen können.

#### 2.2.4.2 Toxine

Pathogene *E.coli* Stämme können verschiedene Toxine bilden, die verschiedene Aktivitäten haben: hitzelabile (**LT**) und hitzestabile (**ST**) Enterotoxine, Shigatoxine und Zytotoxische nekrotisiernde Faktoren 1 und 2 (**CNF1** und **CNF2**). Shigatoxine werden von enterohämorrhagischen *E.coli* Stämmen gebildet (Riley 1987). Enterotoxische Stämme produzieren normalerweise zwei Enterotoxine, LT und ST, die eine wichtige Rolle in der Pathogenese spielen. *E.coli*-Isolate, die CNF2 produzieren sind bei Rindern weit verbreitet (Pohl *et al.* 1993). Viele dieser Stämme produzieren auch F17b Fimbrien und Aerobaktin und sind resistent gegen die Abwehrmechanismen des Serums.

#### 2.2.4.3 Pathogenität von Mastitis-isolierten *E.coli*

*E.coli* ist ein opportunistischer Mastitiserreger (Barrow & Hill 1989; Nemeth *et al.* 1994; Valente *et al.* 1988). Bovine Mastitiden ähneln Harnwegsinfektionen; es sind beides aszendierende Erkrankungen die von Umweltkeimen hervorgerufen werden. Die Herkunft der Mastitis-auslösenden *E.coli* Stämme können in der Darmflora des betroffenen Rindes oder anderer Kühe und Kälber gefunden werden (Linton & Robinson 1984). Verschiedene *E.coli* Stämme konnten isoliert und nachgewiesen werden, und sicherlich wird eine *E.coli* Mastitis nicht durch eine begrenzte Anzahl von Stämmen hervorgerufen (Jung 1999; Linton *et al.* 1979; Linton & Robinson 1984; Lipman *et al.* 1995; Sanchez-Carlo *et al.* 1984; Valente *et al.* 1988). Allerdings wird auch von euteradaptierten *E.coli* Stämmen berichtet, die gleiche Serotypen (Hill & Shears 1979; Linton & Robinson 1984) und Genotypen bei wiederkehrenden Erkrankungen aufwiesen (Bradley & Green 2001; Lam *et al.* 1996; Lipman *et al.* 1995). Es hat sich aber gezeigt, dass Stämme von wiederkehrenden Mastitiden *in vitro* schneller und in größerer

Anzahl in die Epithelzellen eindringen, als die Stämme anderer, nur gelegentlich Mastitiden hervorrufenden *E.coli* (Dopfer *et al.* 2000).

### 2.2.5 Staphylokokken Mastitis:

*Staphylococcus* ist eine gram-positive Kokke, die in unregelmäßigen Haufen gelagert ist. Die kugelförmige Zelle hat einen Durchmesser von 0,5-1,5 µm. Traditionell wurden die als Krankheitserreger wichtigen Vertreter der *Staphylokokken* den Familien *Micrococcaceae* und *Streptococcaceae* zugeordnet. Nach neuen phylogenetischen Untersuchungen werden die gram-positiven Bakterien mit einem G/C-Gehalt über 50 mol% in die Klasse der *Actinobacteria* und die Vertreter mit weniger als 50 mol% G/C-Gehalt in eine eigene Gruppe (low G/C Gram positives) eingeordnet. *Streptokokken* und *Staphylokokken*, also auch *Staphylococcus aureus*, gehören zur Gruppe der gram-positiven Bakterien mit niedrigem G/C-Gehalten, während die Familie der *Micrococcaceae* in die Klasse der *Actinobacteria* eingeordnet werden (Selbitz 2002). *Staphylokokken* sind fakultative Anaerobier, gewöhnlich katalase-positiv, bilden keine Dauerformen und zählen trotzdem zu den widerstandfähigsten Keimen unter den nicht sporenbildenden Bakterien. Einer seiner größten Bedeutungen bekommt das Bakterium als Erreger von subklinischen Mastitiden beim Wiederkäuer, besonders beim Rind. Meist dauern diese Infektionen lange an und es kommt zu einer moderaten Einwanderung von neutrophilen Granulozyten (Gronlund *et al.* 2006). Allerdings löst das Bakterium mitunter auch gangränöse Formen der Mastitis aus (Gedek 1972). Eine weitere Einteilung kann systematisch hinsichtlich ihrer Fähigkeit das Enzym Koagulase zu bilden erfolgen (Rolle & Mayr 2002). Koagulase gilt als wichtigstes Pathogenitätsmerkmal von *S.aureus* (Seffner W & Bergmann A 1994). Penicillinresistenz kann über die Penicillinasebildung festgestellt werden (Gedek 1981).

#### 2.2.5.1 Staphylococcus aureus:

*S.aureus* ist ein Umweltkeim und kann auf der Haut von Mensch und Tier gefunden werden. Als das wichtigste Reservoir beim Tier ist allerdings die infizierte Milchdrüse der Wiederkäuer zu sehen. Seinen Namen verdankt *S.aureus* der häufig goldfarbenen Pigmentierung der Kolonien (Blobel & Brückler 1980). Dieser Keim konnte immer wieder als dominierender Keim aus subklinischen Mastitiden isoliert und bestimmt werden (Friton *et al.* 1998; Sobiraj *et al.* 1997; Traeder & Irion 1996). Doch auch andere Körperregionen können als Ansteckungsherd für mögliche *S.aureus* Infektionen dienen, wie beispielsweise Wunden an der Euter- und Zitzenhaut. Der Erreger kann aktiv den Zitzenkanal passieren und Kühe so galaktogen infizieren (Hoedemaker *et al.* 2001). Infektionen mit *S.aureus* sind ein schwerwiegendes und multifaktorielles Problem (Schukken *et al.* 1995) weil der Erreger eine Reihe Substanzen bildet, die in einem dynamischen Wechselspiel den Wirtsorganismus schädigen können (Blobel & Brückler 1980). Zu diesen Pathogenitätsfaktoren zählen u.a. Koagulase, Clumping-Faktor, Hämolysine, Leukozidin, Leukolysin, Staphylokinase und Hyaluronidase sowie die Zellwandbestandteile Lipoteichonsäure (LTA) und Peptidoglykane (PGN) als Virulenzfaktoren und immunstimulierende Substanzen (Morath *et al.* 2002; Wang *et al.* 2000).

*S.aureus* löst meist aber eine interstitielle, nichteitrige Mastitis aus. Klinisch zeigen sich die Tiere meist unauffällig. Oft kann eine solche Form der Mastitis nur histologisch erkannt werden. Es zeigen sich herdförmige Ansammlungen von Lymphozyten, Histiozyten, Plasma- und Mastzellen. Proliferative Veränderungen bleiben aus. Als disponierende Faktoren spielen Melkmaschine und Melktechnik die größte Rolle. Das größte Problem stellt der wirtschaftliche Schaden aufgrund des Milchverlustes dar. Die Zellzahl ist mit mehr als 250.000/ml erhöht (Dahme & Weiss 1999).

Der Erreger hat die Fähigkeit in neutrophile Granulozyten aber auch in die Epithelzellen des Euters einzudringen, sich dort zu vermehren und zu persistieren (Almeida *et al.* 1996b; Brouillette *et al.* 2004).

### 2.2.5.2 Lipoteichonsäure :

Lipoteichonsäure gilt als das Pendant zum LPS der gram-negativen Bakterien (Morath *et al.* 2002). Ungefähr 6% der Zellwand gram-positiver Bakterien bestehen aus LTA und ragen aus dem Mureinsacculus an die Oberfläche (Aasjord & Grov 1980). Teichonsäure hat im Gegensatz zum LTA keinen Lipidanker und stellt einen großen Teil der Zellwand dar, hat aber keine Zytokin stimulierende Wirkung (Majcherczyk *et al.* 2003). LTA ist in der zytoplasmatischen Membran verankert und besteht aus einem lipophilen Anker, der über ein Disaccharid mit dem Basisnetz verbunden ist. Das Basisnetz wiederum besteht aus Glyzerol-Phosphat oder Ribitol-Phosphat Einheiten, die sich bis zu 50-mal übereinander aufbauen. Der Rest des Netzes besteht aus verschiedenen Gruppen, wie beispielsweise im Fall von *S.aureus* aus N-Acetylglukosamin (GlcNAc), Hydroxy-Gruppen oder D-Alanin (Morath *et al.* 2001). Die physiologische Funktion des LTA ist bis heute nicht eindeutig geklärt. Es wird vermutet, dass es bei der Bindung von Metall Ionen und bei der Regulation der Aktivität von autolytischen Enzymen eine Rolle spielen könnte (Fischer 1988; Fischer 1994; Rose & Hogg 1995). Die Rolle von LTA im Immunsystem ist vielfältig, beispielsweise fördert es die Induktion bestimmter Transkriptionfaktoren und folglich die Produktion und Sekretion von Zytokinen und Chemokinen (Deininger *et al.* 2003; Hermann *et al.* 2002; von Aulock *et al.* 2004; Yang *et al.* 2001). Die Erkennung von LTA durch das Immunsystem geht hauptsächlich von Makrophagen aus, sowie von den Rezeptoren CD14 und teilweise LPS-bindendes Protein (LBP) (Hermann *et al.* 2002; Lehner *et al.* 2001; Schroder *et al.* 2003). Unterschiedliche Angaben gibt es über die Beteiligung der toll-like Rezeptoren (TLR) 2 und TLR4 bei der Antwort auf Lipoteichonsäure. Erste Berichte zeigten einen TLR4 abhängigen Erkennungsweg (Takeuchi *et al.* 1999; Uehara *et al.* 2002; Yang *et al.* 2001), doch mittlerweile haben verschiedene Arbeitsgruppen festgestellt, dass die Erkennung von LTA TLR2 abhängig ist (Lehner *et al.* 2001; Morath *et al.* 2002; Opitz *et al.* 2001). Ein hochreines LTA hat eine klare TLR2 Abhängigkeit gezeigt (Lehner *et al.* 2001). Außerdem zeigte auch synthetisch hergestelltes LTA das gleiche Ergebnis (Deininger *et al.* 2003). Weiterhin bildet TLR2 Heterodimere mit TLR1 oder TLR6 (Morr *et al.* 2002;

Takeuchi *et al.* 2001). Diese Erkenntnisse führten zu der Hypothese, dass eine Quervernetzung (cross-linking) verschiedener immunstimulierender Moleküle, welche die Situation in den Bakterien sehr genau darstellen, von größter Bedeutung ist. Bei der physiologischen Situation im gram-positiven Bakterium ragt das LTA durch den Mureinsacculus was zu der Vermutung führt, dass zwei LTA Moleküle, welche die Rezeptoren quervernetzten, nötig sind, um die volle Immunantwort zu bekommen. Dies führt im Falle einer Quervernetzung zwischen LTA mit einem LTA-Antikörper zu einer stärkeren Zytokinausschüttung (Mancuso *et al.* 1994). Trotzdem wird die Rolle des LTA als Hauptimmunstimulanz gram-positiver Bakterien immer noch kontrovers diskutiert und auch die Peptidoglykane (PGN), entweder alleine, oder in Kombination mit dem LTA immer wieder mit in die Diskussion gebracht die bekannten Effekte bei einer Infektion mit gram-positiven Erregern auszulösen (Thiemermann 2002).

### 2.2.5.3 Peptidoglykan und Muropeptide:

Die Zellwände von sowohl gram-positiven, als auch gram-negativen Bakterien enthalten PGN. Gram-negative besitzen nur eine schmale Schicht, wohingegen gram-positive Bakterien einen 40 bis 50 Schichten dicken Sacculus besitzen (Dmitriev *et al.* 2004; Vollmer & Holtje 2004). Das PGN besteht aus Zuckerketten, die durch Aminosäuren verbunden sind. Die Zuckerketten bestehen aus wechselnden Einheiten von N-Acetylmuraminsäure (MurNAc) und N-Acetylglukosamin (GlcNAc). Die quervernetzten Aminosäuren sind wechselnd L- und D-Isomere, die außerdem Zwischenpeptidbrücken ausbauen (Schleifer & Kandler 1972). Die Aminosäurefrequenz ist speziesabhängig und kann als lys-Typ-PGN und DAP-Typ-PGN auftreten. Lys-Typ-PGN enthält Lysine und DAP-Typ-PGN entsprechend Meso-Diaminopimelinsäure (DAP) (Schleifer & Kandler 1972). Mureinpeptide sind Abbauprodukte des PGN und enthalten MurNAc mit einer Aminosäure, meist L-Alanin. Sie werden durch lytische Enzyme freigesetzt, die entweder vom Wirt, oder vom Bakterium selbst produziert werden, und zwar während des bakteriellen Wachstums oder bei antibiotischer Therapie (Harz *et al.* 1990; Shockman & Höltje 1994). Durch die verschiedenen Aminosäuren im PGN unterschiedlicher Spezies sind eine Vielzahl verschiedener Muropeptide möglich, doch das bekannteste ist das Muramyl-Dipeptid (MDP), welches auch als Adjuvanz dient (Ellouz *et al.* 1974).

### 2.2.5.4 Koagulase-negative Staphylokokken :

Zu den koagulase-negativen Staphylokokken (KNS) wurde für lange Zeit nur der Erreger *Staphylococcus epidermidis* gezählt. Heute werden 10 Arten der *KNS* unterschieden (Rolle & Mayr 2002).

Sie wurden häufig sowohl bei Färsen, als auch bei laktierenden und nicht laktierenden Kühen isoliert (Oliver & Jayarao 1997). Die Milch aus Eutern, die mit *KNS* infiziert waren hatte eine höhere somatische Zellzahl (SCC) und die infizierten Viertel produzierten weniger Milch während der Laktation als gesunde. Neben der Bedeutung als Mastitiserreger ist bisher nur wenig in

Bezug auf potentielle Virulenzfaktoren und den Weg und Mechanismus der Infektion bekannt. Als mögliche Virulenzfaktoren werden Oberflächeneigenschaften des Erregers, wie Hydrophobizität und Kapsel- und Schleimbildungen gezählt (Saa & Kruze 1995). Auch eine zytotoxische Aktivität konnte den Erregern nachgewiesen werden (Zhang & Maddox 2000). Außerdem binden *KNS* Fibronektin und Kollagen (Mamo *et al.* 1988). Überdies hinaus heften sich verschiedene *KNS*, wie *S.epidermidis, S.xylosus und S.hyicus*), an die Epithelzellen der betroffenen Euter und dringen auch in diese ein (Almeida & Oliver 2001).

### 2.2.6 Streptokokken:

Streptokokken sind kugelförmige, in Kettenform wachsende Bakterien, die Erkrankungen bei Mensch und Tieren verursachen und als Saprophyten vorkommen (Rolle & Mayr 2002). Eingeteilt werden die Streptokokken nach Lancefield in 24 Gruppen, die auf dem unterschiedlichen Zellwandaufbau in Bezug auf die dem Mureinnetz aufgelagerten Polysaccharidantigenen beruhen. Als Virulenzfaktoren sind unter anderem Streptolysine, Desoxiribonuklease (DNAse), Hyaluronidase, Streptokinase, M-Protein, C5a-Peptidase und Proteinase bekannt (Selbitz 2002). Diagnostisch werden die Streptokokken aufgrund ihrer Hämolyseform unterschieden: alpha-, beta- und gammahämolysiernde und anhämolytische Streptokokken.

#### 2.2.6.1 Streptococcus uberis

*Streptococcus uberis (Str.uberis)* ist einer der klassischen Vertreter der umweltassoziierten, major-pathogenen Mastitiskeime. Er ist verantwortlich für 14-26% der klinischen Mastitiden bei laktierenden Kühen (Phuektes *et al.* 2001). Allerdings werden auch Milchdrüseninfektionen während des Trockenstehens beschrieben (Browning *et al.* 1990). Infektionen mit *Str.uberis* können sowohl klinisch als auch subklinisch verlaufen, was von mehreren Autoren beschrieben und bestätigt wird (Barkema *et al.* 1998;

Hogan *et al.* 1989; Williamson *et al.* 1995). Sowohl verkapselte als auch unverkapselte *Str.uberis* Stämme können sich an die intramamären Epithelzellen heften und in sie eindringen (Almeida *et al.* 1996a; Almeida *et al.* 2000)

### 2.2.7 Bedeutung und Verlauf einer Mastitis bei der Ziege

Ziegenzucht und der Konsum von Ziegenmilch hat schon seit jeher eine große Bedeutung als Nahrungsmittel für den Menschen in Deutschland (Rahmann 2001). Die Milch wird dabei entweder direkt als Rohmilch, oder zu Käse weiterverarbeitet, genutzt. Heute greifen häufig Menschen mit einer Allergie gegen Kuhmilch auf Ziegenmilchprodukte zurück. Gerade deshalb steht auch bei der Ziege die Eutergesundheit an erster Stelle. Außerdem entsteht, wie bei der Kuhmilchproduktion auch, erheblicher wirtschaftlicher Verlust durch eine Verminderung der Milchleistung, Produktionsausfälle bei der Milchverarbeitung sowie durch frühzeitige Abgänge infolge irreparabler Euterveränderungen (Winter 2002).

*S.aureus* ist einer der wichtigsten Erreger von Euterentzündungen aller Art bei der Ziege. Die Prävalenz liegt zwischen 6-17% (Deinhofer & Pernthaner 1995; Lerondelle & Poutrel 1984; White & Hinckley 1999). Manche konnten sogar bis zu 37% *S.aureus* in subklinischen Mastitiden beim kleinen Wiederkäuer nachweisen (Silva *et al.* 2004). *Koagulase negative Staphylokokken* konnten sogar bei 80 % der subklinischen Mastitiden nachgewiesen werden (Winter 2004).

Im Gegensatz zur Kuh, bei der *S.aureus* eher für eine Mastitis mit subklinischen und chronischen Verlauf steht, löst dieser Erreger bei der Ziege hauptsächlich eine nekrotisierende Mastitis aus, während für subklinische Mastitiden hauptsächlich *S.epidermidis* und *koagulase negative Staphylokokken* verantwortlich zu sein scheinen (White & Hinckley 1999; Winter 2004). Auch bei der Ziege erfolgt der Hauptinfektionsweg über den Zitzenkanal, seltener lymphohämatogen über die Euterhaut, nach Verletzungen. Klinisch zeigt sich die katarrhalische oder schwer nekrotisierende Mastitisform indem die Tiere ein schwer gestörtes Allgemeinbefinden zeigen. Das Euter ist geschwollen und es tritt ein stark verändertes, faulig-riechendes Sekret aus. Nicht selten verenden die Tiere infolge einer Septikämie schon nach 24 h. Die primär katarrhalische Form kann innerhalb einer Woche in eine chronisch-abzedierende Form übergehen (Travnicek & Federic 1994). Überlebende Tiere kapseln den nekrotischen Bereich ab mit der Folge einer Sequesterbildung oder auch der

Abstoßung ganzer Euterviertel (Dahme & Weiss 1999). Die Prognose für die funktionelle Wiederherstellung der Milchdrüse ist äußerst ungünstig und nur eine frühzeitige Antibiotikatherapie intrazisternal und parenteral könnte bei der Erhaltung der Drüsenfunktion des Euters helfen (Travnicek & Federic 1994).

## 2.3. Die Antwort des Wirts auf Mastitiserreger

Die Antwort des Wirtes auf die verschiedenen Mastitiserreger ist ein komplizierter Prozess, bei dem sowohl das spezifische, als auch das unspezifische Immunsystem zusammen reagieren, das Pathogen angreifen, und zu zerstören versuchen. Außerdem wird ein durch dieses Pathogen, aber auch durch das Immunsystem selbst verursachter Schaden versucht zu reparieren (Burvenich *et al.* 2003; van Miert 1995).

Das Euter ist über die Blut- und Lymphgefäße mit dem Abwehrsystem des Gesamtorganismus verbunden, wobei es sich dabei meist um unspezifische Abwehrvorgänge handelt. Des weiteren verfügt das Euter, im Vergleich zu anderen Organsystemen, über zusätzlich gute, lokale Abwehrmechanismen. Dazu gehören die Zitzenbarriere, die Barrierefunktion des Epithels der Milchzisterne, der Milchgänge und der Alveolen, sowie die Abwehrfaktoren im Bindegewebe der Wand der Milchgänge, der Milchzisterne und des Euterparenchyms, und die zellulären und humoralen Abwehrfaktoren der Milch.

Nur diese systemischen und lokalen Abwehrvorgänge zusammen verhindern das Eindringen und die Vermehrung von Infektionserregern und deren Toxinen, und anderen Partikeln, die eine Gefahr für die Gesundheit des Euters darstellen. Sobald der Erreger oder das Toxin in das die milchleitenden Wege auskleidende Epithel eingedrungen ist, werden diese und die Abwehrzellen im Bindegewebe aktiviert. Ihre Funktion steht über den vermehrten Durchtritt von Zellen in die Milch mit der Funktion der Milchzellen in Verbindung.

Andrerseits steht das Euter über die Lymph- und Blutgefäße mit dem Abwehrsystem des Körpers in Verbindung, über das die humoralen

Abwehrreaktionen, wie beispielsweise Immunglobuline und zelluläre Abwehrmechanismen, wie Neutrophile Granulozyten (Mikrophagen), Monozyten (Makrophagen), B- und T-Lymphozyten wirksam werden können (Wendt *et al.* 1994).

### 2.3.1 Das spezifische Immunsystem

Die spezifische Immunabwehr im Euter beruht auf der Funktion der Lymphozyten. Aber sie sind nur in geringer Anzahl in der Milch zu finden (Holmberg & Concha 1985). Ihre Funktion in der Milch scheint hauptsächlich der zellulären Zytotoxität zu dienen (Wendt *et al.* 1994). Die Immunreaktion durch B-Lymphozyten scheint in der Milch eine untergeordnete Rolle zu spielen (Howard *et al.* 1980; Wendt *et al.* 1994). Auch die IgA-Konzentration ist in der Milch von Wiederkäuern relatv niedrig (Jungi 2000). Lymphozyten können Makrophagen aktivieren, so wie Makrophagen aktivierend auf Lymphozyten wirken können (Keller 2000; Kirchner *et al.* 1994).

### 2.3.2 Das unspezifische Immunsystem

Als erstes gelangen die bedeutendsten Zellen der unspezifischen Immunabwehr, die Phagozyten, an den Ort der Infektion und unterstützen die Immunzellen, die schon vor Ort sind. Zu den Phagozyten gehören Blutzellen, wie Gewebemakrophagen, Granulozyten und Monozyten. Ihre Aufgabe ist die Phagozytose, d.h. die Aufnahme und das durch den Abbau Unschädlichmachen körperfremden Materials. Monozyten und Makrophagen sind zudem hochaktive sekretorische Zellen, die eine Vielzahl löslicher Faktoren produzieren, die ihrerseits wiederum zur Immigration und Aktivierung anderer Immunzellen führt (Kirchner *et al.* 1994; Wendt *et al.* 1994). Außerdem tragen Makrophagen zur Abwehrfunktion bei, indem sie Fettkügelchen, abgestorbene neutrophile Granulozyten, Detritus und Bakterien aufnehmen und „verdauen“ (Wendt *et al.* 1994).

Die Zellzahl in der Milch ist im gesunden Euter niedrig. Bei sehr geringer Zellzahl befinden sich hauptsächlich Lymphozyten in der Milch.

Abwehrvorgänge im Euter werden in erster Linie von den polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) bestimmt. Während akuter und subakuter Entzündungsprozesse im Euter findet eine sehr starke Rekrutierung von Neutrophilen aus dem Blut in die Milch statt, was die Zellzahl der Milch stark ansteigen lässt. Der Anteil der PGN im Bezug auf die Gesamtzellzahl steigt dabei auf über 90% an (Wendt *et al.* 1994). Ein erwachsenes Rind besitzt in der Regel 2 x $10^{11}$ reife neutrophile Granulozyten, davon ungefähr 1 x $10^{11}$ in der Peripherie und ungefähr 68 x $10^{9}$ in marginalen Pools wie die der Blutgefäßwände. Über die Reserve im Knochenmark ist wenig bekannt, sie wird aber auf ca. 12% geschätzt (Burvenich *et al.* 1994).

Verschiedene Rezeptoren befinden sich an der PMN-Oberfläche, von denen einige Chemoattraktantien erkennen, die es ihnen erlauben zum Entzündungsherd zu wandern. Adhesionsrezeptoren bereiten den Weg durch das Endothelium zur Seite der Entzündung hin. Andere Rezeptoren binden Immunglobuline und Komplemente die es den PMN erlauben, Phagozytose und ihre bakterizide Wirkung einzuleiten. Wieder andere Rezeptoren binden die Bakterientoxine und Zytokine um die Protein-Tyrosin-Phosphorylation anzukurbeln, bei der für die Immunabwehr wichtige Zelloberflächen-rezeptoren synthetisiert und exprimiert werden (Paape *et al.* 2003). Während einer Mastitis wird Laktoferrin von großer und sekundärer Granula bei der Wanderung in die Milchdrüse als Folge der PMN Degranulation freigesetzt. Inflammatorische Mediatoren, wie der platelet-activating factor (PAF) und Interleukin (IL) –8 setzen ebenfalls Laktoferrin aus den PMN frei (Swain *et al.* 2000; Prgomet *et al.* 2005). Diese Freisetzung von Laktoferrin auf der Infektionsseite ist wichtig, weil Laktoferrin eine hohe Affinität zu Eisen hat und es unverfügbar für gram-negativen Bakterien, die es zum Wachsen brauchen macht. Außerdem hat Laktoferrin auch einen negativen feed-back Effekt auf die Granulopoese und somit die Kontrolle über die Produktion von PMN während einer akuten Infektion der Milchdrüse (Oseas *et al.* 1981). Die inflammatorischen Mediatoren PAF und der Tumor Nekrose Faktor (TNF) vermitteln eine Vergrößerung der bovinen PMN (McClenahan *et al.* 2000), langsame Diapedese der PMN durch die Mikrogefäße der Milchdrüse und

regeln ihre Bewegung auf der Seite der Infektion. Alkalische Phosphatase kann ebenfalls in der sekundären Granula nachgewiesen werden (Bainton 1973).
Phagozytose und Zytotoxität werden unterstützt durch lösliche (humorale) Faktoren, wie Lysozym, Akut-Phase Proteine, Zytokine und Proteine des Komplementsystems. Zytokine und einige Produkte des Komplementsystems dienen zudem der Kommunikation zwischen verschiedenen Zellsystemen und nehmen innerhalb des Immunsystems wichtige Koordinationsaufgaben wahr (Kirchner *et al.* 1994).

### 2.3.3 Die Rolle der Epithelzellen bei der intramammären Immunabwehr

Größte Bedeutung für den Schutz des Euters haben auch lokale Barrieren, die den ersten Schutz vor schädlichen Einflüssen darstellen. Die physiologische Rolle der Euterepithelzellen bei der Immunantwort auf die verschiedenen Erreger ist noch immer nicht voll verstanden. Sie stellen für eindringende Pathogene nach der Überwindung des Strichkanals, der Milchgänge und nach den Makrophagen in der Milch, die erste Barriere direkt in den Organismus dar. Viele Zytokine und inflammatorische Faktoren sind während einer intramammären Infektion in der Milch zu finden, aber der Ursprungsort dieser immunmodulierenden Substanzen bleibt dabei unklar. Die Anwesenheit von Zellen des Immunsystems in der Milch ist wahrscheinlich auch der Grund, warum das Augenmerk bei der Mastitisforschung auf die Rolle der Immunzellen gerichtet ist, vor allem im Bereich der Ausschüttung von Zytokinen und inflammatorischen Faktoren, sowie der Rekrutierung von Leukozyten. Aber seit kurzem wird auch den Epithelzellen der Milchdrüse eine wesentliche Rolle, vor allem bei der anfänglichen Immunabwehr, zugesprochen. So steigert eine Behandlung einer Epithelzellkulturlinie mit LPS die Produktion von IL-1 und IL-6 (Okada *et al.* 1999). Außerdem steigerte eine Behandlung von primären Epithelzellkulturen mit *S.aureus* die Produktion von IL-8 und Laktoferrin dosisabhängig (Wellnitz & Kerr 2004). Auch andere immunrelevante Gene, wie beispielsweise IL-6, IL-1ß, RANTES und CXCL5, konnten als wichtig für

die zellvermittelnde Immunantwort nachgewiesen werden (Pareek *et al.* 2005).

Das erste mal, dass bovine Euterepithelzellen *in vitro* als Zellkulturen zum Wachstum gebracht wurden, war 1961. Seitdem haben zahlreiche Gruppen die Epithelzellen als Organkulturen (Collier *et al.* 1977; Gertler *et al.* 1983; Goodman *et al.* 1983; McGrath 1987; Nickerson *et al.* 1978) oder Zellkulturen (McGrath 1987; Schmidt *et al.* 1983; Tumilowicz & Shirahama 1969) etabliert. Dazu wurden die Zellen zum einen aus Euterbioptaten (Collier *et al.* 1977; Goodman *et al.* 1983; McGrath 1987) und Drüsengewebe (Ebner *et al.* 1961; Gertler *et al.* 1983; Goodman *et al.* 1983; Kerr & Wellnitz 2003; McGrath 1987; Schmidt *et al.* 1983; Wellnitz & Kerr 2004) aus dem Euter nach der Schlachtung, sowie Zellen aus der Milch (Buehring 1990; Mselli-Lakhal *et al.* 2001) gewonnen.

## 2.4 Zytokine

Zytokine sind eine heterogene Gruppe von Proteinen, die allesamt von mononukleären Zellen gebildet werden. Sie wirken als Botenstoffe bei der Regulierung zellulärer Reaktionen. Zytokine sind in ihrer Wirkung pleiotrop, dass heißt sie beeinflussen gleichzeitig mehrere Zellfunktionen und Zellfraktionen. Gemeinsame Charakteristika von Zytokinen sind ihr niedriges Molekulargewicht (<80kD), ebenso wie ihre Teilnahme an normalen Immunreaktionen und chronisch-inflammatorischen Prozessen. Zytokine werden normalerweise nur vorübergehend und lokal produziert und wirken in parakrinen und autokrinen Mechanismen. Zytokine agieren und interagieren in Form eines Netzwerkes, wobei sie gegenseitig ihre Bildung induzieren können. Zudem können sie in ihrer Reaktion auf biologische sowie pathophysiologische Zellfunktionen synergistisch, antagonistisch und auch additiv wirken (Ibelgaufts 1995).

Eine Schlüsselrolle spielen die Zytokine nach ihrer Hochregulierung bei der Immunantwort auf Infektionen (Koj 1996; Suffredini *et al.* 1999). Eine Vielzahl proinflammatorischer Zytokine, unter ihnen Tumor Nekrose Faktor $\alpha$ (TNF), IL-1$\beta$ und IL-6, konnten in der Milch von mit sowohl gram-positiven als auch

gram-negativen Bakterien infizierten Tieren nachgewiesen werden (Bannerman *et al.* 2004). Eine beachtliche Hochregulierung der mRNA Expression dieser Zytokine konnte auch bei Euterepithelzellen gefunden werden, die mit *S.aureus* oder den Zellwandbestandteilen der verschiedenen Bakterien, LPS und LTA, behandelt wurden (Strandberg *et al.* 2005; Wellnitz & Kerr 2004). Diese Zytokine beschleunigen die inflammatorische Antwort indem sie direkt oder indirekt die Funktionen der infiltrierenden PMN und Monozyten, und die Zytokinproduktion dieser Zellen regulieren. TNF gilt als wirksamer Aktivator von PMN und Monozyten, zeichnet sich aber auch durch eine Vielzahl weiterer Funktionen aus (Rainard *et al.* 2000). Beispielweise ist neben der proinflammatorischen Wirkung auch ihre pyogene, prokoagulatorische, katabole, immunstimuliernde und Resistenz-steigernde Wirkung bekannt.

## 2.5 Chemokine

Chemokine sind eine Familie von Proteinen die in einer facettenreichen Weise agieren. Sie vermitteln verschiedene inflammatorische Antworten und die Zelleinwanderung der Leukozyten aus der Peripherie in Richtung der Infektion hin (Moser & Willimann 2004). Im Gegensatz zum Menschen und zur Maus, bei denen mittlerweile rund 50 verschiedene Chemokine nachgewiesen wurden, konnten bisher nur 18 bei der Kuh identifiziert werden. Chemokine sind kleine Proteine (8-10 kDa) mit ähnlichen 3-Dimensionalen Strukturen. Sie werden in vier Subfamilien eingeteilt, je nach dem Cysteinstrukturmotiv am N-terminalen Ende (z.B. CXC, CC, C und $CX_3C$ Subfamilien) (MacKay 2001; Rossi & Zlotnik 2000). Zunächst dachte man, dass CXC-Chemokine auf Neutrophile gerichtet sind, CC-Chemokine hingegen auf Mononukleäre Leukozyten. Doch heute ist man der Meinung, dass es nicht Subfamilien-abhängig ist, sondern die Aktivität von Chemokin zu Chemokin variiert (MacKay 2001; Rossi & Zlotnik 2000). Folglich gibt es in der CXC Subfamilie sowohl Chemokine, die auf T-Zellen, Natürliche Killerzellen (NK-Zellen), Fibroblasten und Endothelzellen sowie Neutrophile gerichtet sind. Die CC Subfamilie weist ein ähnlich verschiedenes

Wirkmuster auf (Gangur *et al.* 2002). Nach einer LPS oder LTA Behandlung regulieren die Epithelzellen der Milchdrüse die IL-8 (CXCL8), CXCL6 (GCP2) und CCL2 (MCP-1) mRNA-Expression hoch (Strandberg *et al.* 2005). Ein Anstieg von IL-8 konnte auch in der Milch von Kühen, die mit LPS behandelt wurden nachgewiesen werden (Bannerman *et al.* 2003). IL-8 wirkt stark chemotaktisch auf Neutrophile und T-Lymphozyten und ist auch bei der Aktivierung von Neutrophilen beteiligt (Harada *et al.* 1994). Die wichtige Rolle von IL-8 bei einer Mastitis Resistenz kann durch den signifikanten Zusammenhang zwischen einer subklinischen Mastitis und dem single nucleotide polymorphism (SNP) bei dem IL-8 Rezeptor CXCR2 belegt werden (Youngerman *et al.* 2004).
Zu den immunoregulierenden Chemokinen gehört ebenfalls CCL5/RANTES. Er gehört zur CC Subfamilie und wird als Mediator verschiedener inflammatorischen Prozesse gesehen (Nelson *et al.* 1997). Eine drastische Erhöhung der RANTES-Konzentration kann auch bei LPS stimulierten Euterepithelzellen verzeichnet werden (Pareek *et al.* 2005).

## 2.6 Akut-Phase Proteine

Nachdem das spezifische und unspezifische Immunsystem auf eine Infektion reagiert haben und beispielsweise Zytokine als Entzündungsmediatoren produziert wurden, aktivieren manche davon Akut-Phase Proteine (APP). Der Hauptproduktionsort dieser APP ist die Leber. TNF, IL-1 und IL-6 spielen als Zytokine in diesem Zusammenhang die größte Rolle (Gruys *et al.* 2005).
Die Hepatozyten sezernieren die durch Zytokine stimulierten positiven APP, wie beispielsweise Serum Amyloid A (SAA), Haptoglobin (Hp) und das C-reaktive Protein (CRP). Die Funktion der meisten APP ist noch nicht vollständig verstanden und aufgeklärt. Den positiven APP werden generelle Funktionen bei der Opsonierung und Lokalisation von Mikroorganismen und ihrer Produkte, sowie bei der Aktivierung von Komplementen, der Bindung von Zellresten, Neutralisation von Enzymen und Modulation des Wirtsimmunsystems zugesprochen (Gruys *et al.* 2005). SAA ist ein Apolipoprotein der Lipoproteine hoher Dichte (apoSAA) (Gruys & Snel 1994;

Nakayama *et al.* 1993; Gruys & Snel 1994). Als Akut-Phase-Protein wird SAA ein Einfluß auf den Cholesterintransport von Lipoproteinen hoher Dichte zugesprochen. Im Gewebe lockt es inflammatorische Zellen an und moduliert die Immunantwort (Gruys *et al.* 2005). Außerdem kann es LPS, ähnlich wie das Lipopolysaccharrid-bindende-Protein (LBP) binden (Schroedl *et al.* 2001).

Daneben gibt es noch einige Formen von SAA, die nur bei einzelnen Tierarten eine Rolle spielen, wie das SAA3, dass beim Rind in der Milchdrüse, in der Mastitismilch und Kolostrum, vorkommt. Außerdem wird SAA auch von den Milchdrüsenepithelzellen exprimiert (Eckersall *et al.* 2001; Larson *et al.* 2005; McDonald *et al.* 2001; Wellnitz & Kerr 2004).

## 2.7 CD45

CD bedeutet clusters of differentiation. Es handelt sich um eine Gruppierung monoklonaler Antikörper, die klar definierte, hauptsächlich in der äußeren Plasmamembran von Zellen hämatopoetischer Herkunft aber auch beispielsweise auf Endothelzellen und Fibroblasten exprimierte Strukturen erkennen. Sie dienen der Charakterisierung der Zellen (CD-Marker) und ihres Differenzierungs- und Aktivierungszustands. Die so markierten CD-Moleküle humaner Zellen werden in der Reihenfolge ihrer Entdeckung und erfolgreichen biochemischen Charakterisierung nummeriert (Drößler & Gemsa 2000; McDonald *et al.* 2001). CD45 wird auf allen hämatopoetischen Zellen exprimiert.

## 2.8 Toll-like Rezeptoren

Die angeborene Immunerkennung von Bakterien ist ein bekannter Abwehrmechanismus, der sich nicht nur auf Säugetiere beschränkt, sondern auch beispielsweise bei Drosophila melanogaster und einigen Pflanzen bekannt ist (Anderson 2000; Kopp & Medzhitov 1999). Eine zentrale Rolle in dieser angeborenen Immunerkennung spielt eine Familie der signalgebenden Rezeptoren, die Toll-like Rezeptoren (TLRs). Es sind bis

heute 13 verschiedene TLRs bei Säugetieren beschrieben (TLR1 bis TLR13), die mikrobiellen Strukturen, sogenannte PAMPs (pathogen-associated molecular patterns), erkennen. Zu diesen Strukturen gehört unter anderem das Lipopolysaccharid (LPS) (Kopp & Medzhitov 2003; Tabeta *et al.* 2004; Zhang & Mao 2003). Verschiedene für die PAMPs spezifische TLRs, manchmal auch eine Kombination aus mehreren, erkennen diese und aktivieren die Transkription von Genen, die bei der Immunabwehr einbezogen sind (Akira *et al.* 2003). Gram-negative Bakterien werden vor allem über TLR4 und gram-positive Bakterien über den TLR2 erkannt. Dabei spielen ihre Zellwandbestandteile eine Rolle. TLR4 wird durch das PAMP LPS gram-negativer Bakterien und TLR2 durch LTA und die Peptidoglykane gram-positiver Bakterien aktiviert.

Nachdem der PAMP Ligand an den TLR an der Zellaußenseite gebunden hat, kommt es zu einer Signalkaskade innerhalb der Zelle. MyD88 hat dabei die Funktion eines Adaptermoleküls und besitzt sowohl eine Toll/interleukin 1 Rezeptor (TIR) Domäne, als auch eine Todesdomäne. Die Bindung von MyD88 und dem TLR erfolgt über eine homotypische TIR-TIR Interaktion. Die Todesdomäne des MyD88 bindet dann an die Todesdomäne einer Serin/Threonin Kinase, meist Interleukin-1-receptor-associated kinase (IRAK), und das Signal wird durch ein spezifisches Mitglied der TNF-receptor-associated factor (TRAF) Familie, TRAF6, verbreitet. Letztendlich führt dies zu einer Aktivierung von NF-κB und mitogen-activated protein (MAP) Kinase, und zu einer Transkription immunrelevanter Gene in der Zelle (Kopp & Medzhitov 2003)

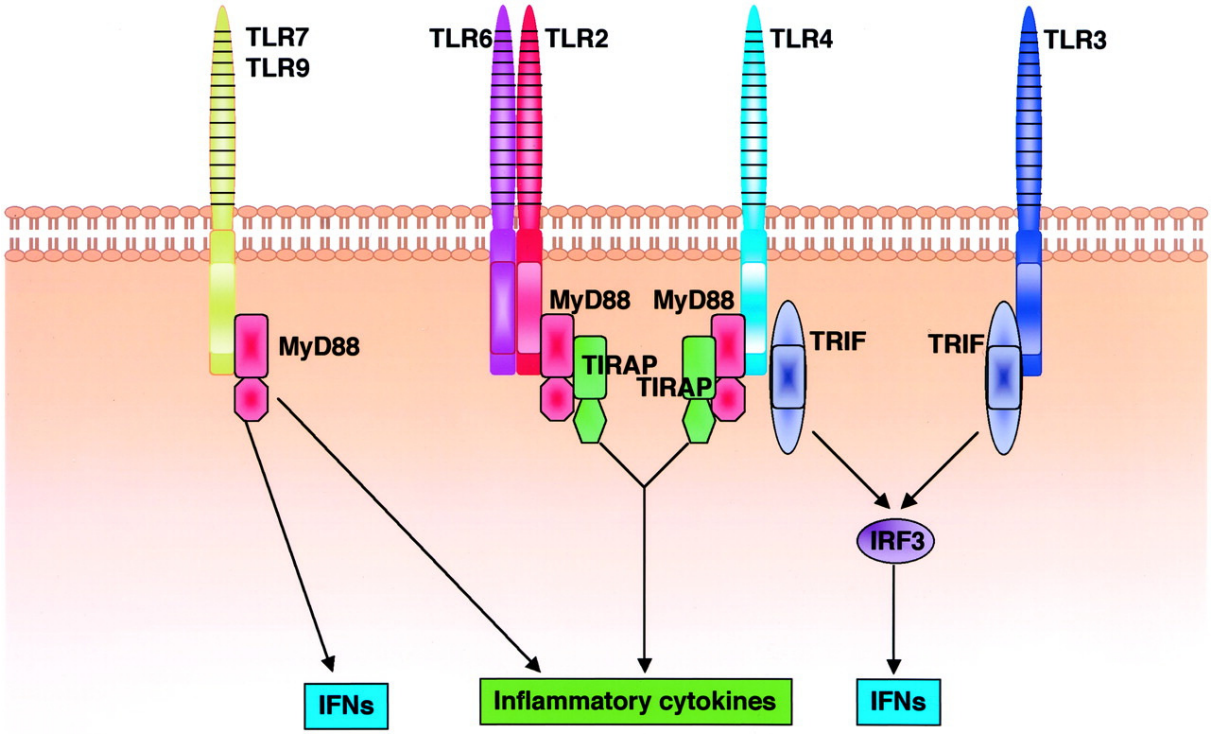


**Abb. 2: schematische Darstellung der Aktivierung von Zytokinen in der Säugerzelle durch die verschiedenen TLR**

# 3. Material und Methoden

## 3.1 Material

Alle Materialien, Puffer, Lösungen und Chemikalien wurden von Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, Deutschland) bezogen. Materialien anderer Firmen wurden explizit gekennzeichnet

### 3.1.1 Lösungen, Puffer und Medien:

**DMEM/F12**: Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium/Nutrient Mixture F12 HAM, ohne Natrium Bikarbonat.
Das Pulver wurde in 1l destillierten Wasser gelöst und 1,2 mg Natrium Bikarbonat hinzugefügt. Der pH-Wert wurde auf 7.2 eingestellt und dann das Medium sterilfiltriert. Je nach Bedarf wurden dem Medium Zusatzstoffe wie FKS, Antibiotika und Antimykotika sowie ITS in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt.

**HBSS:** Hank´s Balanced Salt Solution (10x) ohne Natrium Bikarbonat. 100 ml wurden in 900 ml dd$H_2O$ verdünnt.

**PBS:** Phosphat-Kochsalz-Puffer (phosphat-buffered-saline). 8,0 g NaCl; Merck (Darmstadt, Deutschland), 0,62 g $KH_2PO_4$, Merck (Darmstadt, Deutschland) und 1,14 g $Na_2HPO_4$; Merck (Darmstadt, Deutschland) wurden in 1l dd$H_2O$ gelöst und auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt und autoklaviert.

**ITS:** Insulin/ Transferrin/ Sodium Selenit Lösung. Enthielt 500 µg/ml bovines Insulin, 500 µg/ml humanes und bovines apo-Transferrin und 0,5 µg/ml Sodium Selenit. Das Volumen wurde mit PBS auf 10 ml aufgefüllt.

**Trifast™** peqGold peqLab Biotechnology GmbH (Erlangen, Deutschland)

**LB-Medium:** 10 g Hefeextrakt; Difco (Detroit, MI, USA), 5 g Trypton Pepton, Becton Dickinson, France S.A., (Le Pont de Claix, Frankreich) und 10 g NaCl wurden in 1l destilliertes Wasser gegeben und autoklaviert.

**TSB (Tryptikase Soja-Bouillon):** 30 g TSB Pulver wurden in 1l destillierten Wasser gelöst und anschließend autoklaviert.

**Amphotericin B:** Pulver wurde in 10 ml PBS gelöst und dann in einer Konzentration zwischen 2,5-5 µg/ml zum Medium gegeben.

**Penicillin/Streptomycin:** in einer Konzentration zwischen 10000 und 20000 IE/ ml.

**Gentamicin:** in einer Konzentration zwischen 50 und 100 µg/ml.

**Verdauungsmedium:**

HBSS mit einem Zusatz von 0,5 mg/ml Collagenase IV, 0,4 mg/ml DNase I, 0,5 mg/ml Hyaluronidase I – S, 50 µg/ ml Gentamicin und 2,5 µg/ml Amphotericin B.

**Fetales Kälberserum:**

FKS, Gibco, Invitrogene (Karlsruhe, Deutschland) in einer Konzentration zwischen 5 und 20%.

**Trypsin/ EDTA**

**Chloroform:** Merck (Darmstadt, Deutschland)

**Ethanol:** absolut, Merck (Darmstadt, Deutschland)

**DEPC:** Diethylpyrocarbonat

**DMSO:** Dimethylsulfoxid

**dNTP (je 25 µmol):** deoxynucleoside triphosphate set, R0182, Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)

**Ethidiumbromid 1% Lösung:**
3,8-Diamino-5-Ethyl-6-Phenylphenanthridinium-bromid (10mg/ml), Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)

**RNA-$H_2O$:** PCR Reinstwasser, Water Molecular Biologiy Grade, Eppendorf (Hamburg, Deutschland)

**Iso-2-Propanol:** Merck (Darmstadt, Deutschland)

**Methanol:** Merck (Darmstadt, Deutschland)

**Agarose:** Amresco 710-50G (Ohio, USA)

**Bromphenolblau:** Merck 8122 (Darmstadt, Deutschland)

### 3.1.2 Verbrauchsmaterialien:

**TC-plates 6 well:** 6 Loch Gewebezellkulturplatten, Greiner bio-one, (Frickenhausen, Deutschland)

**TC-plates 12 well:** 12 Loch Gewebezellkulturplatten, Greiner bio-one, (Frickenhausen, Deutschland)

**Tissue culture flasks:** Gewebskulturflaschen, 25 und 75 $cm^2$, Greiner bio- one (Frickenhausen, Deutschland)

**Reaktionsgefäße:** -0,5 ml, 1,5ml, 2 ml safe lock tubes, Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
-15 ml Cell Star, Greiner bio-one (Frickenhausen, Deutschland)
-50 ml Cell Star Greiner bio-one (Frickenhausen, Deutschland)

**Einwegküvetten:** Uvette, Eppendorf (Hamburg, Deutschland)

**Pipetten:** Abimed, Gilson (Frankreich)
Eppendorf (Hamburg, Deutschland)

**Pipettenspitzen:** Diamond D10 tips, Gilson (Hamburg, Deutschland)
Standardtips Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Sarstedt (Hamburg, Deutschland)

**RNA nano chips:** Agilent Technologies (Waldbronn, Deutschland)

### 3.1.3 Geräte:

**Bioanalyzer 2100:** Agilent Technologies (Waldbronn, Deutschland)

**Biophotometer:** Eppendorf (Hamburg, Deutschland)

**Gelkammer:** Agagel Mini/Midi-Wide, Biometra (Göttingen, Deutschland)

**Mikrowelle:** Panasonic NN 6275B (United Kingdom)

**Rotor-gene™ 3000:** Corbett Research (Australia)

**Thermoblock:** Thermomixer 5436, Eppendorf (Hamburg, Deutschland)

**Thermocycler:** Mastercycler gradient, Eppendorf (Hamburg, Deutschland)

**Video-Dokumentationsystem:** Image Master JVDS, Pharmacia 80-6247-01 (Freiburg, Deutschland)

**Wärmeschrank:** Shinko MCS, Bachofer (Reutlingen, Deutschland)

**$CO_2$-Inkubator:** Heraeus Instruments (Hanau, Deutschland)

**French Press:** SLM AMINCO FrenchPress Hochdruck-Aufschluss-Systeme
G.Heinemann, Ultraschall- und Labortechnik (Schwäbisch Gmünd, Deutschland)

**Sterilbänke:** Herasafe HS 12, Heraeus (Hanau, Deutschland)
Heraeus Laminair® LFR 2448 (Hanau, Deutschland)

**Zentrifugen:** Sigma 204 (Osterode, Deutschland)
Biofuge 13, Heraeus Instruments, 75003635/01 (Osterode, Deutschland)
Biofuge fresco, Heraeus Instruments, 75005510 (Osterode, Deutschland)
Biofuge pico, Heraeus Instruments, 75003280 (Osterode, Deutschland)
Zentrifuge 5415 D, Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Zentrifuge 5804, Eppendorf (Hamburg, Deutschland)

**Heizplatte:** hotplate magnetic stirrer, Cenco (Breda, Niederlande)

**Tauchsieder:** Haake C1 (Karlsruhe, Deutschland)

**Wasserbad:** Haake 7PR (Karlsruhe, Deutschland)

## 3.2 Methoden:

### 3.2.1 Primäre Epithelzellkultur

### 3.2.2: Gewinnung von primären bovinen Epithelzellkulturen aus Eutergewebe:

Zur Gewinnung von primären bovinen Epithelzellkulturen aus Gewebe, wurde Euterdrüsengewebe von vier verschiedenen Kühen am Schlachthof gewonnen. Eine bakteriologische Prüfung der Milch aller Kühe, von denen Gewebeproben entnommen wurden ging, drei Tage zuvor, voraus. Die Proben wurden ca. 20 min nach dem Schlachten der Kühe genommen. Das Euter mit 70 % -igem Ethanol gereinigt und desinfiziert. Mit einem sauberen Schlachtermesser wurde dann ein tiefer Saggitalschnitt in das Euter vorgenommen und dann mit einem sterilen Skalpell von diesem Schnitt ausgehend in die Tiefe ein zweiter Schnitt gemacht (Bild 1). Nun wurden von dort 150-200 g Gewebe entnommen (Bild 2). Als Transportmedium für das Eutergewebe diente HBSS, dem 100 µg/ ml Gentamicin, 5 µg/ ml Amphotericin B und 20000 IE/ ml Penicillin/ Streptomycin zugesetzt wurden. Der Transport ins Labor erfolgte bei Raum- bzw. Außentemperatur. Im Labor wurden alle weiteren Schritte unter einer Sterilbank der Klasse 2 getätigt. Zunächst wurde das Gewebe mit gegenläufigen Skalpellklingen in ca. 1 - 5 $mm^3$ große Stücke zerteilt und mehrfach mit HBSS gewaschen um Blut- und Milchreste zu entfernen (Bild 3), dann in einen 1 L Erlenmeyerkolben gegeben der 250 ml Verdauungsmedium enthielt. Das Verdauungsmedium bestand aus HBSS mit 0,5 mg/ml Collagenase IV, 0,4 mg/ml DNase I, 0,5 mg/ml Hyaluronidase I – S, 50 µg/ ml Gentamicin und 2,5 µg/ml Amphotericin B. Das Gewebe wurde dann ca. 2 bis 3 Stunden auf einem Flachbettschüttler bei 100 rpm und 37°C verdaut bis das Medium trüb und wolkig war. Die Zellen wurden dann durch ein Metallsieb (Porengröße ~ 1 $mm^2$) in 50 ml tubes gegeben und 5 Minuten bei 40 x g zentrifugiert. Die nun entstandenen Pellets wurden in 25 ml HBSS resuspendiert, abermals gesiebt (Porengröße ~ 0,5 $mm^2$) und wieder für 5 Minuten bei 40 x g zentrifugiert. Die Pellets

wurden wieder resuspendiert und durch einen cell strainer (Porengröße 100 µm) und ein letztes mal für 5 min bei 40 x g zentrifugiert. Die anschließende Resuspension fand im Nährmedium DMEM/ F12 statt. In T – 25 Flaschen (25 $cm^2$) wurden die Zellen in den Brutschrank zum Anhaften und Wachsen gegeben. Die Zellen der einzelnen Kühen wurden mit den Namen pET-1 bis pET-5 versehen.

**Bild 1: Schnitte ins Euterdrüsenparenchym für die Gewebeentnahme**

**Bild 2: Entnahme einzelner Gewebsstücke aus der Tiefe des Parenchyms**

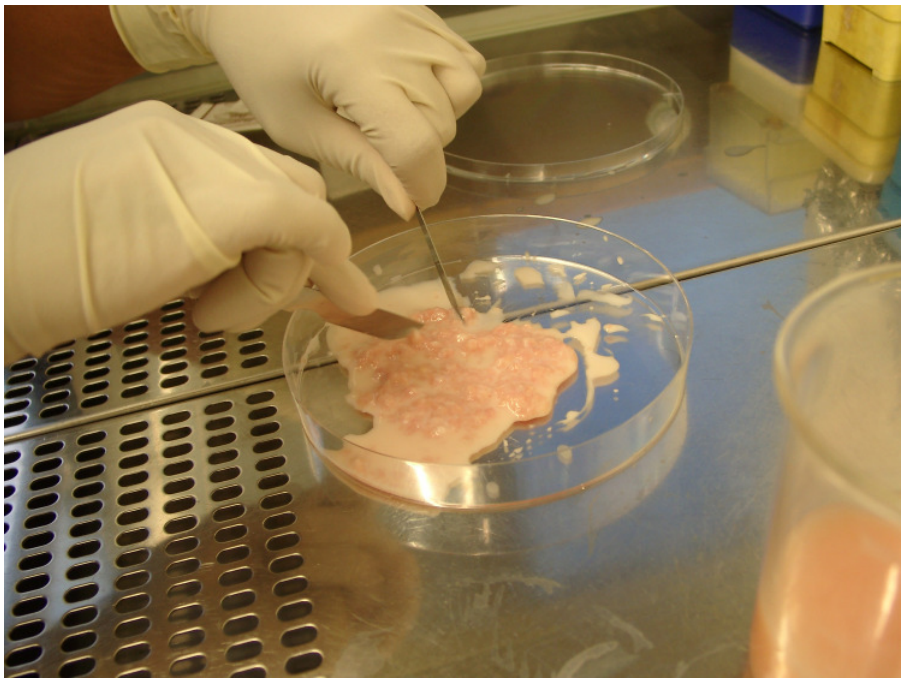

**Bild 3: Zerkleinern der Eutergewebestücke mit zwei gegenläufigen Skalpellklingen in einer Petrischale unter sterilen Bedingungen im Zellkulturlabor**

### 3.2.3 Gewinnung von primären bovinen Epithelzellkulturen aus Milch:

Zur Gewinnung von primären Epithelzellen aus Kuhmilch wurden 1,2 Liter Milch von acht Kühen in der Mittlaktation oder am Ende der Laktation gewonnen. Die Kühe stammten alle von der Versuchsstation Veitshof in Freising, Weihenstephan und gehörten der Rasse Braunvieh an. Die aktuelle Krankengeschichte war bekannt.

Die Milch wurde für 10 min bei 500 x g, 20°C zentrifugiert und danach der Überstand abgegossen.

Das so entstandene Pellet wurden in 25 ml Hanks Balanced Saline Solution mit 100 µg /ml Gentamicin und 5 µg /ml Amphotericin B pro 400 ml Milch resuspendiert um in 50 ml Tubes weitere 5 min bei 500 x g zentrifugiert zu werden.

Nachdem das neu entstandene Pellet ebenfalls in HBSS resuspendiert wurde folgte ein Filtrationsschritt durch den cell strainer mit einer Porengröße von 100 µm.

Eine letzte Zentrifugation bei 500 x g für 5 min schloss sich an. Das Pellet wurde dann im Nährmedium Dulbecco´s modified Eagles Medium / HAM F 12 mit einem Zusatz von 100 µg/ ml Gentamicin, 5 µg/ ml Amphotericin B und 5 % fetalem Kälberserum, sowie 1% ITS gegeben. Die Antibiotika und Antimykotikamenge wurde nach drei Tagen halbiert. Die Anzüchtung erfolgte in T-25 Gewebekulturflaschen, T-75 Gewebekulturflaschen, sowie 6-well oder 12-well Gewebekulturplatten). Die Kulturen der einzelnen Kühe wurden durchnummeriert und die Zellen wurden mit den Namen MZ-1 bis MZ-8 versehen. Das Medium wurde je nach Bedarf alle zwei bis drei Tage gewechselt.

Die Zellen wurden in einem Brutschrank bei 37 °C und 5 % $CO_2$ -Begasung inkubiert. Das $CO_2$ ermöglicht es, den pH Wert der Medien, die auf $CO_2$ / $HCO_{3-}$ Puffersystemen beruhen, konstant zu halten. Dieser sollte konstant, ebenfalls wie im Körper bei ca. 7 liegen. Dazu wurde für einen optimalen Gasaustausch zwischen dem Medium in den Flaschen und der Umgebungsluft gesorgt. Nach ca. 16-21 Tagen waren die Zellen konfluent und konnten das erste Mal passagiert werden.

.

### 3.2.4 Gewinnung von primären caprinen Epithelzellkulturen aus Milch

Für die Gewinnung von Euterepithelzellen aus Ziegenmilch wurden jeweils 300 ml Milch von vier verschiedenen Ziegen in der Endlaktation genommen. Die Ziegen stammten vom „Hallertauer Ziegenhof“ in Tegernbach und gehörten der Rasse Bunte Deutsche Edelziege an.

Die Milch wurde für 10 min bei 500 x g, 20°C zentrifugiert und der Überstand abgegossen. Das so entstandene Pellet wurde in 25 ml HBSS mit 100 µg/ml Gentamicin und 5 µg/ml Amphotericin B resuspendiert und weitere 5 min bei 500 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde wieder in HBSS resuspendiert und durch einen cell strainer mit einer Porengröße von 100 µm gefiltert. Eine weitere Zentrifugation für 5 min bei 500 x g schloss sich an und das Pellet im Nährmedium DMEM/ HAM F12 mit einem Zusatz von 100 µg/ml Gentamicin, 5 µg/ ml Amphotericin B, 5 % FKS und 1 % ITS. Nach drei Tagen wurden die Mengen an Antibiotika und Antimykotika halbiert.

### 3.2.5 Passagieren von Zellen:

Alle Arbeiten wurden unter einer sterilen Werkbank der Klasse 2 durchgeführt. Sie ermöglicht steriles Arbeiten durch turbulenzarme Verdrängungsströmung von oben nach unten. Die im Innenraum zirkulierende Luft wird durch einen HOSCH – Filter sterilfiltriert. Durch die Arbeitsöffnung werden ca. 10 % Raumluft angesaugt, es entsteht so eine starke Luftströmung zwischen Unterkante der Frontscheibe und Tischkante (vorgeschriebene Geschwindigkeit >0,4 m/s), die verhindert, dass Partikel aus der Raumluft in den Arbeitsraum gelangen. Alle Reagenzien, die mit den Zellen in Kontakt kamen wurden auf ca. 37°C erwärmt. Zum Passagieren von adhärenten Zellen ist es nötig, diese vom Untergrund enzymatisch zu lösen. Die hier beschrieben Mengenangaben dienen zum Passagieren von Zellen in T-25 Flaschen. Zunächst wurde das verbrauchte Medium abgenommen und die Zellen mit 2 ml PBS für ca. zwei Minuten gewaschen. Danach wurden zum Lösen der Zellen von der Gefäßoberfläche 2 ml Trypsin/ EDTA hinzugegeben und nach einer Minute so viel wieder abgenommen, dass nur noch ein dünner Film auf den Zellen zurückblieb. Nach ca. 10-15 min im Brutschrank bei 37° C hatten sich die Zellen vom Untergrund gelöst und konnten in 5 ml Medium aufgenommen und resuspendiert werden.

### 3.2.6 Zellzahlbestimmung in der Neubauer Zählkammer:

Zur Bestimmung der Zellzahl in den verschiedenen Gewebeflaschen und Gewebekulturplatten mussten diese erst, wie beim passagieren enzymatisch mit Trypsin/ EDTA vom Untergrund gelöst werden. Die Zellsuspension wurde 1 : 5 und 1 : 10 verdünnt, und 10 µl in die Kammer eingefüllt. Ausgezählt wurden je fünf Kästchen bei 100facher Vergrößerung unter dem Invertmikroskop (Leica, Zeiss). Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt und der Mittelwert gebildet. Um die Zellzahl pro ml zu ermitteln wurde dieser Wert in folgende Gleichungen, je nach Verdünnung, eingesetzt:

**Zellen/ ml = Anzahl der Zellen x $10^4$ x 5 und**
**Zellen / ml = Anzahl der Zellen x $10^4$ x 10**

Somit konnte die Zellzahl pro ml bestimmt werden, und die gewünschte Anzahl von Zellen in eine neue Flasche oder auf eine Platte gegeben werden.

### 3.2.7 Einfrieren und Auftauen von Zellen:

Nachdem die Zellen mit PBS gewaschen und mit Trypsin/ EDTA vom Untergrund der T-25 Gewebekulturflasche gelöst wurden, konnte die Aktivität des Enzyms durch Zugabe von 5 ml Medium mit 5 % FKS gestoppt werden. Die Suspension wurde anschließend bei 40 x g für 5 min abzentrifugiert und in 1 ml Medium gelöst und in Kryoröhrchen eingefroren. Zum Einfrieren wurde DMEM/ F12 mit 20 % FKS ohne Zugabe von AB und AM benutzt, dem als Frostschutzmittel 10 % DMSO zugesetzt wurde. Die Kryoröhrchen wurden so schnell wie möglich bei minus 20°C eingefroren und nach 1 h bei –80°C eingefroren oder in flüssigem Stickstoff gelagert.
Zum Auftauen wurden die Zellen aus dem flüssigen Stickstoff heraus genommen und sofort in einem 37°C warmen Wasserbad aufgetaut. Danach wurden die Zellen in 9 ml Medium gegeben, dem 20 % FKS zugesetzt war und das ebenfalls im Wasserbad auf 37°C erwärmt wurde. Nun folgte eine Zentrifugation bei 40 x g für 5 min. Das so entstandene Pellet wurde wiederum in Kulturmedium resuspendiert und in die Zellkulturflasche gegeben.

## 3.3 Anzüchtung und Inaktivierung von *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* und *Streptococcus uberis*:

Zur Behandlung der primären Epithelzellen aus dem Euter wurden verschiedene gram-positive und gram-negative Bakterien angezüchtet und inaktiviert. *Escherichia coli*, als Beispiel für eine Infektion mit einem gram-negativen Bakterium wurde aus einer Mastitis isoliert. Anhand einer

Enterotube konnte verifiziert werden, dass es sich wirklich um einen Stamm von *E.coli* handelte. Als Beispiele für eine Infektion mit gram-positiven Erregern wurden Stämme der Bakterien *Staphylococcus aureus* (Stamm M60) (Bramley *et al.* 1989) und *Streptococcus uberis* (ATCC, Nr. 27958) verwendet. *Koagulase negative Staphylokokken* (*KNS*), die ebenfalls aus einer Mastitis isoliert wurden, stellte das Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit in Oberschleißheim zur Verfügung. Alle Bakterien wurden zunächst auf Blutagarplatten ausgestrichen und vermehrt. Danach wurden sie aliquotiert und bei -80 °C tiefgefroren. Zum Anzüchten wurden die Bakterien im Drei-Ösen-Ausstrichverfahren auf Blutagarplatten gegeben und über Nacht bei 37°C inkubiert, dann je eine Kolonie gepickt und in Kulturmedium aufgenommen. Bei *Escherichia coli* geschah dies in 3 ml autoklaviertem LB Medium, bei *Staphylococcus aureus*, den *koagulase negativen Staphylokokken* und *Streptococcus uberis* in je 3 ml autoklavierter Trypticase Soja Bouillon (TSB). Auch diese wurden wiederum über Nacht bei 37°C im Wärmeschrank inkubiert. Danach wurden die Bakterien 1: 1000 verdünnt und in einen 500 ml Erlenmeyerkolben gegeben, und bis zu einer optischen Dichte (OD) von 0,4 – 0,8, bei 600 nm, wachsen gelassen. So war gesichert, dass sich die Bakterien noch in der exponentiellen Wachstumsphase befanden. Zuvor wurde eine Wachstumskurve aller drei Bakterien erstellt. In ihnen konnte abgelesen werden, wie viele Bakterien bei welcher optischen Dichte im Medium sind. Es waren nun Bakterienzahlen von ca. 4 x $10^8$ / ml bei *E.coli* und Bakterienzahlen von ca. 2 x $10^8$ / ml bei *S.aureus* und *Str.uberis* erreicht. Danach konnten die Suspensionen zum Waschen in je zwei 50 ml tubes gegeben werden. Nach einer Zentrifugation bei 1750 x g für 10 min wurde das Pellet in 50 ml PBS gelöst und wieder für 10 min bei 1750 x g abzentrifugiert. Das so entstandene Pellet wurde in 5 ml PBS resuspendiert werden. Die Hitzeinaktivierung erfolgte im Wasserbad bei 63°C für 30 min. Danach konnten die Bakterien so verdünnt werden, dass 10 x $10^6$ cfu in 100 µl Suspension waren. Schließlich wurden die so entstandenen Aliquots bei -80°C tiefgefroren. Zu den Versuchen konnte immer die gewünschte Anzahl an Aliquots im Wasserbad bei 37°C aufgetaut werden. Als weitere Inaktivierungsart wurde die French Press gewählt, in der die Bakterien bei einem Druck von 10.000 – 11.000 psi in einer Kammer

zerpresst wurden. Dazu wurde das zuletzt nach dem Waschen entstandene Bakterienpellet in 2 ml PBS gelöst. Alle Teile der French Press wurden gründlich mit 70%igem Alkohol gereinigt und die Gummis am Deckel und am Stab der Kammer gefettet. Vor dem Befüllen der Kammer wurde diese auf den zugehörigen Ständer gegeben und der Stab von unten soweit eingeführt, dass er auf maximale Füllmenge stand. Dann wurden die 2 ml Bakteriensuspension hineingegeben und bei einem Druck von 10.000 und 11.000 psi zerpresst. *S.aureus* wurde zweimal gepresst. Zwischendurch wurde die Kammer mit Reinstwasser gewaschen. Die inaktivierten Bakterien wurden wie die hitzeinaktivierten verdünnt und bei –80°C eingefroren.

## 3.4 Versuchsmodell:

### 3.4.1: Behandlung mit den verschiedenen Mastitis Erregern:

In dem vorliegenden Versuchsmodel wurden die Zellen nach der Gewinnung zwei Passagen lang kultiviert und eingefroren. Für die verschiedenen Versuche wurden Zellen verschiedener Kühe aufgetaut und gleichzeitig, aber getrennt voneinander, kultiviert. Die Anzahl der Kühe variierte zwischen den Versuchen. Die Versuche selbst fanden immer in der vierten Passage statt. Dazu wurden die Zellen nach der dritten Passage in der Neubauer Zählkammer ausgezählt und jeweils 150 000 Zellen in je ein well einer sterilen 12-well Gewebekulturplatte geben. 24 h vor den Versuchen wurde den Zellen 1 ml frisches Medium zugesetzt, das keine Antibiotika und Antimykotika aber FKS und ITS enthielt. Außerdem wurde dieses direkt vor dem Versuch noch einmal gewechselt. Danach konnte man dem Medium die gewünschte Menge an hitzeinaktivierten Bakterien zugeben. Die Zeit in der die Zellen mit den inaktivierten Bakterien behandelt wurden, kamen die 12-well Platten wieder in den Brutschrank. Zusätzlich wurden auch Versuche durchgeführt, bei denen nur die typischen Zellmembranbestandteile für gram-positive und gram-negative Bakterien auf die Zellen gegeben wurden. Dazu wurde Lipopolysaccharid (LPS), Zellwandbestandteil aus gram-negativen Bakterien, Lipoteichonsäure (LTA) und Peptidoglykane (PGN), Zellwandbestandteile gram-positiver Bakterien, genommen.

Nach den Behandlungen wurde die RNA isoliert, qualitativ bestimmt und die Immunantwort der Zellen mittels qRT-PCR gemessen.

### 3.4.2: RNA Gewinnung:

Die Zellen wurden nach der gewünschten Inkubationszeit geerntet, d.h. es wurden je 500 µl peqGOLD TriFast™ auf ein 12-well gegeben. Dadurch lösten sich die Zellen sofort vom Untergrund. Nach mehrmaligen Auf – und Abpipettieren wurde das TriFast™ mit den Zellen in 2 ml tubes gegeben und bis zur Isolierung der RNA bei -80°C gelagert. RNA hat eine relativ kurze Halbwertzeit, da sie durch Ribonukleasen (RNasen) abgebaut wird. Die RNasen kommen nicht nur in den Zellen selbst vor, sondern ubiquitär, besonders an den Händen. Um das Material vor Kontamination zu schützen wurden während der gesamten Arbeit mit RNA Einmalhandschuhe getragen. Zum späteren Lösen der RNA wurde RNase freies Wasser hergenommen. Zunächst wurden die Proben nach dem Auftauen für 5 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Danach gab man 100 µl Chloroform ($CHCL_3$) hinzu und vortexte das Gemisch für ca. 10 sek. bis es trüb wurde. Eine Inkubation von 10 min bei Raumtemperatur schloss sich an. Anschließend folgte eine Zentrifugation bei 4°C für 15 min und 12 000 x g. Die entstandene obere wässrige Phase enthielt die Gesamt-RNA, wurde abpipettiert und in ein neues 1,5 E-Cup überführt. Dabei sollte ein Volumen von ca. 250 µl entstehen. Nun wurden 250 µl Iso-2-Propanol dazu gegeben und das Gemisch vorsichtig 10 x end-over-end gemischt und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert (Präzipitation der RNA). Nach weiterer Zentrifugation für 15 min bei 4°C und 12 000 x g wurde der Überstand abgenommen und das Pellet mit 250 µl eisgekühltem 70 %-igem Ethanol gewaschen. Anschließend wurde die RNA im Wärmeblock bei 37°C für 10 min getrocknet, um Alkoholreste vollständig verdampfen zu lassen. Das trockene Pellet wurde in 30 µl RNA-$H_2O$ gelöst. Die gelöste RNA wurde bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

### 3.4.2.1: Überprüfung der RNA Quantität:

Die Ausbeute der RNA-Extraktion wurde mit einem Photometer bestimmt. Die Nukleinsäurekonzentration wurde in einer 1:50 Verdünnung bei 260 nm gemessen. Verdünnt wurden die Proben in DEPC behandeltem Wasser, welches auch als Blindprobe genutzt wurde. Aus drei Messwerten wurde ein Mittelwert errechnet und dieser für die Verdünnung zur Arbeitslösung für die qRT-PCR mit einer Konzentration von 200 ng RNA verwendet. Die Verdünnung zur Arbeitslösung erfolgte mit RNA-$H_2O$. Für die Qualitätsbestimmung mit dem Bioanalyzer wurde eine Arbeitsverdünnung die 50 ng RNA enthielt hergestellt.

### 3.4.2.2 Überprüfung der RNA Qualität:

Die Qualität der RNA konnte mit Hilfe des Bioanalyzers von AgilentTechnologies bestimmt werden. Gemessen wird hier der RNA Unversehrtheits- Wert (RNA Integrity Number, RIN). Alle Reagenzien, die bei 4°C gelagert wurden, mussten vor Gebrauch 30 min auf Raumtemperatur gebracht werden. Für die Vorbereitung des Gels wurden 550 µl RNA 6000 Nano Gel Matrix in einen Filter pipettiert und für 10 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Für den Gel – Farbstoff – Mix wurden 1 µl des RNA 6000 Nano Dye Concentrate auf 65 µl des filtrierten Gels pipettiert, gemischt und zentrifugiert (10 min, Raumtemperatur, 14 000 rpm). 9 µl des Gel-Farbstoff-Mix wurden in ein well des RNA-Chips pipettiert. Der Chip wurde in die Chip-Priming-Station gesetzt und mit einer auf 1 ml eingestellten Spritze wurde der Gel-Farbstoff-Mix in die Kapillaren des RNA-Chips gepresst. Der Druck wurde für 30 Sekunden aufrecht erhalten und dann wieder gelöst. Jeweils 9 µl Gel-Farbstoff-Mix wurden noch in zwei weitere wells des RNA-Chips pipettiert. 5 µl des RNA Nano Marker wurden in alle 12 wells für die Proben und in das well für die Ladder pipettiert. In Letzteres wurde 1 µl des RNA 6000 Ladder gegeben und in die wells für die Proben jeweils 1 µl Probe pipettiert. Der Chip wurde für 1 min in den Vortexadapter gestellt und gemischt. Daraufhin konnte der Chip in den Agilent Bioanalyzer 2100

gesetzt, und der Lauf gestartet werden. Die Ergebnisse wurden mit Hilfe der dazugehörigen Software interpretiert werden. Bei der Zellkultur-RNA lagen die RIN Werte stets zwischen 8 und 10, wobei 10 der Bestwert ist und die RNA Qualität bei niedrigeren RIN Werten (bis 1) sinkt.

### 3.4.3.: Reverse Transkription-quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR):

Der erste Schritt in einer RT-PCR ist die reverse Transkription der RNA Probe in einen komplementären DNA Strang (complementary DNA, cDNA). Dies erfolgt durch das Enzym Reverse Transkriptase, welcher in der Natur dazu dient RNA – Viren der Umwandlung ihres RNA Genoms in eine DNA Kopie zu ermöglichen. Anschließend wird die cDNA unter Verwendung spezifischer Primer in einer Polymerase Kettenreaktion (PCR) amplifiziert. Für die enzymatische Vermehrung eines DNA-Segments werden zwei Primer (alle von MWG Biotech) benötigt, die komplementär zu den beiden Seitenbereichen des gewünschten Segments sind. Wenn die Primer an das cDNA Segment binden, kann das Enzym DNA Polymerase die in-vitro-DNA-Synthese katalysieren. Die DNA Synthese basiert grundsätzlich auf drei Schritten: Jeder Zyklus beinhaltet 1. eine Denaturierung bei 95°C, um die beiden Stränge der DNA zu trennen, 2. eine Hybridisierung, in der beide Primer an die Einzelstrangmatrize binden (Annealing, bei ca. 58-62°C) und 3. eine Synthetisierung (Extension) bei 72°C, bei der das DNA Segment zwischen den beiden Primern synthetisiert wird. Dies geschieht mit Hilfe der DNA Polymerase und dem Desoxiribonukleosid-Triphosphat (dNTP), die im Reaktionsmix (Master Mix von Qiagen) enthalten sind. Dieser Zyklus aus Denaturierung, Annealing und Synthese wird wiederholt, und bei jeder Wiederholung sollte sich die Menge des zu amplifizierenden Segments verdoppeln. Zum Ende aller Zyklen schließt sich eine Schmelzphase an, bei der die Temperatur in kleinen Schritten erhöht wird und der für das PCR – Produkt spezifische Schmelzpunkt ermittelt wird. Der Schmelzpunkt ist abhängig vom Gehalt an Guanin- und Cytosin-Basen im Produkt (G/C Gehalt). Nach Auftrennen des PCR-Produktes fällt die Fluoreszenz drastisch

ab. Um die Reaktion zu verfolgen und die Menge der entstandenen DNA in der real-time PCR zu quantifizieren wurde das fluoreszierende SYBR® Green benutzt. Der ungebundene Farbstoff weist zwar ebenfalls eine Grundfluoreszenz in dem Reaktionsmix (Quanti Tect™ SYBR® Green RT – PCR Master Mix von Qiagen) auf, allerdings wird mit Fortschreiten der Reaktion auch immer mehr Farbstoff an die entstehende DNA gebunden. Daher spiegelt eine höhere Fluoreszenz auch eine höhere Konzentration des PCR – Produkts wider. Der fluoreszierende Stoff wird durch einen Laser aktiviert und durch ein optisches Erkennungsmodul gemessen. Analysen und die Quantifizierung wurden mit der zugehörigen Software des PCR Gerätes (Rotor-Gene 3000 von Corbett Research™) ausgeführt. Die PCR Reaktion kann in mehrere Phasen eingeteilt werden (siehe Abb. 3). In der ersten Phase bleibt die Fluoreszenz noch unter dem Level des Hintergrundrauschens. Beim Eintritt in die zweite Phase, wenn der Bereich des Hintergrundrauschens überschritten wird, wird der sogenannte Crossing Point (CP) gemessen, anhand dessen die Quantifizierung des mRNA Gehalts erfolgt. Als dritte Phase schließt sich ein exponentieller Anstieg des PCR Produkts an. In der vierten Phase erreicht das Produkt ein Plateau.
Um das PCR-Produkt überhaupt quantifizieren zu können, muss die genaue Anfangskonzentration der in die Reaktion gebrachten RNA bekannt sein. Diese Menge betrug immer 200 ng/ Reaktion.
Das Protokoll wurde wie vom Hersteller (Qiagen) empfohlen verwendet.

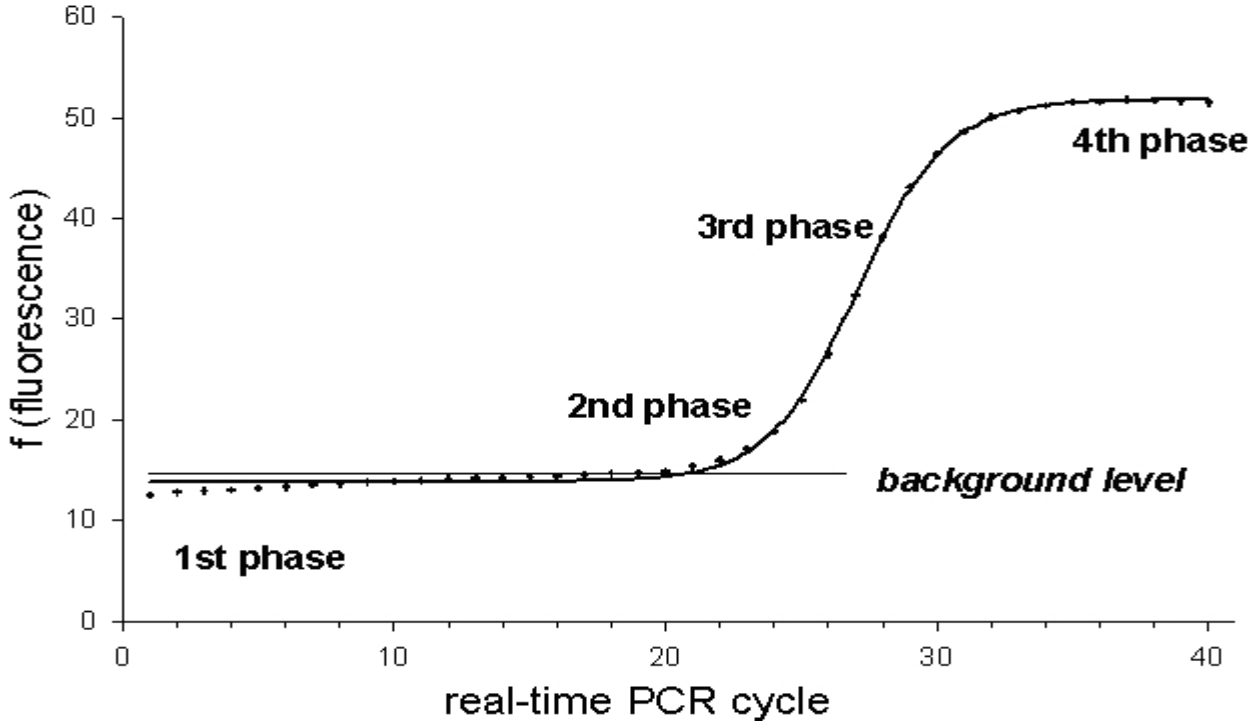


**Abb. 3: schematische Verlaufskurve einer qRT-PCR**

Als Schmelzpunkt oder „melting point“ bezeichnet man die Temperatur, bei der das Produkt schmilzt. Diese Temperatur ist für alle Primer spezifisch. Die Schmelzkurvenanalyse dient also der Überprüfung der Qualität der Primer und der entstandenen Produkte. Die Schmelzpunkte werden automatisch im Anschluss an den letzten Zyklus der PCR Reaktion gemessen und in der entsprechenden Software am Computer graphisch dargestellt (siehe Abb.4).

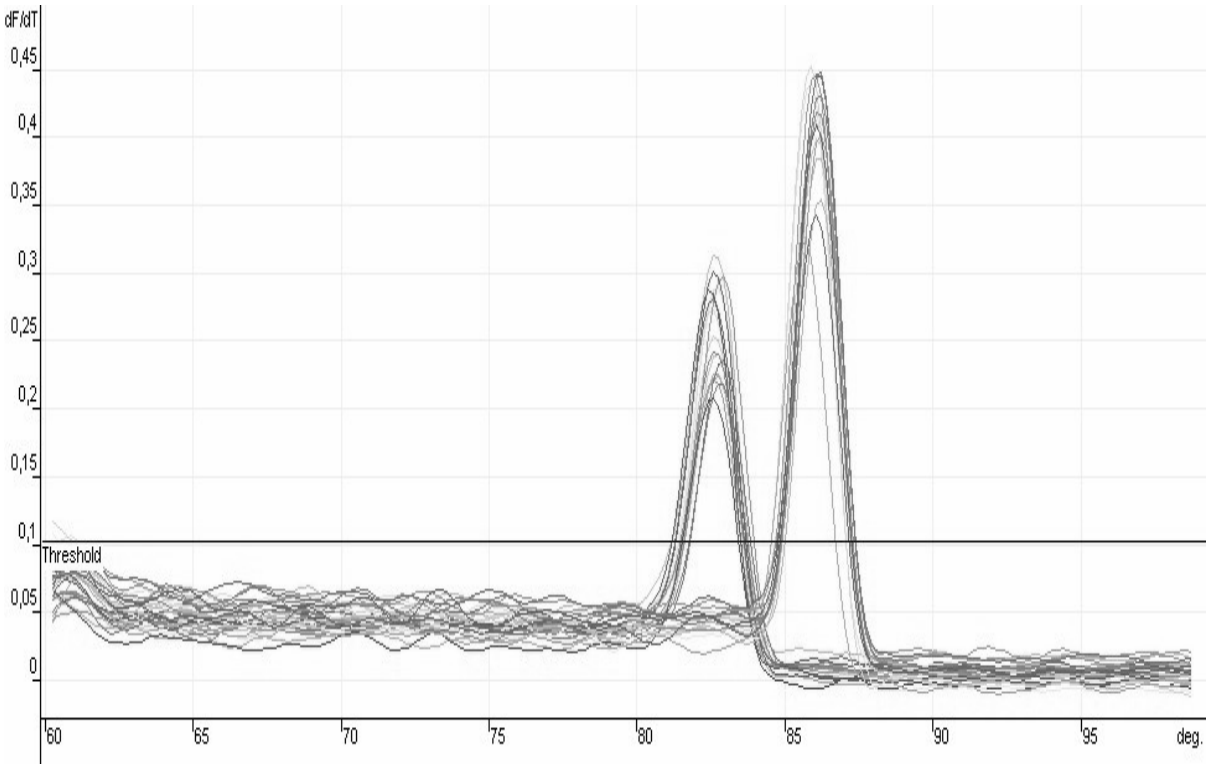


**Abb. 4: Schmelzkurven für Interleukin-8 (grün) und GAPDH (orange)**

### 3.4.3.1 PCR Protokoll:

| **Zusammensetzung:** | **Volumen in µl/ Probe** |
|---|---|
| 2x QuantiTect™SYBR®Green RT – PCR Master Mix | 5 |
| QuantiTect™ RT – Mix | 0.1 |
| Forward Primer (20 pmol/ µl) | 0.5 (10 pmol) |
| Reverse Primer (20 pmol/ µl) | 0.5 (10 pmol) |

Nach diesem Protokoll wurden die Rotor-Gene™ 100 µl Reaktionsröhrchen mit 6.1 µl des Master Mix und 3.9 µl der RNA Probe befüllt. Die RNA wurde hierfür vorher so verdünnt, dass 200 ng RNA in diesen 3.9 µl waren. Verdünnt wurde mit Rnase freiem Wasser.
Die mit 10 µl befüllten Röhrchen wurden in den Rotor-Gene™ gegeben und das folgende Programm gestartet:

| **Reaktionsschritt** | **Temperatur** | **Zeit** |
|---|---|---|
| Reverse Transkription | 50°C | 20 min |
| Initialer Aktivierungsschritt | 95°C | 15 min |
| *35 – 40 – maliger 3 Schritt Zyklus:* | | |
| Denaturierung | 94°C | 15 sek |
| Annealing | 58 – 62°C | 30 sek |
| Extension | 72°C | 20 sek |
| Hold | 40°C | 1 min |
| *Schmelzkurvenanalyse* | | |

Die Crossing Points (CP) wurden durch die "competitive quantification" der Rotor-Gene software 5.0 (Build 60) berechnet.
Normalisiert wurden die PCR-Ergebnisse mit Hilfe des Referenz-Gens GAPDH, das bei jeder Reaktion mitlief und dessen Wert vom Target-Gen abgezogen wurde. Diese Differenz wird als ΔCP-Werte bezeichnet und wurde so in die Diagramme eingetragen.

### 3.4.3.2 Gel – Elektrophorese:

Die PCR-Produkte wurden noch in einem 1,5% -igem Agarose Gel, das 1 % Ethidiumbromid enthielt auf ihre Größe getestet. Dazu wurden jeweils 5 µl des PCR-Produktes mit 1 µl Bromphenolblau-Glycerin gemischt und auf das Gel aufgetragen. Zur Überprüfung der Produktlänge wurden außerdem 0,5 µl eines 100 Basenpaar (bp) Markers laufen gelassen, ebenfalls mit Bromphenolblau-Glycerin vermischt. Die Elektrophorese erfolgte über 30 min bei 80 Volt. Anschließend wurden die Banden mit UV-Licht zum fluoreszieren gebracht und mit einem Videodokumentationsprogramm aufgenommen.

### 3.4.4 Primer

**Tabelle 2: Primersequenzen**

| Name | Sequenz 5´- 3´ | Annealing Temperatur | Bp |
|---|---|---|---|
| $TNF_{alpha}$ | for CCA CGT TGT AGC CGA CAT C | 58,8 | 197 |
| | rev CCC TGA AGA GGA CCT GTG AG | 61,4 | |
| SAA | for CCT GGG CTG CTA AAG TGA TC | 59,4 | 183 |
| | rev TAC TTG TCA GGC AGG CCA G | 58,8 | |
| IL-8 | for ATG ACT TCC AAG CTG GCT GTT G | 60,3 | 200 |
| | rev TTG ATA AAT TTG GGG TGG AAA G | 59,7 | |
| IL-6 | for GCT GAA TCT TCC AAA AAT GGA GG | 58 | 188 |
| | rev GCT TCA GGA TCT GGA TCA GTG | 58 | |
| GM-CSF | for TTCTCCGCACCTACTCGC | 60,1 | 195 |
| | rev GTTCTTGTACAGCTTCAGGCG | 60,1 | |
| GAPDH | for GTC TTC ACT ACC ATG GAG AAG G | 60 | 197 |
| | rev TCA TGG ATG ACC TTG GCC AG | 60 | |
| RANTES | for GCC AAC CCA GAG AAG AAGTG | 59,5 | 220 |
| | rev CTG CTT AGG ACA AGA GCG AGA | 59,7 | |
| TLR2 | for CATTCCCTGGCAAGTGGATTATC | 60 | 195 |
| | rev GGAATGGCCTTCTTGTCAATGG | 57,9 | |
| TLR4 | for CTT AGG TTC AAA CTT CAT GGG C | 58,4 | 188 |
| | rev AGG TTT GCA GAC TGA CTA AGC C | 60,3 | |
| TLR9 | for CCG TCA GCT CAA AGG ACT TC | 59,4 | 169 |
| | rev AAC TGG GAG CCA TTA ACC G | 56,7 | |
| CD 45 | for TTG ATG GTT TCA AAG AGC CC | 55,3 | 202 |
| | rev ATC TCC ATA AAC CCG GCT G | 56,7 | |

### 3.5. Immunohistochemie:

Zur Prüfung, ob es sich bei den isolierten Zellen auch wirklich um Epithelzellen handelte, wurden die Cytokeratine in den Zellen immunohistologisch angefärbt. Dazu wurden einige Zellen auf kollagenbeschichtete Objektträger zum Wachsen ausgesät. Dazu wurde ein Tropfen des flüssigen Kälberhautcollagens (calf skin collagen) unter der Sterilbank auf einen Objektträger gegeben und ausgestrichen. Nach etwa einstündigem Trocknen konnten die Objektträger verwendet werden. Die Anzüchtung der Zellen erfolgte in sterilen Petrischalen. Nachdem die Zellen ca. 70 bis 80 %-ige Konfluenz erreicht hatten, wurden die Objektträger aus dem Medium genommen und mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit -20°C kaltem Methanol/ Aceton Gemisch im Verhältnis 50:50 fixiert, 10 min getrocknet und dann bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren. Zum Färben mussten die Objektträger ein paar Minuten auf Raumtemperatur gebracht werden. Dann wurden sie 3-mal für 5 min mit PBS gewaschen. Danach, zum blockieren der endogenen Peroxidasen, wurden sie in 1%igem Wasserstoffperoxid in PBS für 30 min bei Raumtemperatur im dunkeln inkubiert. Zur Reduktion der Hintergrundfärbung wurden die Proben dann für 30 min mit normalem Ziegenserum (1:10 verdünnt) inkubiert. Das Ziegenserum wurde vor der Inkubation mit dem primären Antikörper abgegossen, bei der Negativkontrolle allerdings bis zum sekundären Antikörper darauf belassen.

Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper Cytokeratin (clone MNF 116, DaKo Cytomation) über Nacht in einer feuchten Kammer.

Am nächsten Tag schlossen sich 3 Waschschritte in PBS für jeweils 5 min an. Danach wurde der sekundäre Antikörper (Ziege-Anti-Maus sekundär AK-HRP-konjugiert (1:200) dazugegeben und dieser für 1 h inkubiert und wieder 3 mal für 5 min in PBS gewaschen. Zur Visualisierung der Peroxidasen wurden die gebundenen Antikörper Komplexe mit DAB (3,3 Diaminobenzidinehydrochlorid,10 mg) und 1% $H_2O_2$ in PBS für 20 min im Dunkeln inkubiert, drei mal mit PBS gewaschen und dann kurz in bidestilliertes Wasser getaucht. Eine Kernfärbung mit Hämalaun nach Mayer schloss sich an. Nach dem gleichen Protokoll wurde eine Färbung des

CD11a Antikörper (Coulter-Immunotech,Hamburg, Deutschland) vorgenommen, den Makrophagen, Monozyten, Lymphozyten und Granulozyten besitzen.

### 3.6 Statistik

Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte angegeben ± SEM. Quantitative RT-PCR Ergebnisse wurden als ΔCP-Werte angegeben (CP des Zielgens abzüglich des CP des Referenz-Gens GAPDH). Alle statistischen Analysen, Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte wurden mit dem Programm SigmaStat 3.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) berechnet. Um die statistische Signifikanz zwischen den Kontroll- und Behandlungsgruppen zu berechnen wurde der gepaarte Student´s t-test genutzt. Als statistisch signifikant wurden p-Werte $< 0,05$ angesehen.

### 3.7 Interleukin-8 ELISA

Für den IL-8 ELISA wurde der humane IL-8-ELISA Kit von IBL, Hamburg benutzt (Art.Nr. BE53081, Charge: 16601005).
Zuerst wurden die Versuchsreagenzien nach Anweisung gemischt. So erhielt man 1 l Wasch-Puffer und 100 ml Assay-Puffer. Das HRP-Konjugat wurde 1:100 mit Assay-Puffer verdünnt. Die 96-Loch Testplatte wurde mit jeweils 300 µl/Loch Waschpuffer zweimal gewaschen. Dann wurde der IL-8/NAP-1 Standard mit Konzentrationen zwischen 16 pg/ml bis 1000 pg/ml vorbereitet.
Dann wurden im Doppelansatz 100 µl Sample Diluent in die Negativkontroll-wells gegeben.
Von den Proben wurden, ebenfalls im Doppelansatz, 50 µl in die vorgesehenden Löcher gegeben und diese danach mit 50 µl Sample Diluent verdünnt.
Außerdem wurde dann in alle Löcher 50 µl des verdünnten HRP-Konjugats gegeben und die Platte abgedeckt und für 2 h bei Raumtemperatur auf einem Schüttler bei 100 rpm inkubiert.

Nachdem die Abdeckung wieder abgenommen war und die Löcher ausgeleert waren, wurde die Platte viermal mit dem Waschpuffer gewaschen. 100 µl der TMB Substrate Solution wurden in alle Löcher pipettiert und die Platte noch einmal bei Raumtemperatur 20 min auf einem Schüttler inkubiert. Nach der Inkubation hatte der höchste Standard eine Dunkelblaue Farbe erreicht und die Reaktion konnte mit der Stop Solution gestoppt werden.
Die optische Dichte der Proben und somit deren Gehalt an IL-8 wurde im Spektro-Photometer bei 450 nm gemessen.

# 4. Ergebnisse

## 4.1 Zellkulturen

### 4.1.1 Morphologie und Wachstumsverhalten

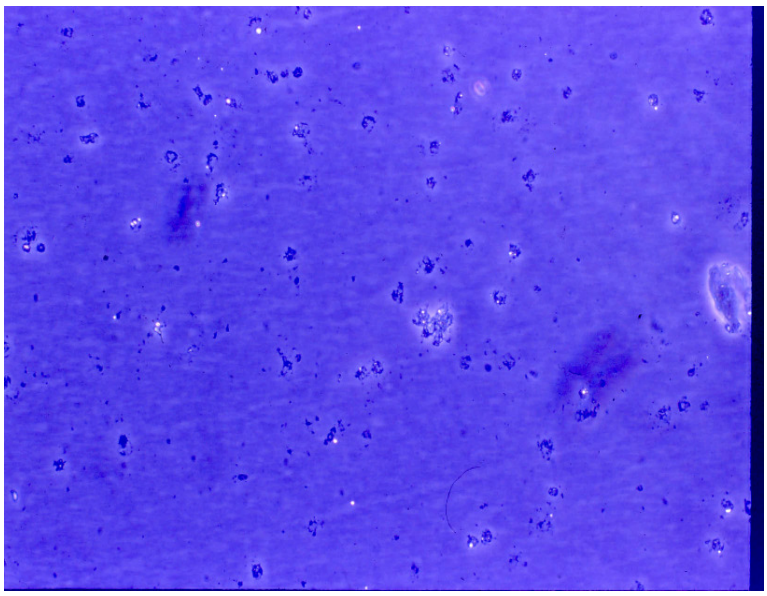

**Bild 4: Euterepithelzellen aus Kuhmilch am Tag der Isolierung**

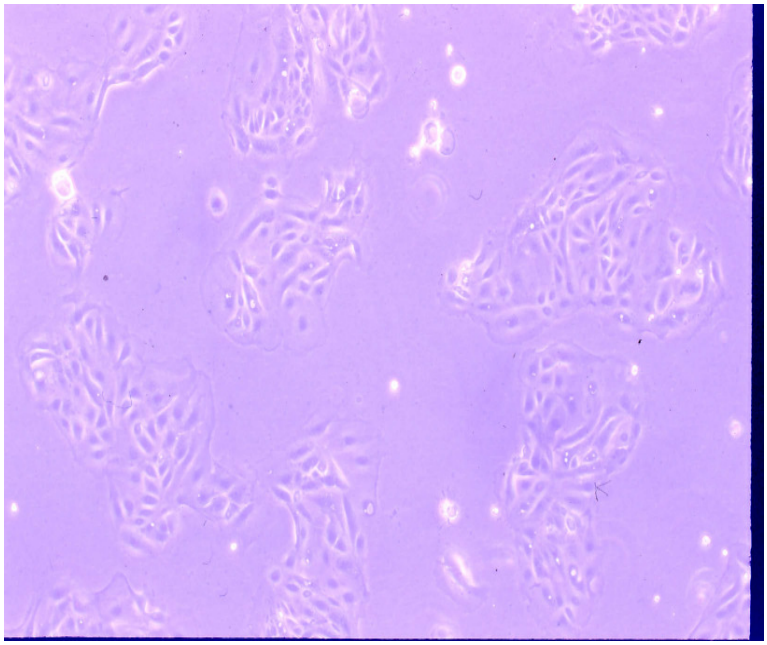

**Bild 5: Euterepithelzellen aus Kuhmilch am Tag 16 nach der Isolation**

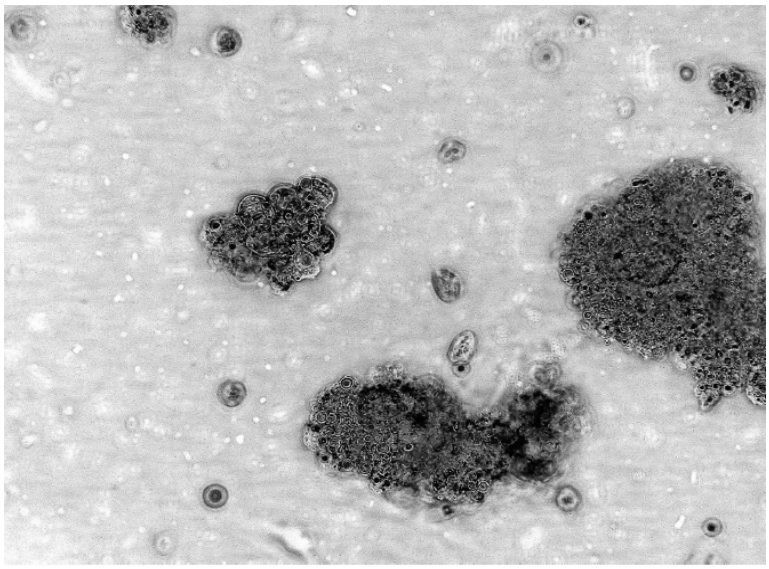

**Bild 6: Euterepithelzellen aus Kuheutergewebe direkt nach Isolation und Kultivierung**

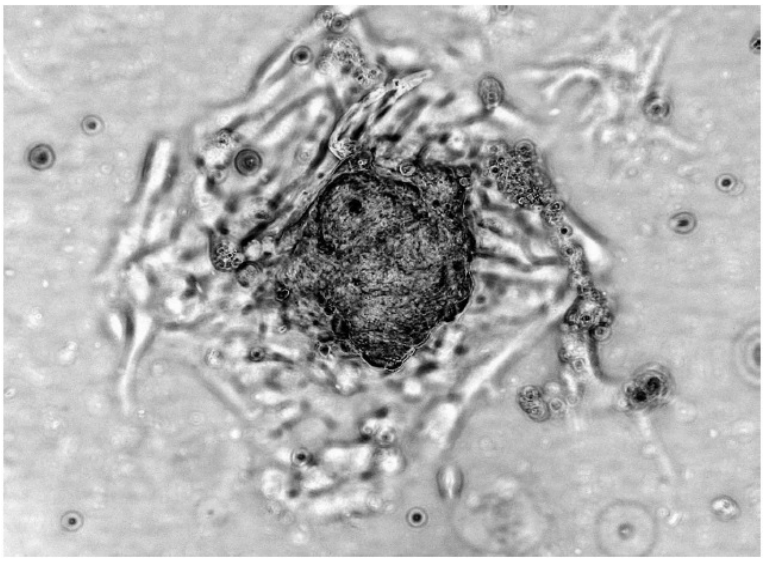

**Bild 7: Euterepithelzellen aus Kuheutergewebe am ersten Tag nach der Isolation**

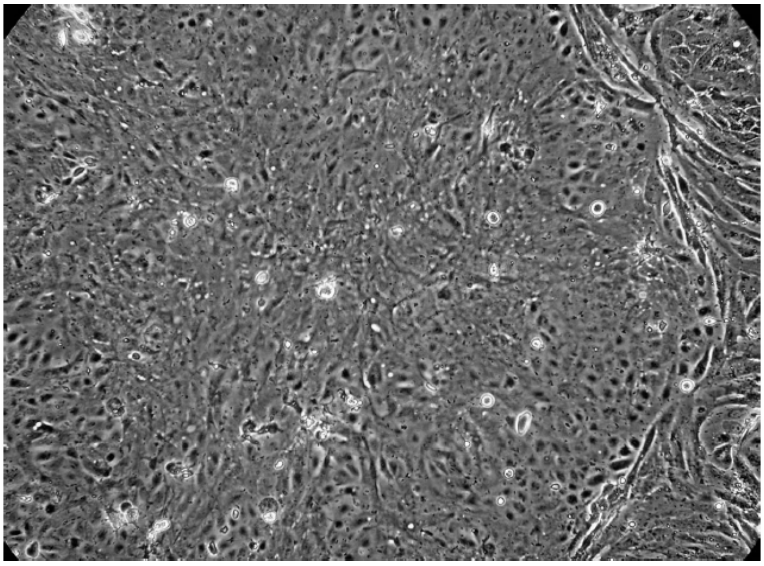

**Bild 8: Euterepithelzellen aus Kuheutergewebe am Tag 5 nach der Isolation**

Die Zellisolation und das Wachstum der Zellen lief bei regelmäßigem Mediumwechsel und regelmäßiger Kontrolle des Zustands der Zellen problemlos und meistens ohne Infektionen. Waren doch mal Zellen infiziert, wurden sie sofort entsorgt. Ein Unterschied der Zellen konnte in der Morphologie und im Wachstum bei den Zellen die aus der Milch genommen wurden und bei den Zellen aus dem Gewebe beobachtet werden. Die Epithelzellen, die aus dem Gewebe gewonnen wurden, lagen noch als Acini, ähnlich wie sie auch in der Milchdrüse aussehen vor. Am Tag eins (Bild 6) und teilweise auch noch am Tag zwei (Bild 7) konnte diese Struktur erkannt werden. Danach wuchsen die Acini an und breiteten sich im Monolayer aus. Später wurde die Acini-Struktur nicht mehr eingenommen. Die Zellen blieben einschichtig. Ein konfluenter Zellrasen wurde nach ca. sechs Tagen erreicht (Bild 8).

Nach der Probennahme aus der Milch und der anschließenden Kultivierung konnten am ersten Tag nach der Kultivierung noch keine adhärenten Zellstrukturen gesehen werden (Bild 4). Die Zellen lagen, im Unterschied zu den Gewebezellen, nicht als Acini vor, sondern einzeln. Es variierte bei den einzelnen Kühen um den vierten bis fünften Tag, bis die ersten Zellen an der Kulturflasche hafteten und nach 16 Tagen (Bild 5) wuchsen die so entstandenen Zellinseln langsam zusammen, bis sie nach ca. 21 Tagen das erste Mal einen konfluenten Zellrasen ausbildeten.

Alle Zellen wuchsen in der Kulturflasche oder auf der Kulturplatte in einem Monolayer. Dieser war homogen und die Struktur der Zellen uniform. Das von Epithelzellen typische Aussehen wie Kopfsteinpflaster konnte festgesellt werden.
Die Zellen wurden zweimal passagiert bis sie in flüssigem Stickstoff kryokonserviert wurden. Bei Bedarf konnten dann die benötigten Zellen der verschiedenen Kühe wieder gleichzeitig aufgetaut werden. Nach der ersten Passage wiesen die Epithelzellen ein exponentielles Wachstum auf. Beim Trypsinieren unterschieden sich die Zellen ebenfalls je nach ihrem Ursprung. Die Zellen aus der Milch lösten sich meist schneller von den Kulturgefäßen ab, als die Gewebezellen.

### 4.1.2 Immunohistochemie:

Die Zellen wurden auf kollagenbeschichtete Objektträger gegeben und die Cytokeratine immunohistologisch angefärbt. Bei den Zellen aus dem Gewebe wurden ca. 90 % der Zellen als Epithelzellen bestimmt. Bei den Zellen, die aus der Milch isoliert wurden lag der Wert bei fast 100%. Außerdem wurde auch der CD11a Antikörper angefärbt, um auszuschließen, dass Blutzellen wie Lymphozyten, Granulozyten, Monozyten und Makrophagen in den Zellkulturen enthalten sind, da diese stark auf die Behandlung mit den Erregern reagieren würden. Als Positivkontrolle wurde Rinderblut benutzt. Es konnten keine Blutzellen in den Epithelzellkulturen nachgewiesen werden.

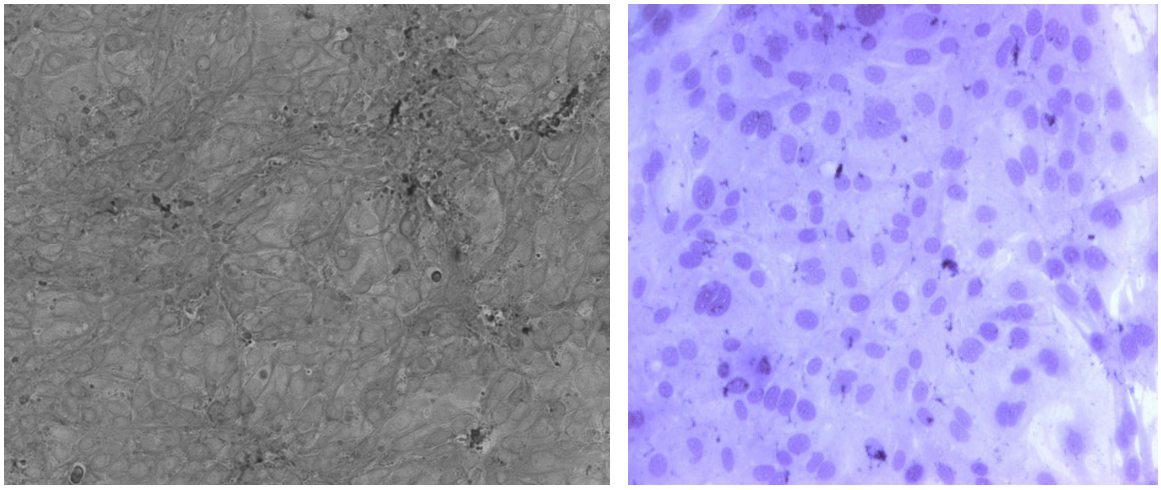

**Bild 9: Immunohistochemische Färbung der Euterepithelzellen aus der Milch auf Cytokeratine (links, clone MNF 116, DaKo Cytomation) mit Negativkontrolle (rechts)**

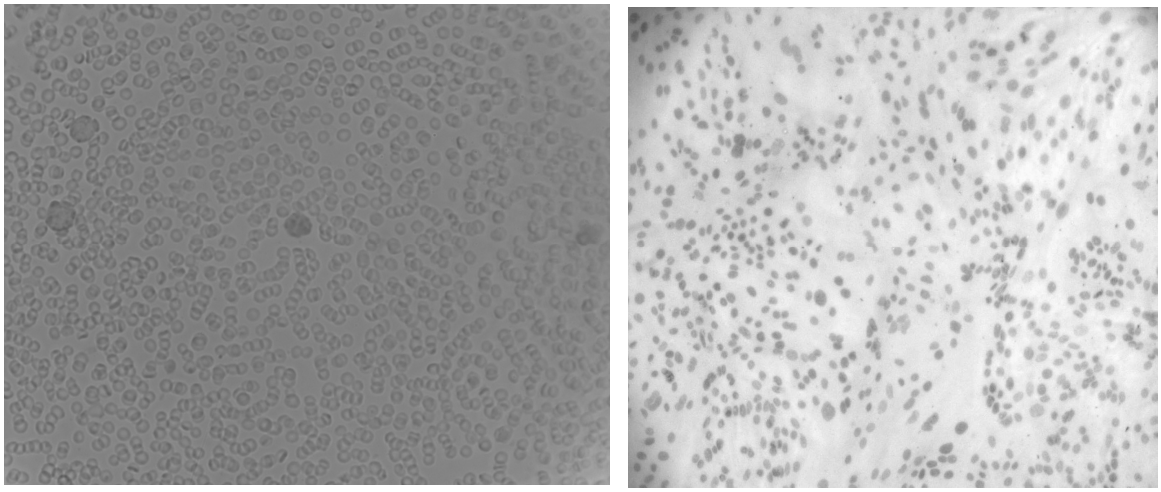

**Bild 10: Immunohistochemische Färbung CD11a, Positivkontrolle Rinderblut (links) und Euterepithelzellkultur aus Milch (rechts)**

### 4.1.3 quantitative RT-PCR mit CD45

Auf den für hämatopoetische Zellen spezifischer Antikörper CD45 wurden Primer designed, von MWG Biotech AG (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert und diese mittels q RT-PCR an der Bovinen Euterepithelzellen-RNA getestet. Als positive Kontrolle diente RNA, isoliert aus Rinderblut. Bei der Auswertung konnte CD45 in Epithelzellen nicht nachgewiesen werden, wohingegen CD45 mRNA im Blut nachgewiesen werden konnte.

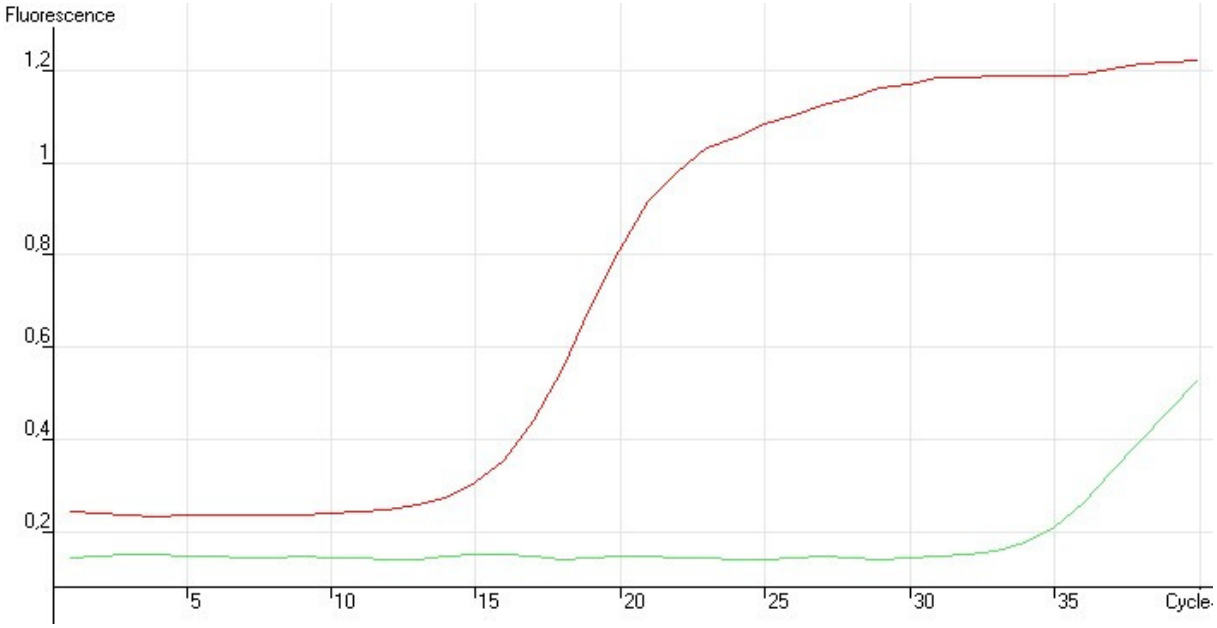


**Abb. 4: PCR Amplifikationskurve für CD45 mit Rinderblut RNA (rot) und RNA aus bovinen Euterepithelzellen (grün)**

Auch bei der Schmelzkurvenanalyse der Rotor Gene™-Software konnte nur eine Schmelzkurve für die Blut RNA dargestellt werden.

### 4.1.4 Bakterien

#### 4.1.4.1 Wachstumskurven *E.coli*

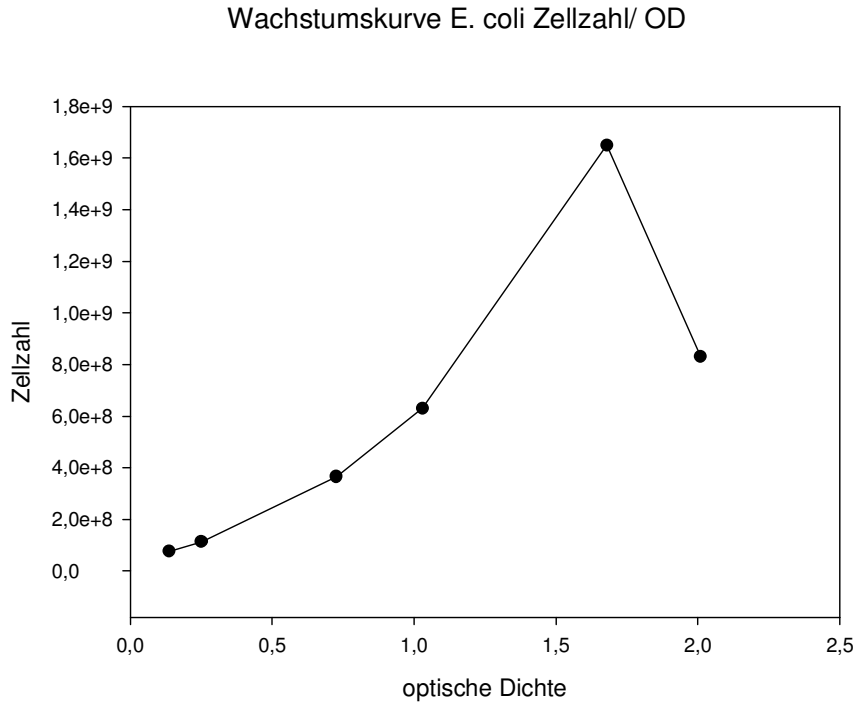


**Abb 5: Wachstumskurve von *E.coli*, Zellzahl und optische Dichte**

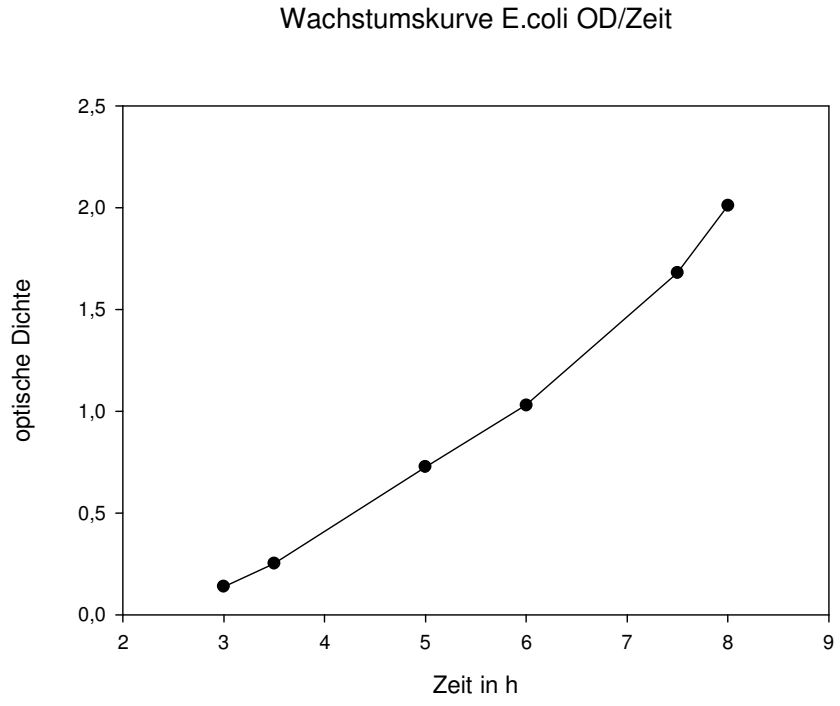


**Abb 6 : Wachstumskurve von *E.coli*, optische Dichte und Zeit**

### 4.1.4.2 Wachstumskurven *S.aureus*

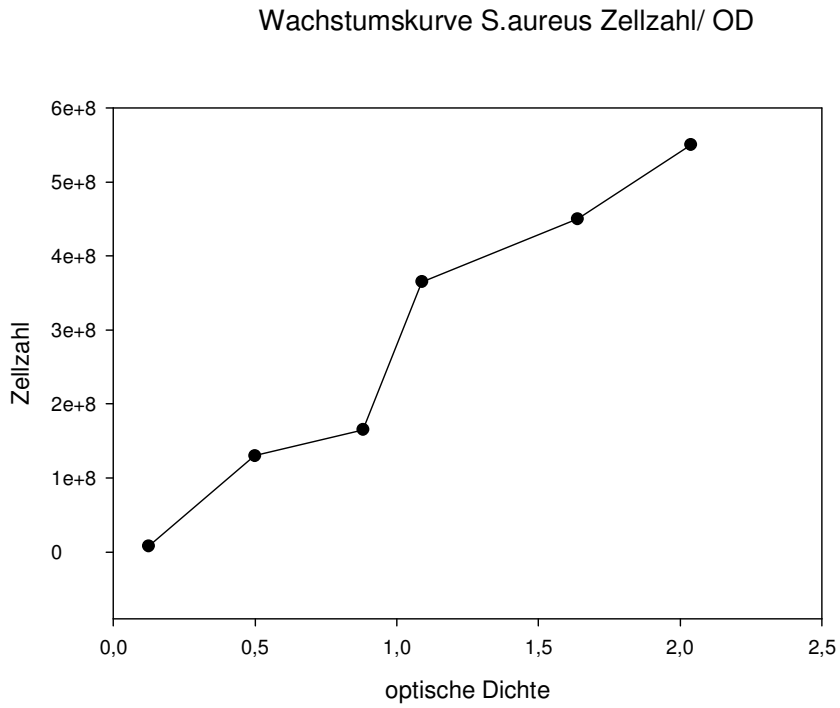


**Abb 7.: Wachstumskurve *S.aureus*, Zellzahl und optische Dichte**

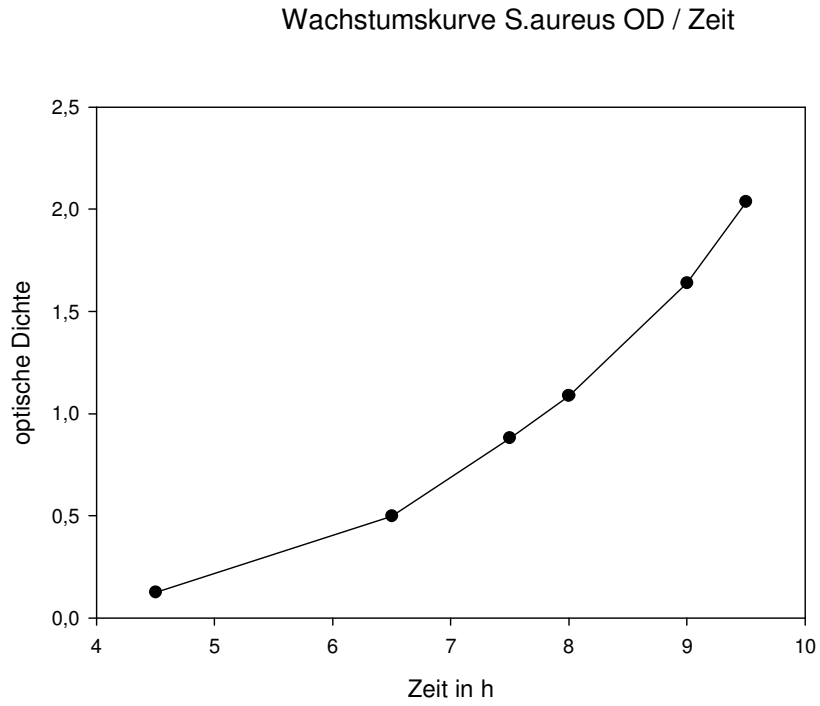


**Abb. 8: Wachstumskurve *S.aureus*, optische Dichte und Zeit**

### 4.1.4.3 Wachstumskurven *Str.uberis*

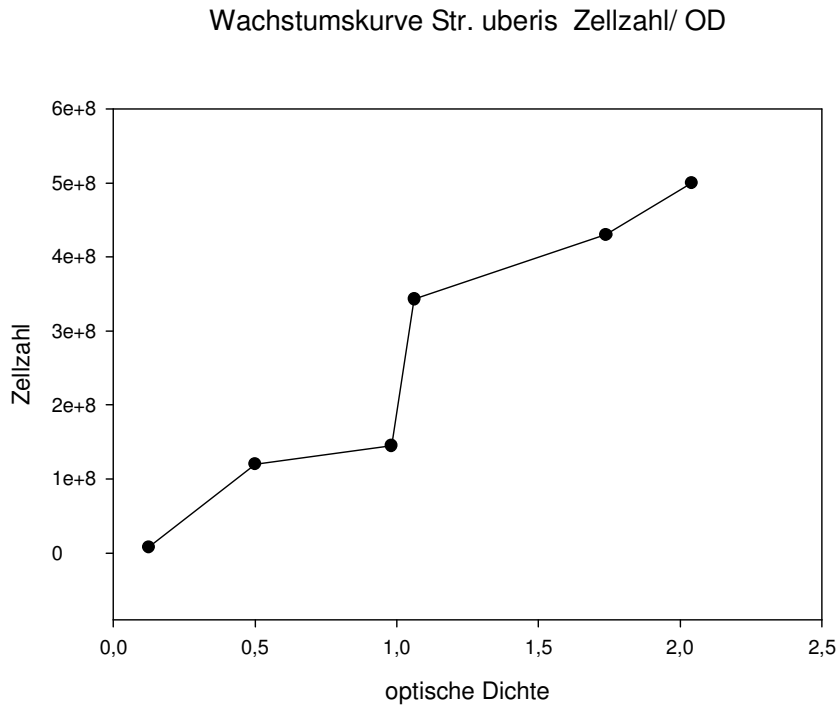


**Abb 9.: Wachstumskurve *Str.uberis*, Zellzahl und optische Dichte**

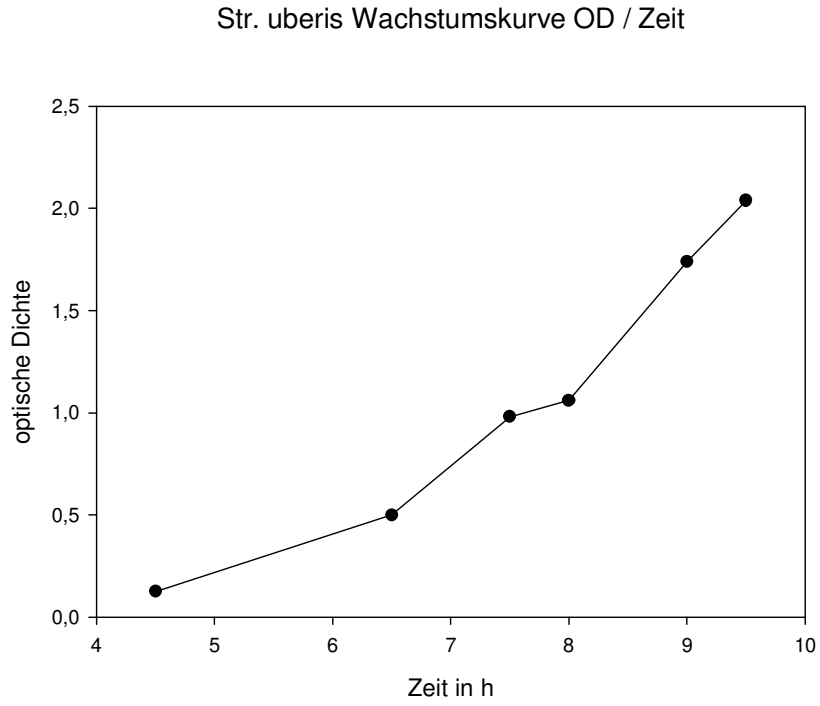


**Abb 10.: Wachstumskurve *Str.uberis*, optische Dichte und Zeit**

### 4.1.4.4 Wachstumskurven *koagulase negative Staphylokokken*

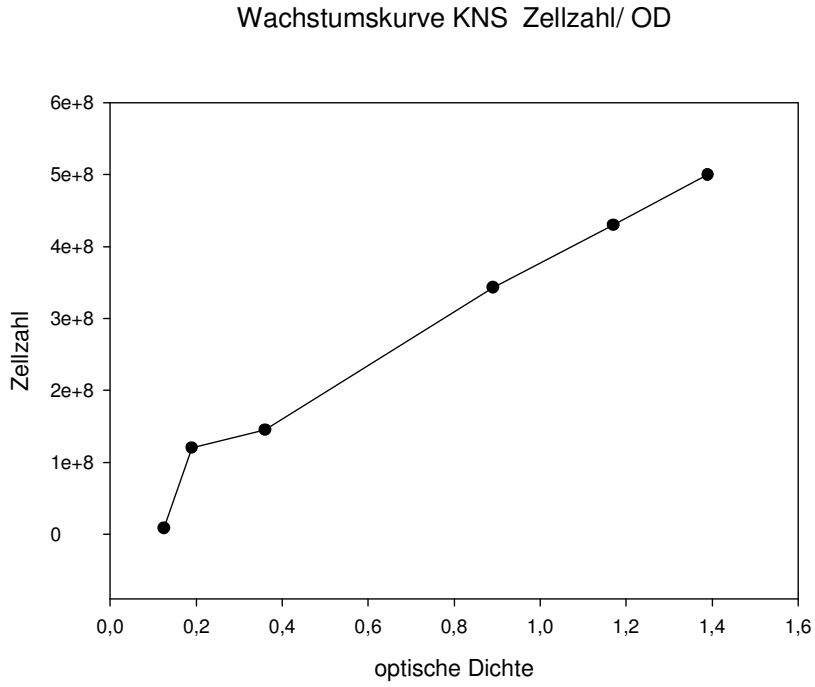


**Abb 11.: Wachstumskurve *KNS*, Zellzahl und optische Dichte**

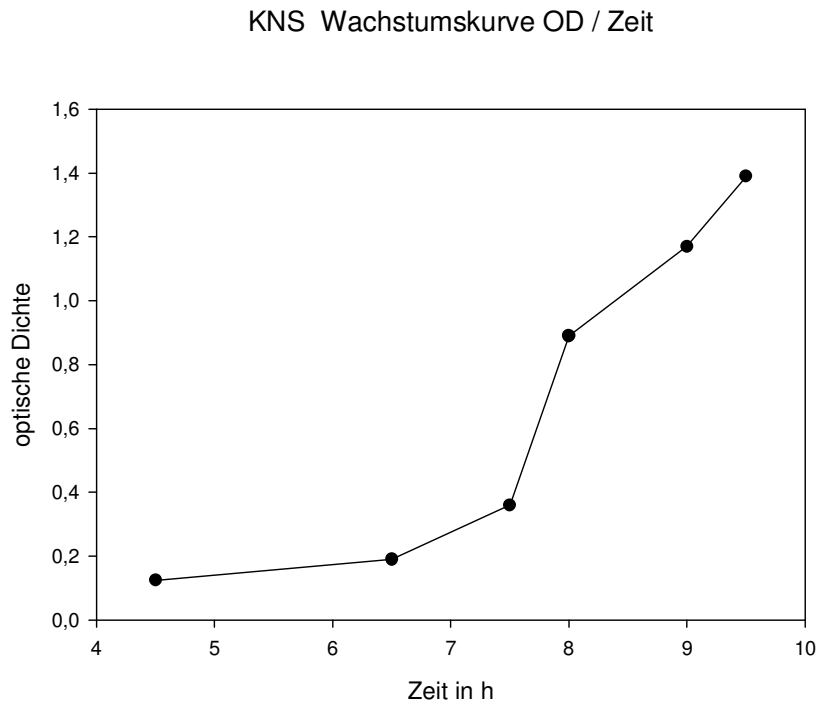


**Abb 12.: Wachstumskurve *KNS*, optische Dichte und Zeit**

Für die Wachstumskurven der Bakterien wurden nach jeweils einer halben Stunde 100 µl aus der Bakteriensuspension herausgenommen und bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen. Dies wurde solange fortgeführt, bis eine OD von mindestens 2 erreicht war. Bei jedem Messpunkt wurden die Bakterien im Plattenverdünnungsverfahren auf Blutagarplatten gegeben und am nächsten Morgen die Kolonien ausgezählt. So konnte die OD graphisch in Relation mit der Bakterienzahl und der Wachstumszeit gesetzt werden. Bei den weiteren Bakterienanzüchtungen konnten die entsprechenden Werte einfach aus den Wachstumskurven abgelesen werden.

## 4.2 Versuche

### 4.2.1 Behandlung der bovinen Epithelzellen mit Lipopolysaccharid, Lipoteichonsäure und Peptidoglykanen

Zunächst wurden Versuche nur mit den Zellmembranbestandteilen der Erreger durchgeführt. Dazu wurden die Zellmembranbestandteile der gram-positiven (*S.aureus*, *Str.uberis*) und gram-negativen Bakterien (*E.coli*), LTA und PGN, sowie LPS direkt in verschiedenen Konzentrationen in das Medium gegeben und mit den Immunreaktionen der hitzeinaktivierten Erregern verglichen. Die Versuche wurden im Doppelansatz mit Zellen einer Kuh durchgeführt. Die dargestellten Werte sind Durchschnittswerte des Doppelansatzes.
Die Behandlungen mit verschiedenen Konzentrationen von LTA und LPS zeigten im Vergleich zu Behandlungen mit den Bakterien (in einer Konzentration von jeweils 10 MOI) nach 24 h für die IL-6 mRNA Expression, dass die Bakterien stärkere Reaktionen hervorriefen, als ihre einzelnen Zellwandbestandteile.

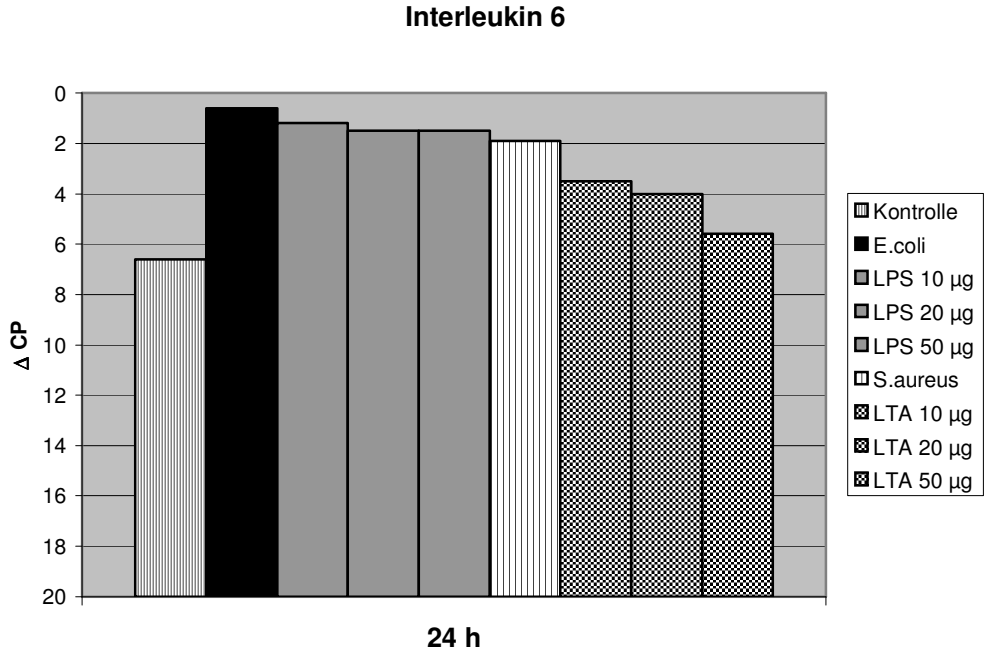


**Abb. 13: Expression der IL-6 mRNA nach Behandlungen mit *E.coli*, LPS, *S.aureus* und LTA in verschiedenen Konzentrationen für 24 h**

Anschließend wurden die Zellen von einer Kuh im Doppelansatz mit *S.aureus* (10 MOI), LTA und PGN sowie LTA und PGN gemeinsam in verschiedenen Konzentrationen über 6 h behandelt

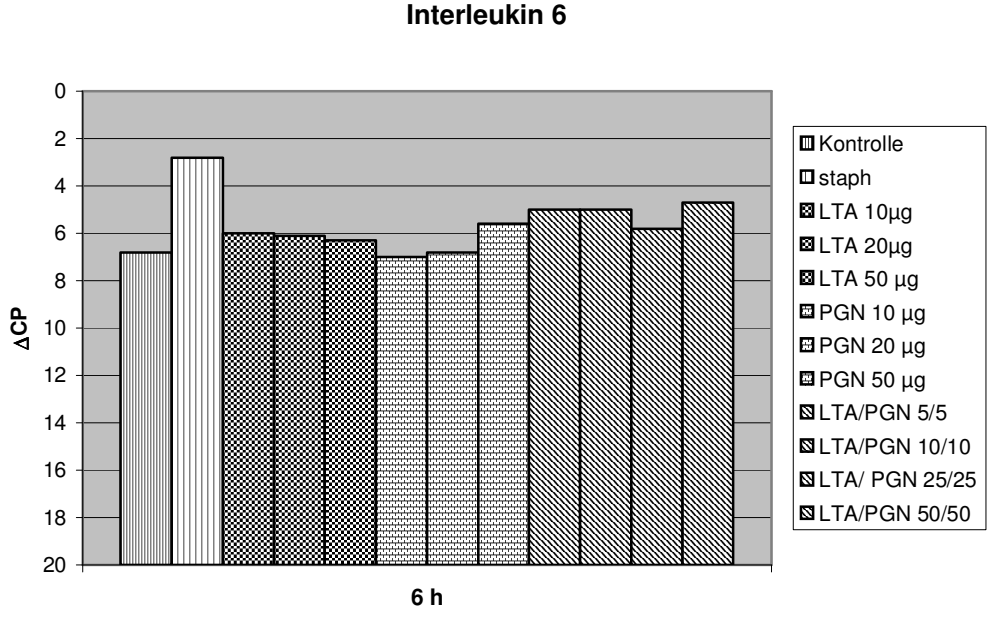


**Abb. 14: Expression der IL-6 mRNA nach Behandlungen mit *S.aureus*, LTA und PGN, sowie LTA/PGN in Kombination in verschiedenen Konzentrationen für 6 h**

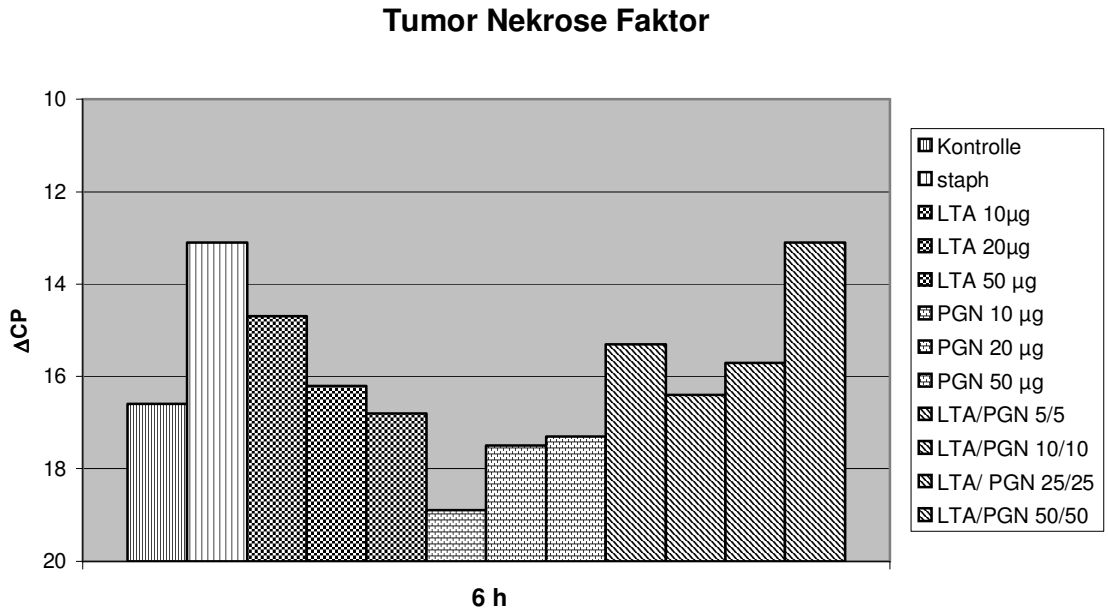


**Abb. 15: Expression der TNF mRNA nach Behandlungen mit *S.aureus*, LTA und PGN, sowie LTA/PGN in Kombination in verschiedenen Konzentrationen für 6 h**

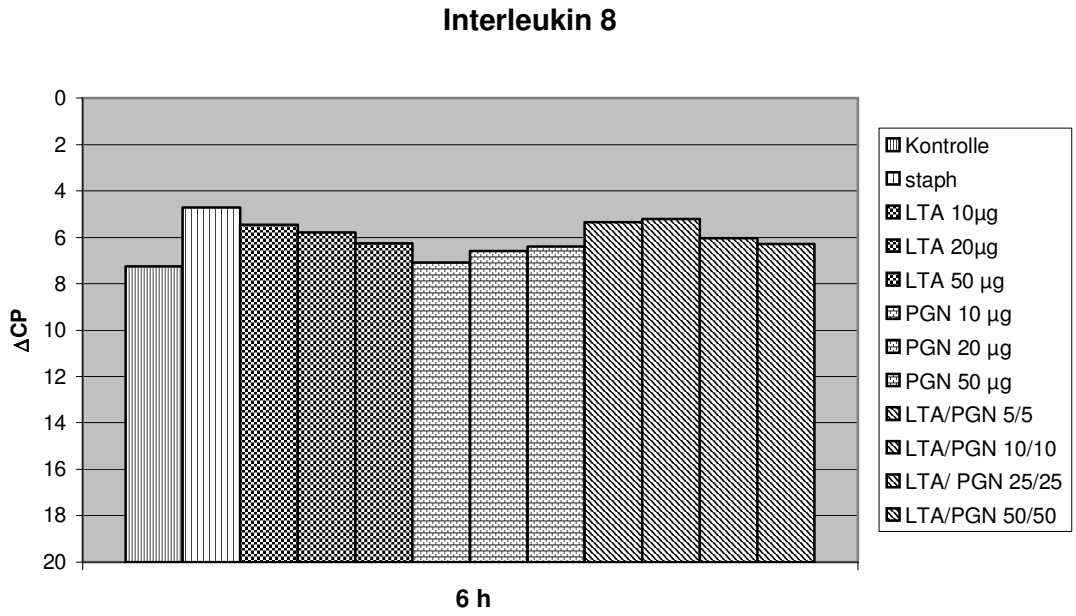


**Abb. 16: Expression der IL-8 mRNA nach Behandlungen mit *S.aureus*, LTA und PGN, sowie LTA/PGN in Kombination in verschiedenen Konzentrationen für 6 h**

Auch bei diesem Versuch reagierten die hitzeinaktivierten *S.aureus* behandelten stärker, als die Zellmembranbestandteile LTA und PGN behandelten Zellen.
Alle weiteren Versuche wurden mit den inaktivierten Bakterien durchgeführt.

### 4.2.2 Vergleich der TNF alpha mRNA-Expression von bovinen Epithelzellen aus der Milch mit denen aus dem Gewebe

Ein Vergleich der Zellen, die aus der Milch isoliert wurden mit denen, die aus dem Gewebe gewonnen wurden, zeigte dass es nach einer Behandlung mit *E.coli* für 3 h keine großen Unterschiede in der mRNA-Expression für den Tumor Nekrose Faktor alpha gab.
Alle weiteren Versuche wurden mit Euterepithelzellen, die aus der Milch stammten fortgeführt.

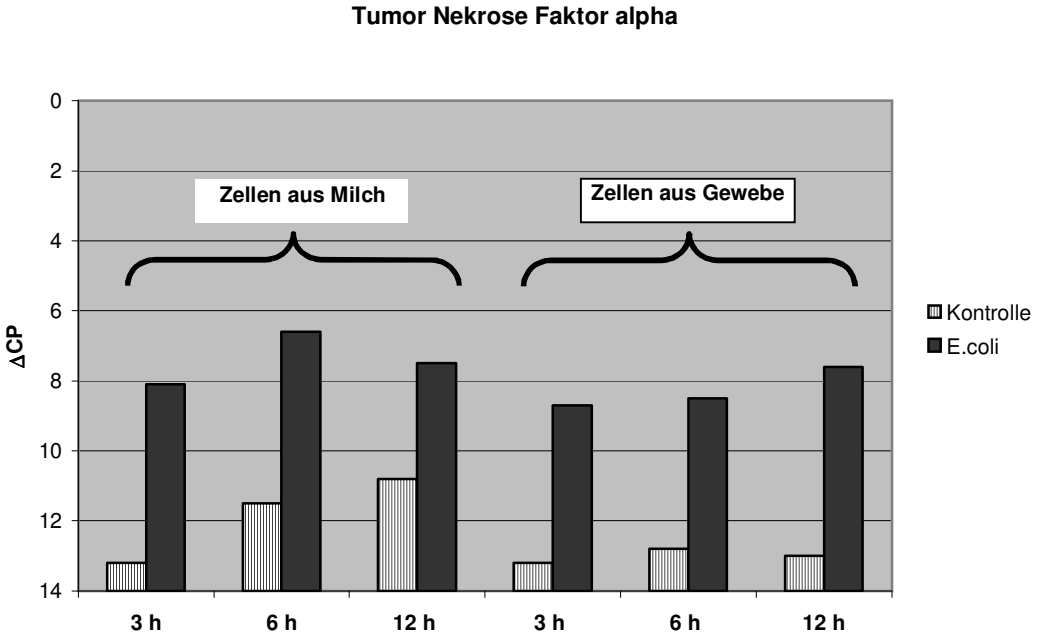


**Abb. 17: Vergleich der TNF mRNA-Expression von bovinen Epithelzellen aus der Milch und aus dem Gewebe nach Behandlung mit *E.coli* für 3 h (n=1)**

### 4.2.3 Toll like Rezeptoren 2 und 4

Zum Nachweis der TLR2 und 4 wurden die Zellen einer Kuh mit 10 µg LPS und 10 MOI *S.aureus* über einen Zeitraum von 6 h und 24 h behandelt. Alle Proben, sowohl die behandelten, als auch die Negativkontrollen wiesen die genannten TLR auf. Eine typische Schmelzkurve stellte sich in der Software des Rotor-Gene™ dar.

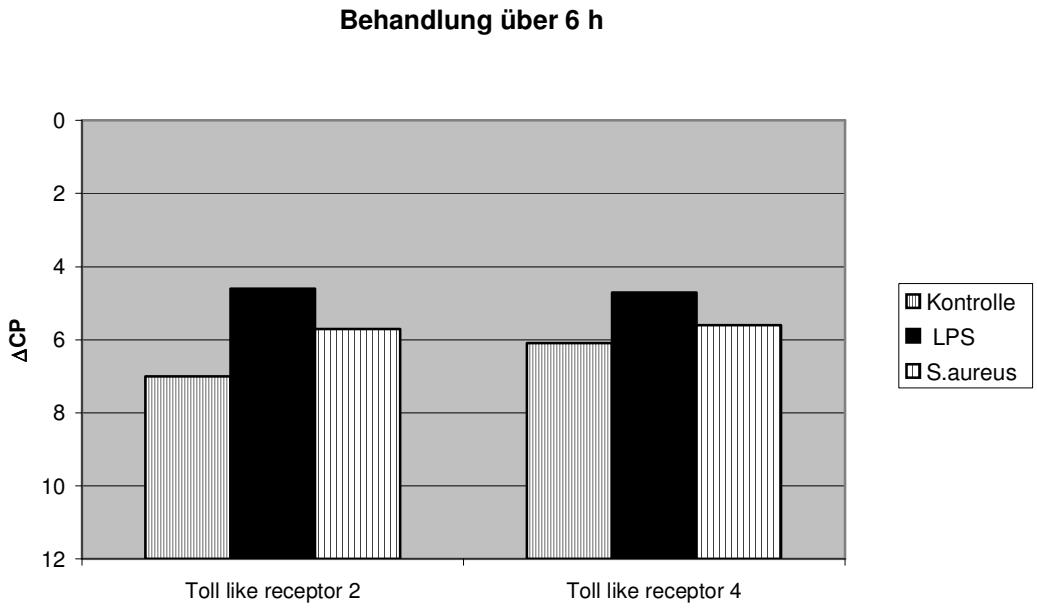


**Abb. 18: Expression der TLR2- und TLR4 mRNA nach 6 h bei einer Behandlung mit LPS und *S.aureus* (n=1)**

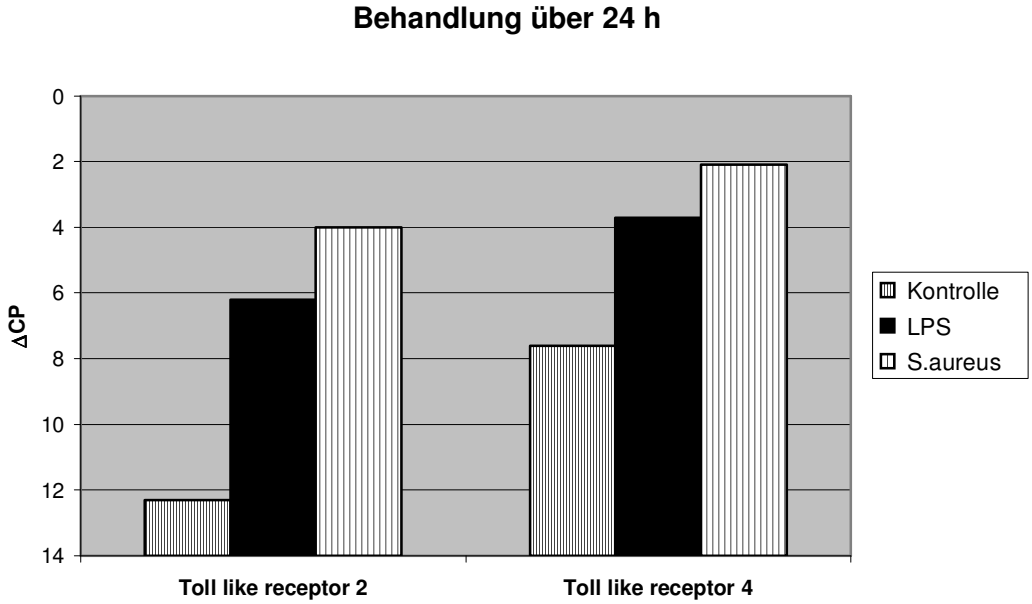


**Abb. 19: Expression der TLR2- und TLR4 mRNA nach 24 h bei einer Behandlung mit LPS und *S.aureus* (n=1)**

### 4.2.4 Vergleich der durch Hitze inaktivierten und durch die French Press inaktivierten Bakterien

Es wurde auch verglichen, ob mit Bakterien die mit der French Press inaktiviert wurden, oder aber mit hitzeinaktivierten Bakterien fortgeführt werden sollten. Bei Versuchen, die mit Bakterien aus der French Press behandelt wurden, war es immer nötig, dem Medium Antibiotika zuzufügen, da ansonsten vereinzelt Bakterien überlebten. Diese überwucherten nach einigen Stunden die Kultur und brauchten die Nährstoffe für die Zellen auf. Ein Versuch zum Vergleich der beiden Methoden zeigte, dass es Unterschiede bei French Press (FP) -inaktivierten und hitzinaktivierten (HI) Bakterien gab. Die Reaktion der hitzeinaktivierten Bakterien war meist etwas stärker, als die durch die French Press inaktivierten. Dazu wurden die Zellen einer Kuh (MZ-5) in einer six-well Platte mit Bakterien (*E.coli* und *Str.uberis*), die auf die beiden verschiedenen Arten inaktiviert wurden, für 3 h behandelt und die mRNA-Konzentration für IL-6, IL-8 und TNF gemessen. Dabei reagierten die mit hitzeinaktivierten Bakterien behandelten Zellen tendenziell stärker in ihrer mRNA-Expression für die oben genannten Zytokine. Der Hauptteil der Versuche wurden dann mit hitzeinaktivierten Bakterien durchgeführt, ohne das dem Medium Antibiotika zugefügt wurde.

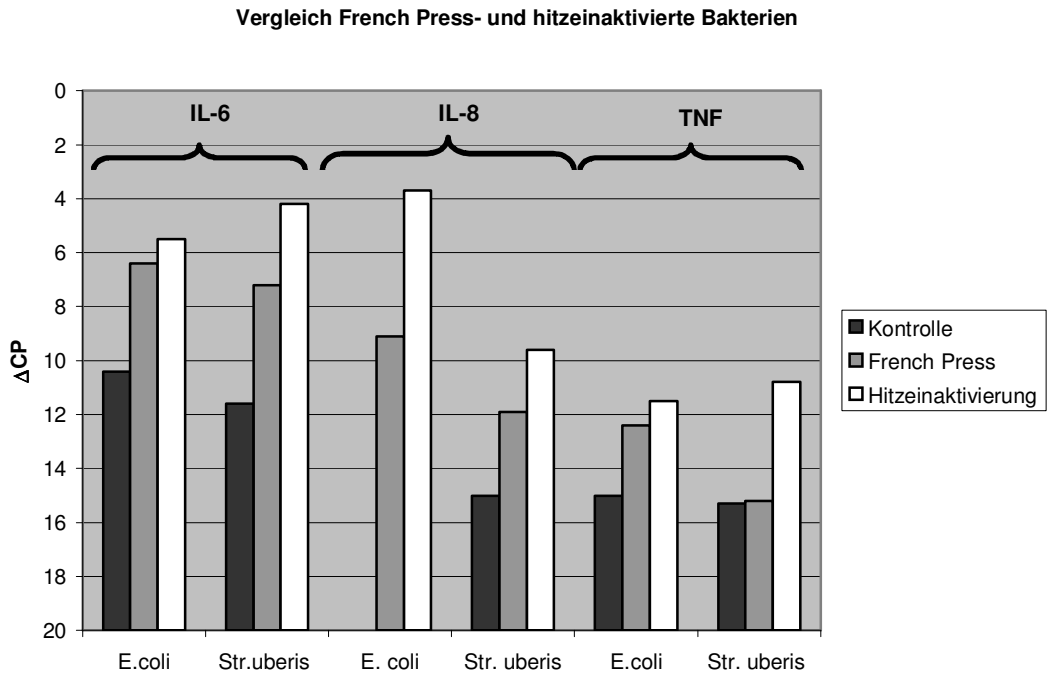


**Abb. 20: mRNA-Konzentration von IL-6, IL-8 und TNF für bovine Epithelzellen (MZ-5), die mit hitzeinaktivierten und durch die French Press inaktivierten Bakterien für 3 h behandelt wurden (n=1)**

### 4.2.4 mRNA-Expression der bovinen Epithelzellen für IL-8 und TNF bei Behandlungen mit verschiedenen MOI

Es wurde auch ermittelt, wie viele Bakterien pro Zelle (MOI = multiplicity of infection) eine Reaktion in der mRNA-Expression der verschiedenen Zytokine, Chemokine und Akut-Phase Proteine hervorruft. Dazu wurden die Zellen in der fünften Passage mit den inaktivierten Erregern *E.coli*, *S.aureus* und *Str.uberis* behandelt. Dies geschah immer bei Zellen von mindestens drei Kühen gleichzeitig, aber getrennt voneinander. Es stellte sich heraus, dass schon eine Behandlung der Zellen mit 0,5 MOI, signifikante Unterschiede in der mRNA-Expression von TNF für die Erreger *E.coli* und *S.aureus* ergaben. Die IL-8 mRNA-Expression war bei Behandlung mit 0,5 MOI *E.coli* signifikant erhöht. Für *Str.uberis* hingegen wurden nach Behandlungen mit 10 MOI signifikante Unterschiede gemessen.

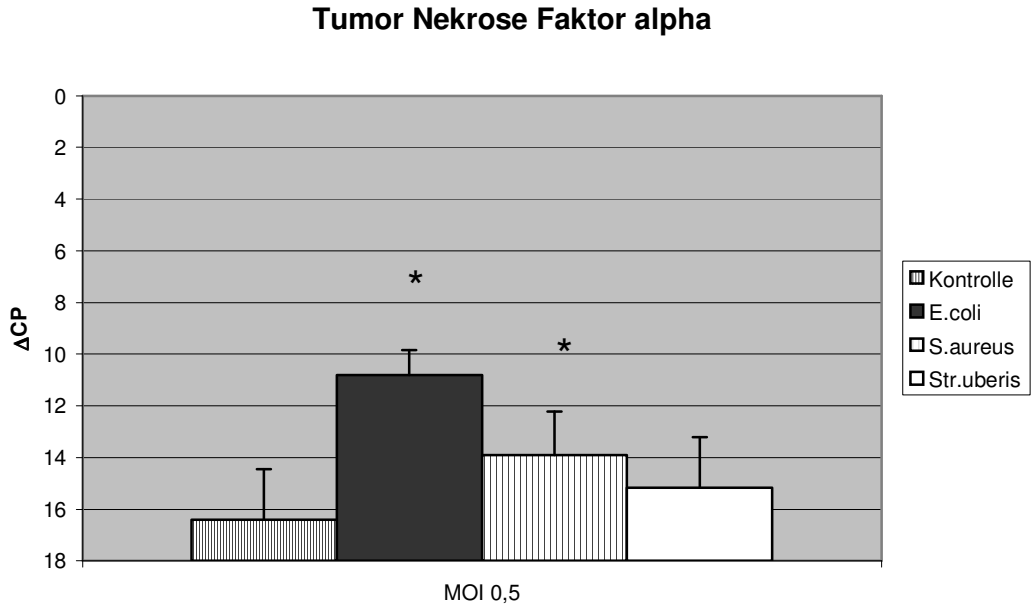


**Abb. 21: qRT-PCR für TNF mRNA-Expression nach einer Behandlung mit 0,5 MOI von hitzeinaktivierten *E.coli*, *S.aureus* und *Str.uberis* für 90 min (n=3)**

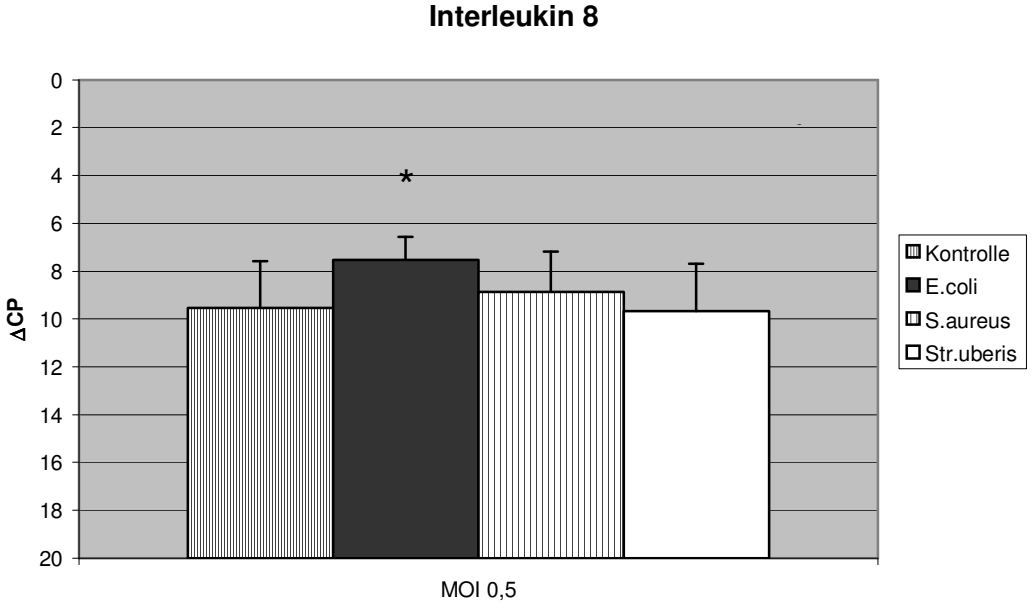


**Abb 22: qRT-PCR für IL-8 mRNA-Expression nach einer Behandlung mit 0,5 MOI von hitzeinaktivierten *E.coli*, *S.aureus* und *Str.uberis* für 90 min (n=3)**

Außerdem wurden die Zellen verschiedenen MOI für 90 min ausgesetzt, um zu sehen, inwieweit dies die Reaktion der Zellen verändert. Dabei stellte sich kein großer Unterschied bei der Immunantwort der Zellen für IL-8 und TNF heraus, egal ob man die Zellen einer Konzentration von 0.5, 5 oder 10 MOI

aussetzt. Allerdings reagierten die mit *Str.uberis* behandelten Zellen in diesem Versuch nicht signifikant für diese Immunmodulatoren.

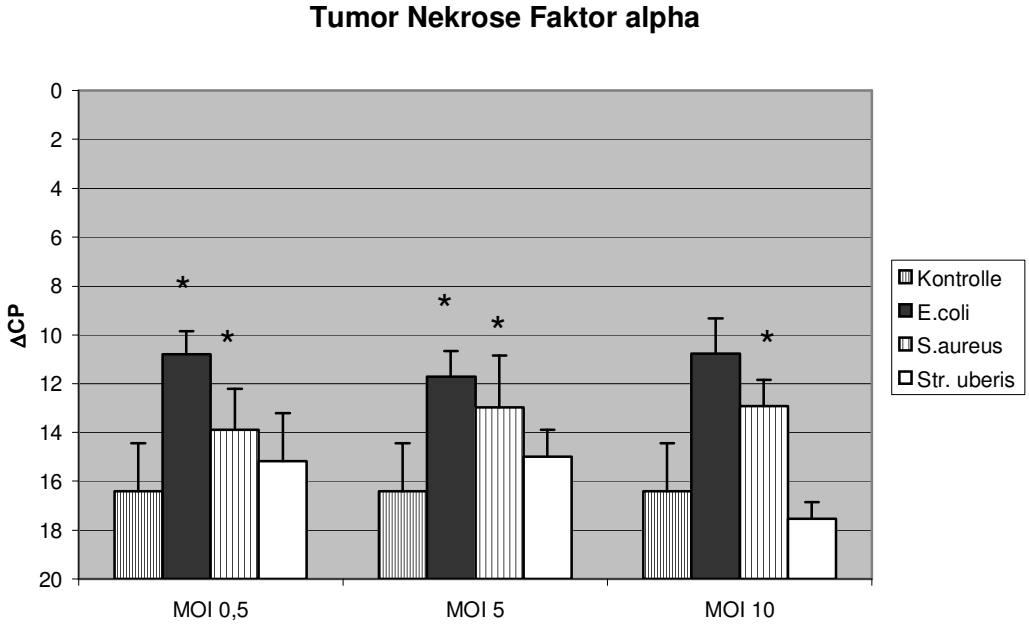


**Abb. 23: mRNA-Expression für TNF bei Behandlungen mit 0.5; 5 und 10 MOI von *E.coli*, *S.aureus* und *Str.uberis* über 90 min (n=3)**

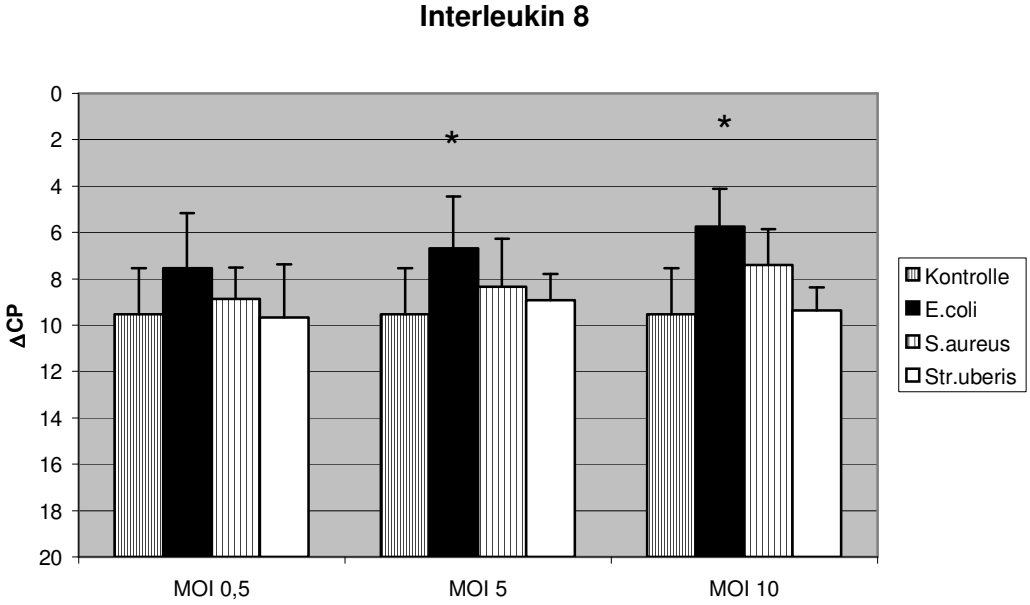


**Abb. 24: mRNA-Expression für IL-8 bei Behandlungen mit 0,5; 5 und 10 MOI von *E.coli, S.aureus* und *Str.uberis* über 90 min (n=3)**

**Tabelle 3: mRNA Expression (ΔCP) von TNF bei Epithelzellen von vier Kühen nach einer Behandlung mit verschiedenen MOI hitzeinaktivierter *E.coli* oder *S.aureus* für 3 h**

| Zielgen | Behandlung | Kontrolle | 0.5 MOI | 2.5 MOI | 5 MOI | 10 MOI | 50 MOI |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| TNF-α | E.coli | 28.8±1.4 | 24.5±3.6 | 27.1±1.0 | 22.5±2.4 | 21.9±5.1 | 25.9±5.8 |
| | S.aureus | 26.8±2.4 | 27.1±3.1 | 28.6±3.8 | 27.0±2.2 | 29.7±2.8 | 26.4±2.6 |
| IL-6 | E.coli | 24.9±5.8 | 17.5±1.3 | 12.2±0.4 | 19.6±6.9 | 16.3±3.2 | 15.4±3.6 |
| | S.aureus | 21.8±5.1 | 20.6±6.3 | 16.1±2.5 | 18.5±3.5 | 19.0±6.8 | 13.0±0.4 |

Aufgrund des Ergebnisses dieser Versuche wurden alle weiteren mit einer definierten Menge an Bakterien durchgeführt. Da die Unterschiede zwischen 5 und 50 MOI für die gemessenen Immunmodulatoren nicht sehr groß waren, wurden die Zellen bei allen folgenden Zeitreihen mit 10 MOI behandelt.

### 4.2.5: mRNA-Expression der bovinen Epithelzellen für verschiedene Zytokine, Chemokine und Akut-Phase Proteine über verschiedene Zeiträume

#### 4.2.5.1: Behandlung über 30, 60 und 90 Minuten

Weiterhin wurden Versuche über verschiedene Zeiträume gemacht. Zunächst ein Versuch bei dem die Zellen von vier Kühen (MZ-1 bis MZ-4) mit den drei verschiedenen Bakterien über 30, 60 und 90 min behandelt wurden. Dabei konnten bereits nach 30 min bei einer Behandlung mit *E.coli*, signifikante Erhöhungen der IL-8 und GM-CSF mRNA-Konzentration gemessen werden. Nach 60 min konnten Signifikanzen bei *Str.uberis*

behandelten Zellen für die IL-8 und GM-CSF mRNA-Konzentrationen festgestellt werden. Bei allen anderen Behandlungen konnten keine signifikanten Unterschiede vermerkt werden. Auffällig waren die relativ hohen Standardabweichungen.

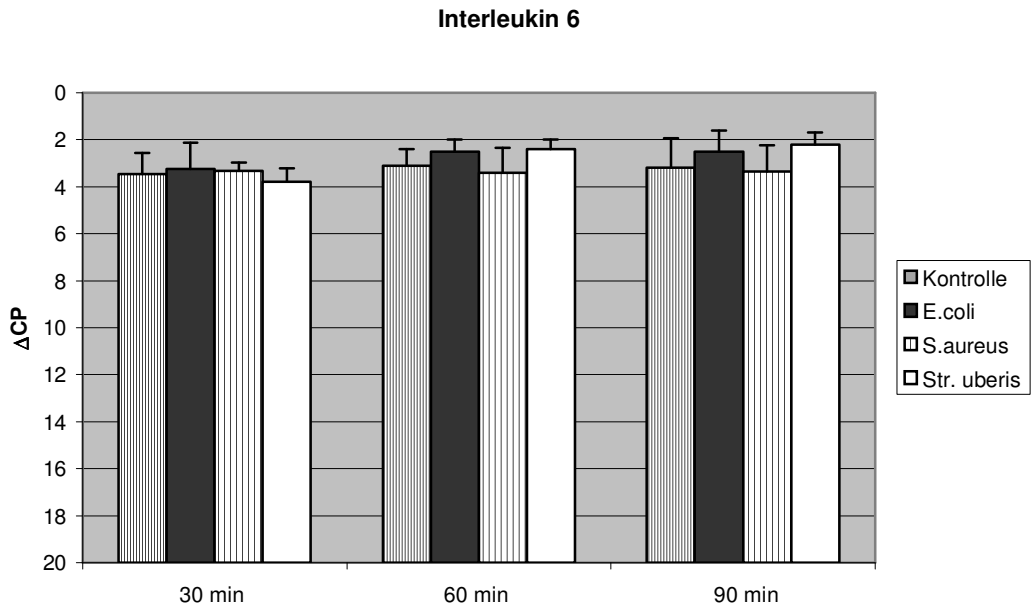


**Abb. 25: mRNA-Expression für IL-6 bei einer Behandlung mit 10 MOI *E.coli, S.aureus* und *Str.uberis* über 30, 60 und 90 min (n=3)**

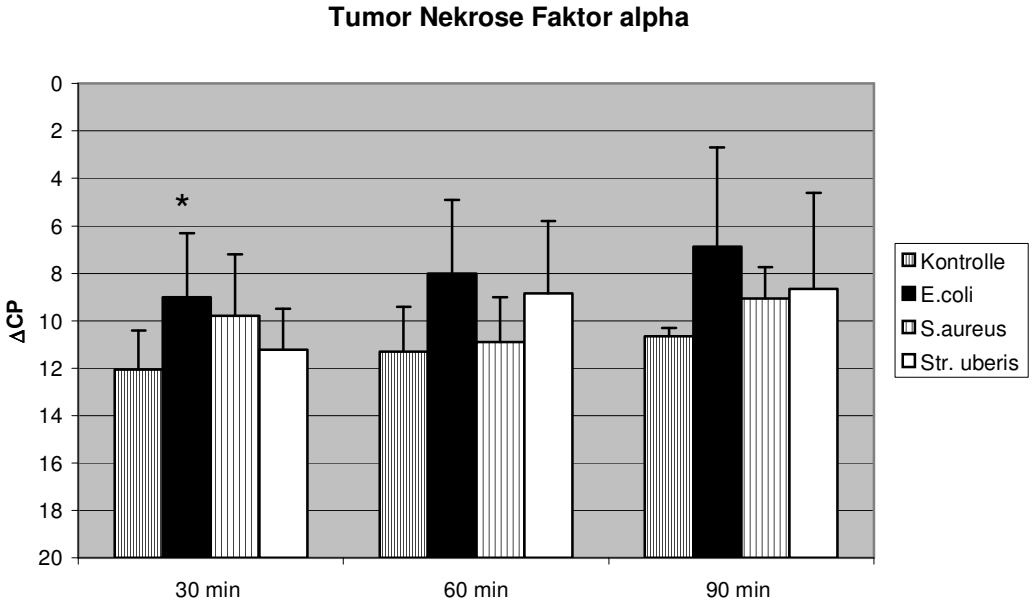


**Abb. 26: mRNA-Expression für TNF bei einer Behandlung mit 10 MOI *E.coli, S.aureus* und *Str.uberis* über 30, 60 und 90 min (n=3)**

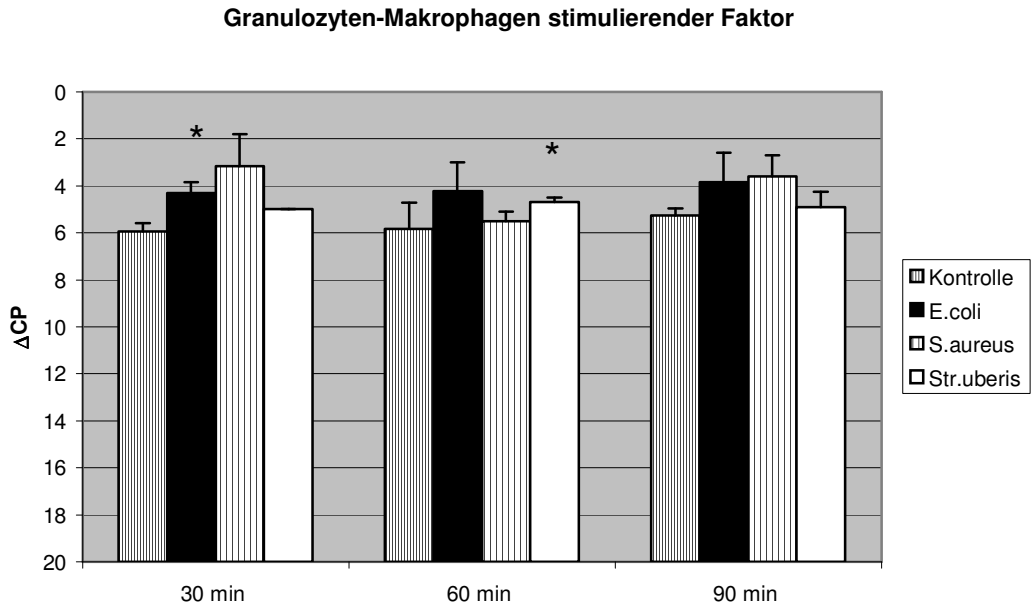


**Abb. 27: mRNA-Expression für GM-CSF bei einer Behandlung mit 10 MOI *E.coli, S.aureus* und *Str.uberis* über 30, 60 und 90 min (n=3)**

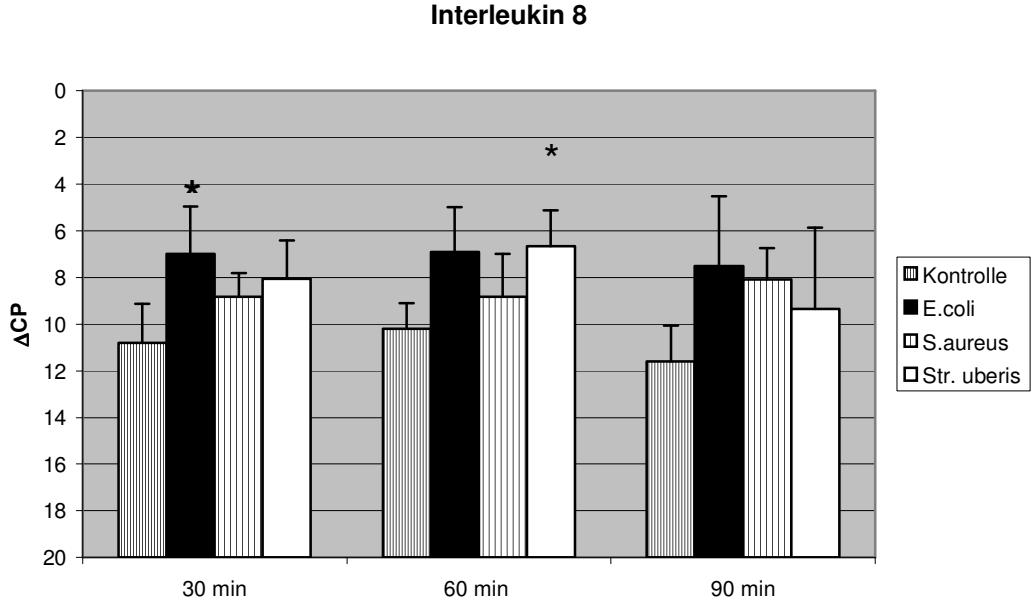


**Abb. 28: mRNA-Expression für IL-8 bei einer Behandlung mit 10 MOI *E.coli, S.aureus* und *Str.uberis* über 30, 60 und 90 min (n=3)**

### 4.2.5.2: Behandlung über 1, 6 und 24 Stunden

Um mittelfristige Reaktionen zu testen wurden Zellen von sechs Kühen (MZ-1,2,3,5,6,7) über 60 min, 6 h und 24 h mit *E.coli*, *S.aureus* und *Str.uberis* behandelt. Der Versuch wurde doppelt angesetzt und die Mittelwerte zur Bewertung herangezogen. Behandlungen mit *E.coli* führten schneller zu signifikanten Anstiegen der IL-6, IL-8 und TNF mRNA-Expression. Bei IL-6 nach 6 h und 24 h. Bei IL-8 schon nach einer Stunde, aber auch noch nach 6 h und 24 h. Die TNF mRNA-Konzentration war nach 6 h und 24 h signifikant erhöht. Jedoch wurde bei allen Immunmodulatoren kein signifikanter Unterschied zu *S.aureus* gemessen. Die SAA mRNA –Expression war nach 24 h nur bei letzterem Erreger signifikant erhöht. Aber es kam im Vergleich zwischen *S.aureus* behandelten Zellen und der Kontrolle bei IL-6 nach 6 h und 24 h zu signifikanten Erhöhungen der mRNA-Expression. Ebenso waren die mRNA-Konzentrationen auch bei IL-8 und TNF nach sowohl 6 h, als auch nach 24 h signifikant erhöht. Die Behandlung mit *Str.uberis* rief eine geringere Immunantwort hervor. Ein signifikanter Unterschied konnte nur nach 6 h für die IL-8 mRNA-Konzentration gemessen werden.

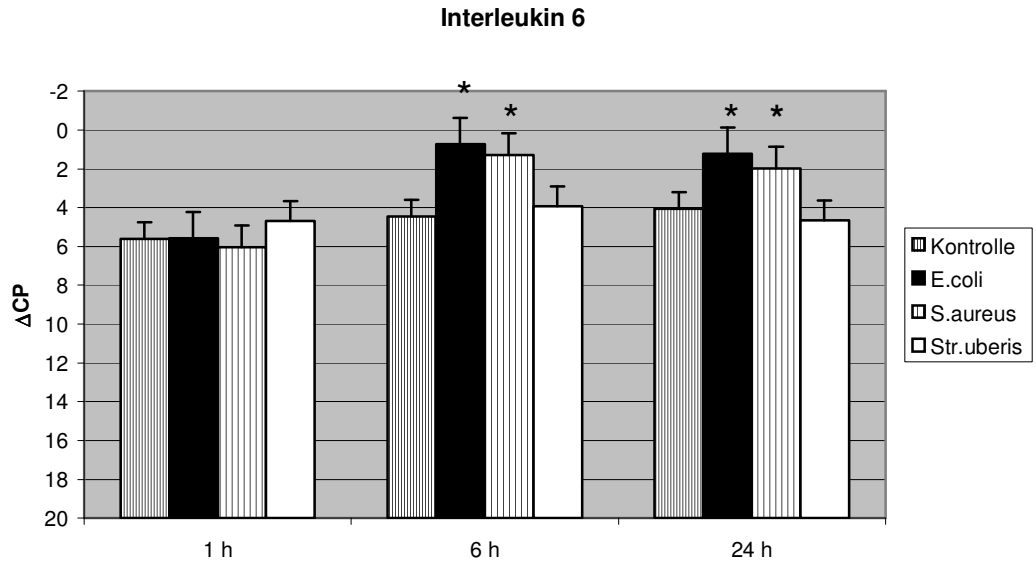


**Abb. 29: mRNA-Expression für IL-6 bei einer Behandlung mit 10 MOI von hitzinaktivierten *E.coli*, *S.aureus* und *Str.uberis* über 1,6 und 24 h (n=6)**

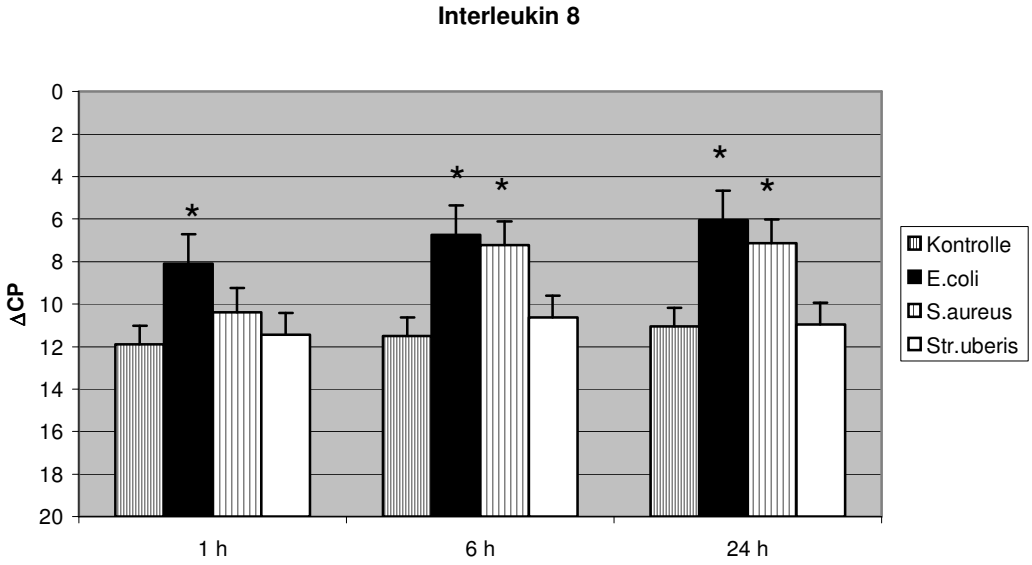


**Abb. 30: mRNA-Expression für IL-8 bei einer Behandlung mit 10 MOI von hitzinaktivierten *E.coli, S.aureus* und *Str.uberis* über 1,6 und 24 h (n=6)**

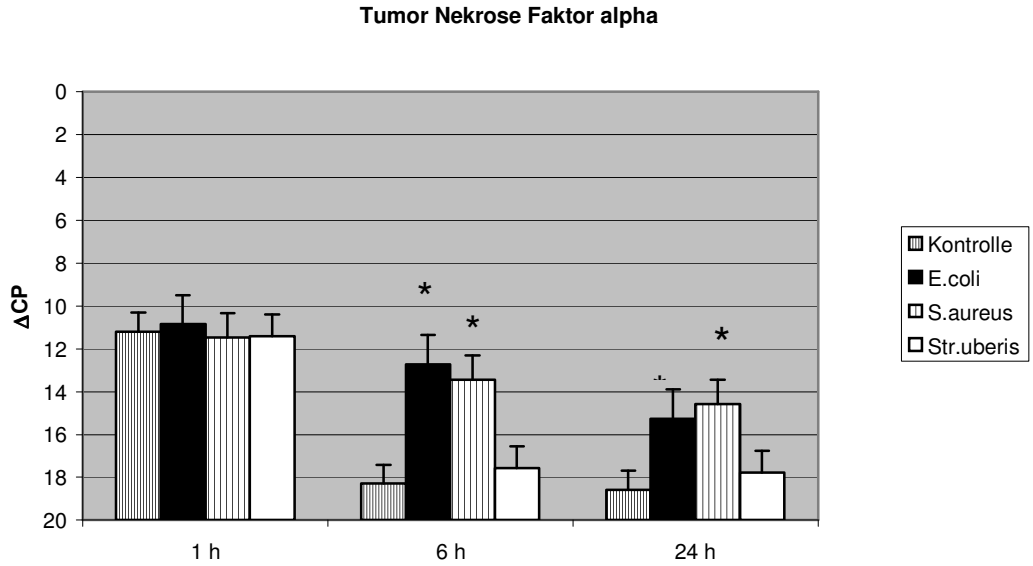


**Abb. 31: mRNA-Expression für TNF bei einer Behandlung mit 10 MOI von hitzinaktivierten *E.coli, S.aureus* und *Str.uberis* über 1,6 und 24 h (n=6)**

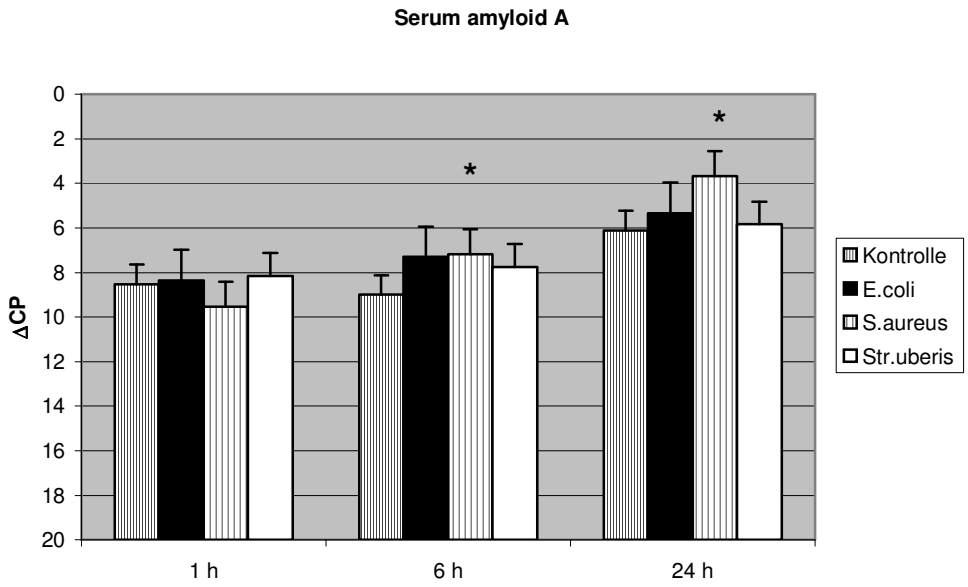


**Abb. 32: mRNA-Expression für SAA bei einer Behandlung mit 10 MOI von hitzinaktivierten *E.coli*, *S.aureus* und *Str.uberis* über 1,6 und 24 h (n=6)**

### 4.2.5.3: Behandlung über 3, 6 und 12 Stunden

In einem weiteren Versuch wurden die Zellen von vier Kühen (MZ-1 – MZ-4) mit *E.coli* und *S.aureus*, die durch die French Press inaktiviert wurden, behandelt. Dem Medium wurden auch während dieses Versuchs Antibiotika und Antimykotika zugesetzt.

Die Behandlung erfolgte mit 10 MOI über 3, 6 und 12 h.

Nach 3, 6 und 12 h war die mRNA Expression der Epithelzellen für den Tumor Nekrose Faktor alpha bei einer Behandlung mit *E.coli* signifikant angestiegen. Nach Behandlung mit *S.aureus* dauerte es 12 h, bis eine signifikanter Anstieg der mRNA – Konzentration gemessen werden konnte.

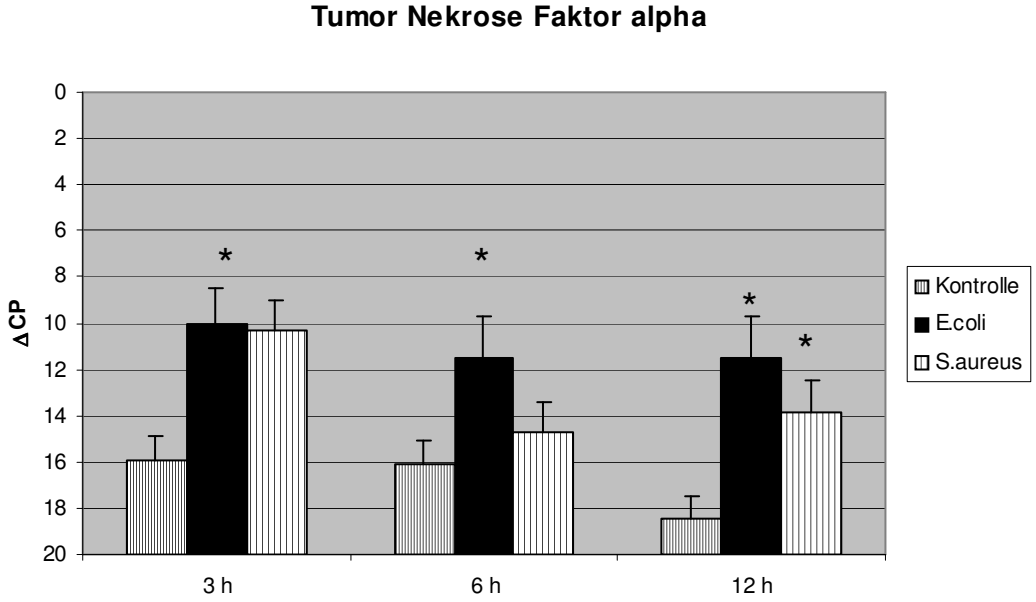


**Abb. 33: mRNA Expression von TNF nach Behandlung mit *E.coli* und *S.aureus* (10 MOI) über 3, 6 und 12 h**

### 4.2.5.4 Behandlung der bovinen Epithelzellen mit koagulase negativen Staphylokokken

Des weiteren wurden Versuche mit hitzeinaktivierten koagulase negativen Staphylokokken gemacht. Die Behandlung erfolgte über einen Zeitraum von 6 h mit verschiedenen Konzentrationen der Bakterien (5,10 und 50 MOI). Die Messung der mRNA-Expression von sowohl IL-6 und IL-8 ergab bei einer Exposition mit 50 MOI einen signifikanten Unterschied verglichen mit den nicht behandelten Kontrollzellen. Die Konzentrationen an mRNA bei 5 und 10 MOI zeigten keine Unterschiede zu den Kontrollen. Die TNF mRNA-Konzentration stieg nach 6 h bei keiner der drei Konzentrationen signifikant an.

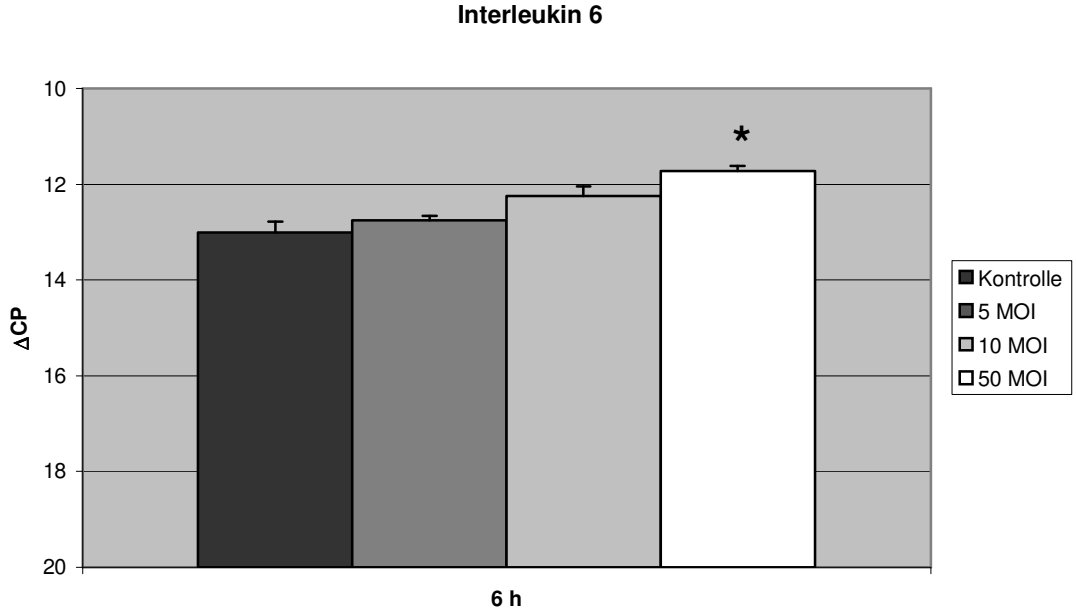


**Abb. 34: mRNA-Expression von IL-6 nach 6 h bei einer Behandlung mit 5,10 und 50 MOI hitzeinaktivierter koagulase negativer Staphylokokken (n=4)**

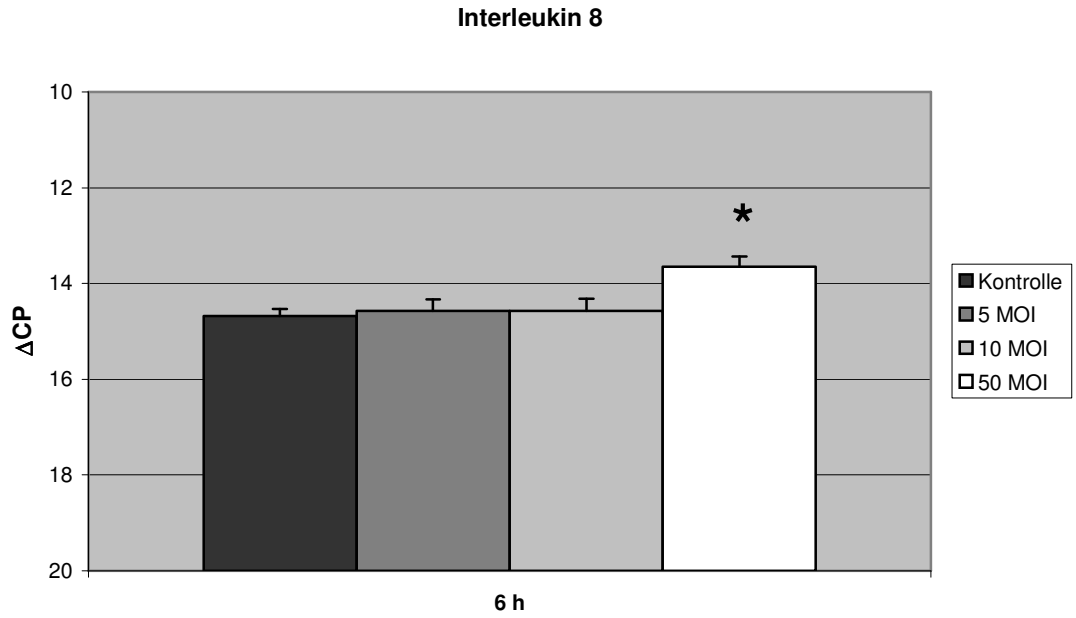


**Abb. 35: mRNA-Expression von IL-8 nach 6 h bei einer Behandlung mit 5,10 und 50 MOI hitzeinaktivierter koagulase negativer Staphylokokken (n=4)**

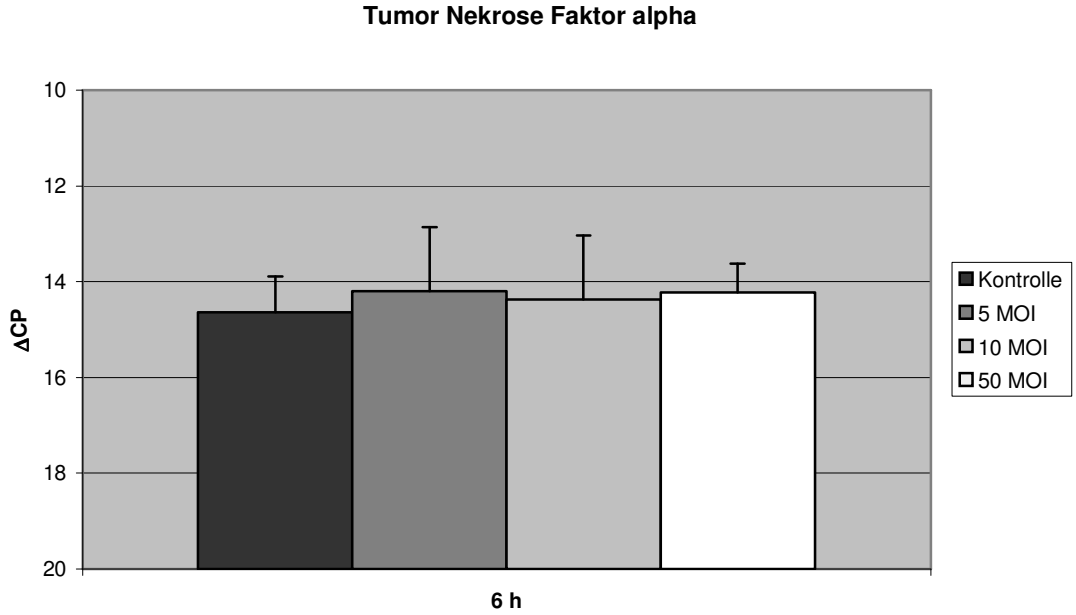


**Abb. 36: mRNA-Expression von TNF nach 6 h bei einer Behandlung mit 5,10 und 50 MOI hitzeinaktivierter koagulase negativer Staphylokokken (n=4)**

## 4.3 Euterepithelzellen aus Ziegenmilch

### 4.3.1 Morphologie und Wachstumsverhalten

Die aus Ziegenmilch gewonnenen Euterepithelzellen entsprachen sowohl in ihrem Wachstumsverhalten als auch in ihrer Morphologie in etwa denen aus Kuhmilch. Die Zellen wuchsen nach zwei bis drei Tagen am Boden der Kulturflaschen an und bildeten Inseln, die nach ca. zwei Wochen zusammen wuchsen und einen Zellrasen im Monolayer bildeten. Der Monolayer war ebenfalls homogen und die Struktur der Zellen uniform. Das von Epithelzellen typische Aussehen wie Kopfsteinpflaster konnte festgesellt werden.
Die Zellen wurden auch zweimal passagiert bis sie in flüssigem Stickstoff kryokonserviert wurden. Bei Bedarf konnten die benötigten Zellen der verschiedenen Ziegen wieder gleichzeitig aufgetaut und kultiviert werden.

### 4.3.2 qRT-PCR für CD45

Wie bei den bovinen Euterepithelzellen wurde auch bei den caprinen Euterepithelzellen eine qRT-PCR mit den CD45 Primern durchgeführt. Als positive Kontrolle wurde hier caprine Blut RNA benutzt.
Eine CD45 mRNA-Expression konnte nur im caprinen Blut nachgewiesen werden, nicht aber in der Epithelzellkultur RNA.

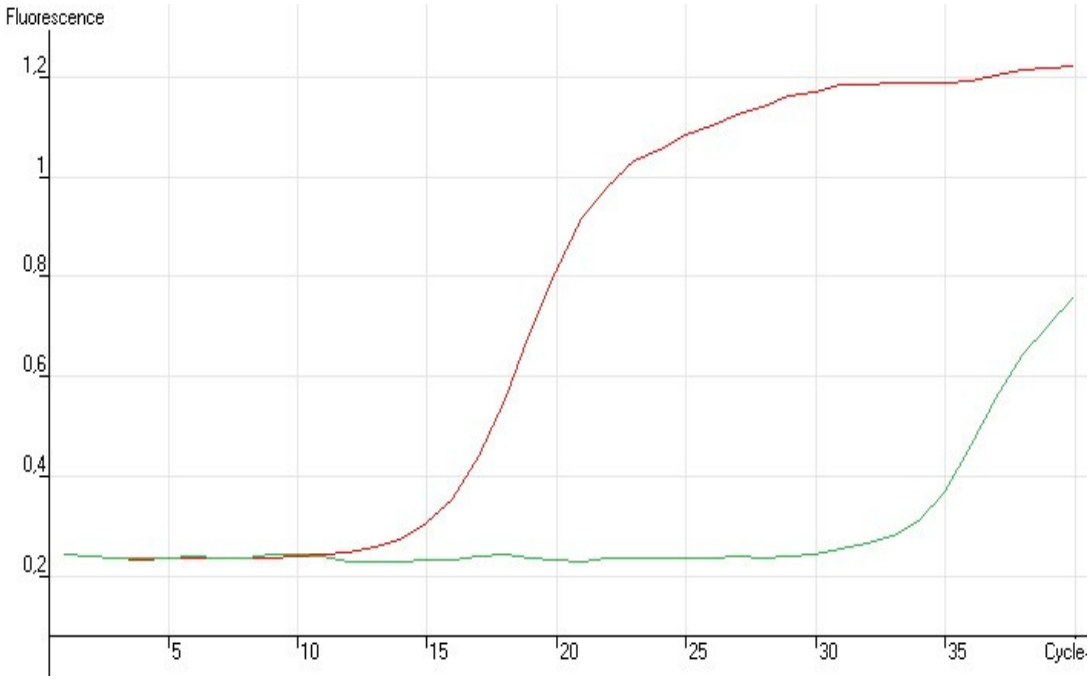


**Abb. 37: PCR-Amplifikationskurve für CD45 in capriner Blut RNA (rot) und in capriner Euterepithelzellkultur RNA (grün)**

Auch bei der Schmelzkurvenanalyse konnte nur eine Schmelzkurve für die Blut RNA dargestellt werden.

### 4.3.3 Toll like Rezeptoren 2 und 4

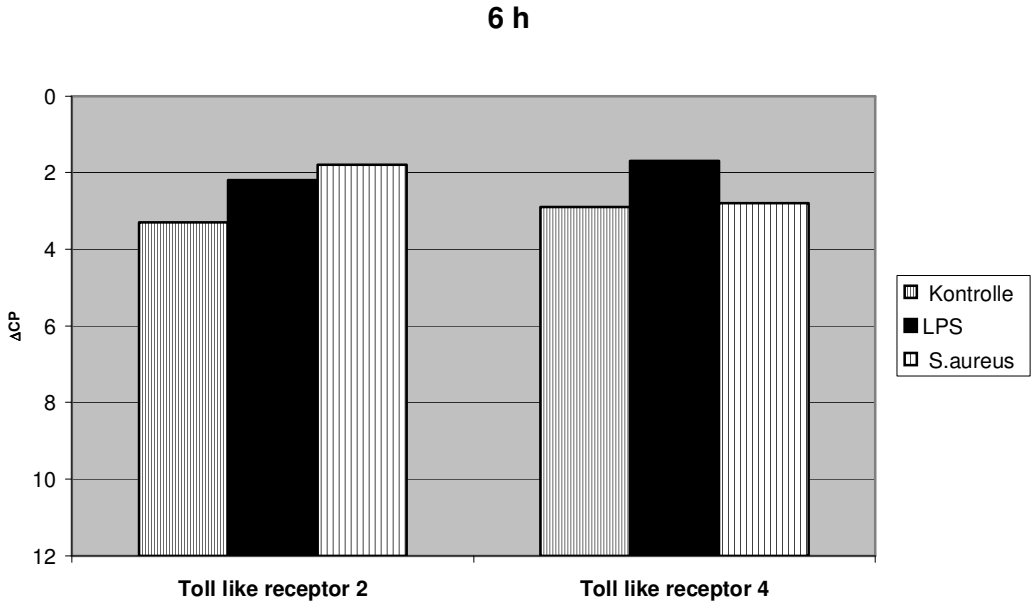


**Abb. 38: Expression der TLR2 und TLR4 mRNA nach 6 h bei einer Behandlung mit 10 µg LPS und 10 MOI *S.aureus***

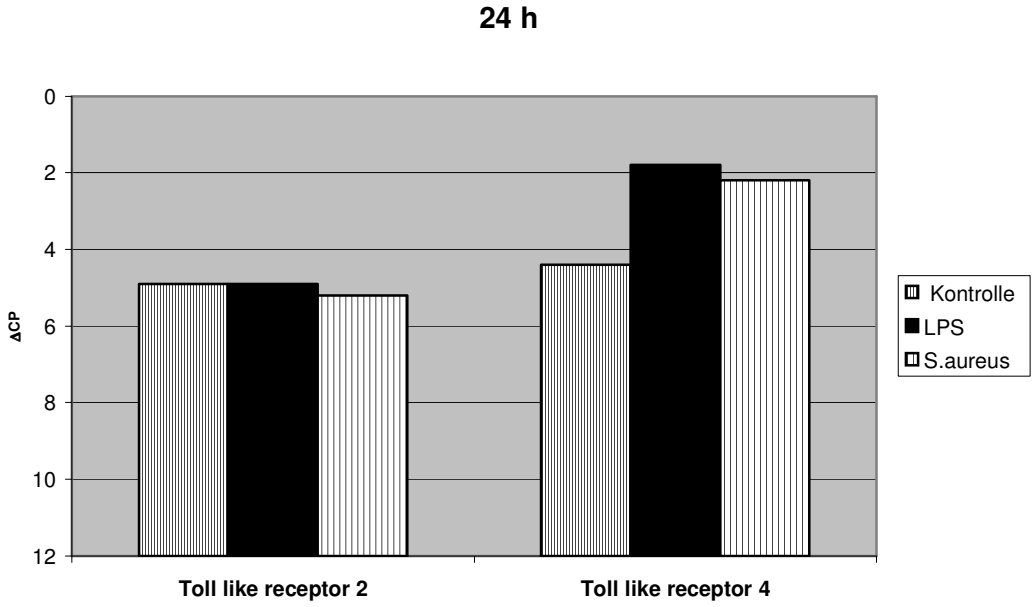


**Abb. 39: Expression der TLR2 und TLR4 mRNA nach 6 h bei einer Behandlung mit 10 µg LPS und 10 MOI *S.aureus***

Zum Nachweis der TLR2 und TLR4 wurden die Zellen einer Ziege mit 10 µg LPS und 10 MOI *S.aureus* über einen Zeitraum von 6 h und 24 h behandelt. Alle Proben, sowohl die behandelten, als auch die Negativkontrollen wiesen die genannten TLR auf. Eine typische Schmelzkurve stellte sich in der Software des Rotor-Gene™ dar.

### 4.3.4 Behandlung der caprinen Euterepithelzellen mit hitzeinaktivierten *S.aureus* und LPS

Um die Reaktion der caprinen Euterepithelzellen zu testen wurden Zellen von vier verschiedenen Ziegen behandelt. Als Erreger wurde der hitzeinaktivierte *S.aureus* Stamm verwendet, der auch bei den Versuchen mit Bovinen Euterepithelzellen zum Einsatz kam. Die Behandlung erfolgte über 3, 6 und 24 h. Danach wurde die Interleukin-8 und TNF mRNA-Expression gemessen. Die TNF mRNA-Konzentration stieg sowohl bei der Behandlung mit *S.aureus* als auch mit LPS signifikant nach einer Stunde an. Dieser Unterschied zur unbehandelten Kontrolle zeigte sich auch im weiteren Verlauf über 6 und 24 h.

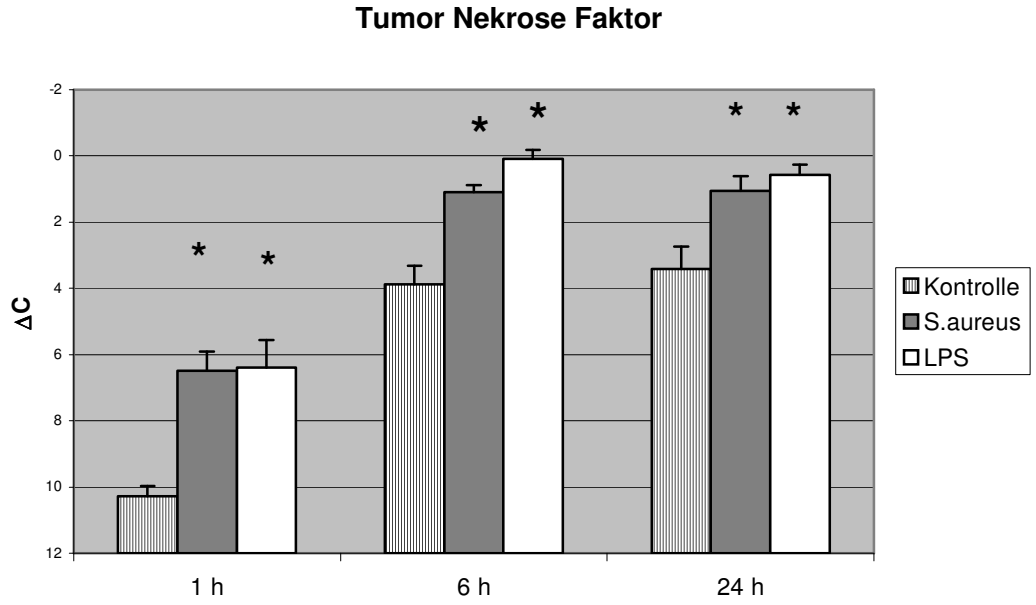


**Abb. 40: TNF mRNA-Expression nach einer Behandlung mit *S.aureus* und LPS für 1, 6 und 24 h**

Die Interleukin-8 mRNA-Konzentration stieg nach der LPS-Behandlung ebenfalls bereits nach einer Stunde signifikant an, war über 6 h auch noch erhöht, aber nach 24 h konnte kein signifikanter Unterschied mehr gemessen werden. Auf die Behandlung mit *S.aureus* reagierten die Zellen nach 6 h signifikant unterschiedlich. Nach einer und 6 h konnte kein signifikanter Unterschied bei der mRNA-Konzentration von IL-8 gemessen werden.

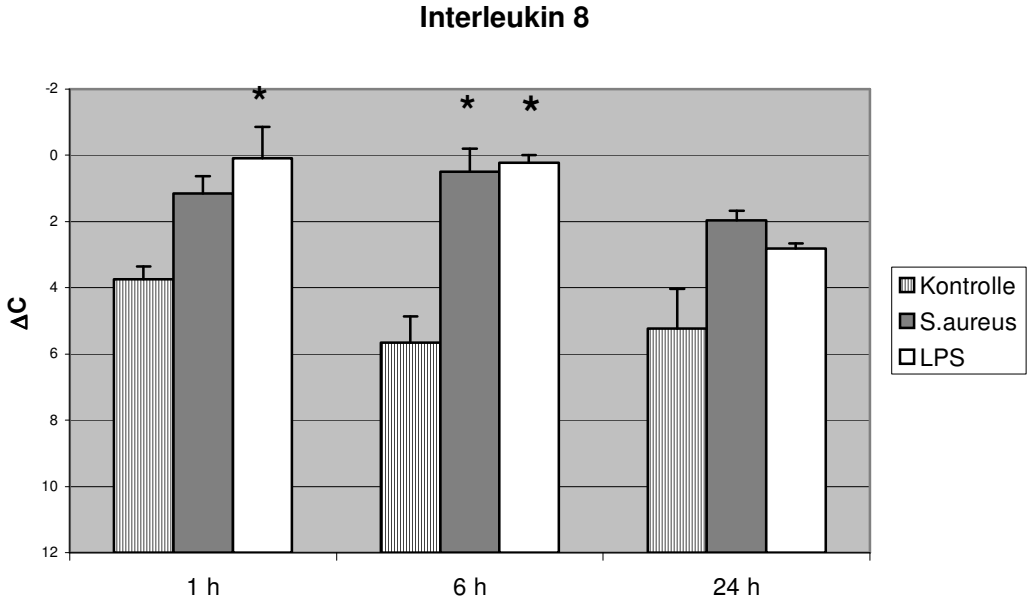


**Abb. 41: IL-8 mRNA-Expression nach einer Behandlung mit *S.aureus* und LPS über 1, 6 und 24 h**

# 5. Diskussion

## 5.1. Bovine Euterepithelzellen

Die frühe Erreger-Wirt-Interaktion spielt die entscheidende Rolle in der Immunantwort der Milchdrüse der Wiederkäuer. Zu zahlreichen Fragestellungen wurden innerhalb der letzten dreißig Jahre Euterinfektionsmodelle beim Rind eingesetzt.

Die Euterepithelzellen spielen eine äußerst wichtige Rolle in der anfänglichen Immunantwort des Euters um es gegen eindringende Pathogene zu schützen. Neben den aktivierten Leukozyten in der Milchdrüse (Prgomet *et al.* 2005) produzieren auch die Epithelzellen verschiedene Immunmodulatoren, die eine Antwort auf eine Infektion einleiten (Pareek *et al.* 2005). Die Methode der Kultivierung von primären bovinen Epithelzellkulturen aus dem Eutergewebe (Wellnitz & Kerr 2004) und aus Milch (Buehring 1990) stellte sich als überaus geeignet dar, diese anfängliche Immunantwort der Epithelzellen zu studieren.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Versuche mit primären Zellkulturen durchgeführt. Die Arbeit mit dieser Art der Zellkultur bietet viele Vorteile gegenüber einer immortalisierten Zelllinie, die für die Kultivierung unsterblich gemacht wurden, indem sie aus Tumoren gewonnen, mit Karzinogenen behandelt oder mit Onkogenen transfiziert wurden. Außerdem haben sich diese Zellen an die Kultur angepasst und verändert. Die Rahmenbedingungen, wie beispielsweise Medienzusammensetzung, Umgebungstemperatur oder Behandlungszeiträume, wurden für alle Versuche gleich gehalten, so dass eine repräsentative Aussage über die Immunantwort der Euterepithelzellen gemacht werden konnte. Stark divergierende Bedingungen bei verschiedensten Erreger-Wirt-Interaktionsmodellen bei Versuchen *in vivo* waren auffallend. So wurden teilweise Tiere aus nicht eutergesunden Betrieben, in verschiedenen Laktationsstadien und verschiedenen Alters für die Versuche herangezogen.

Für unsere Versuche aber wurden frisch isolierte Zellen aus Gewebe und Milch genutzt, die den Vorteil haben, dass die dazugehörige Kuh bekannt ist, auf ihre Eutergesundheit getestet werden kann und im besten Fall sogar ihre komplette Krankengeschichte nachvollzogen werden konnte. Außerdem ist

es möglich eine biologische Wiederholbarkeit zu garantieren, d.h. man kann jederzeit Zellen verschiedener Kühe gleichzeitig, aber getrennt voneinander kultivieren und mit den verschiedenen Erregern behandeln.
Zur Isolation und Kultivierung der Zellen wurde Medium verwendet, dem FKS, ITS, Antibiotika und Antimykotika zugesetzt waren. Mindestens 24 h vor Beginn der Versuche wurde nur noch Medium mit FKS und ITS aber ohne Antibiotika und –mykotika verwendet.
Generell müssen alle Nährstoffe, die von den Zellen selber nicht produziert werden können von außen zugefügt werden. Die optimale Zusammensetzung der Kulturmedien ist auf die verschiedenen Zelltypen abgestimmt und kommerziell in vielfältiger Form zu erhalten. Für die Epithelzellen wurde das Medium DMEM/ Ham´s F12 zur Ernährung der Zellen verwendet. Als weitere Zusätze kamen noch FKS in Konzentrationen zwischen 5 und 10% und eine Mischung aus Insulin, apo-Transferrin und Sodium Selenit (ITS), sowie Antibiotika und Antimykotika ins Medium. FKS stellt sich als unerlässlich für Zellkulturen dar, da einige, nicht ganz bekannte Faktoren, wie verschiedene Wachstumsfaktoren, darin enthalten sind die sich positiv auf das Wachstumsverhalten der Zellen auswirken. Insulin, Transferrin und Sodium Selenit vereinfachen die Aufnahme verschiedener Stoffe in die Zelle. Insulin erleichtert den Glukose Transport in die Zelle und wirkt sich positiv auf die Zellproliferation aus, Transferrin fördert den Eisentransport in die Zelle und Sodium Selenit spielt bei verschiedenen Signalkaskaden in der Zelle eine wichtige Rolle.
Zellen in Kultur verändern sich schnell in ihrer Morphologie und ihren Reaktionen. So liegen die Zellen aus dem Gewebe nach der Isolation nach unserem Protokoll noch in ihrer typisch runden Acini-Struktur vor, aber schon nach wenigen Tagen bilden die Zellen in den Kulturgefäßen einen Monolayer aus. Außerdem bilden sie schon nach drei Tagen das Milchprotein Casein nicht mehr und produzieren, je konfluenter sie werden, größere Menge an Lactoferrin (Wellnitz & Kerr 2004).
Epithelzellen aus der Milch wachsen in Kultur direkt im Monolayer und liegen auch direkt nach der Probenentnahme nicht in Acini-Struktur vor. Nach der Isolierung brauchten sie zwei bis drei Wochen um Konfluenz zu erreichen. Zunächst wurde vermutet, dass diese Zellen durch ihre Abschilferung aus

dem Eutergewebe in die Milch sich soweit in ihrer Morphologie und Reaktionsweise verändern, dass sie nicht mit den Zellen aus dem Gewebe vergleichbar sind. Allerdings ist es wesentlich einfacher die Milch einer Kuh zu gewinnen und vorher bakteriologisch zu testen. Die Milch konnte vor Ort genommen und sofort bearbeitet werden. Die längere Wartezeit bis zur Verarbeitung durch den Weg vom Schlachthaus bis zum Labor entfiel. Außerdem mussten für die Gewinnung der Zellen die Tiere nicht geschlachtet werden, so dass jederzeit von der gleichen Kuh wieder Milch zur Isolation von Epithelzellen genommen werden konnten und ihre weitere Krankengeschichte beobachtet werden konnte. Bei der Immunohistochemischen-Färbung der Cytokeratine zeigten ca. 95 % der Zellen aus dem Gewebe eine Anfärbung des Zytoplasmas. Bei den Zellen aus der Milch war das Zytoplasma aller Zellen angefärbt, so das man davon ausgehen konnte, dass es sich um eine reine Epithelzellkultur handelte. Zur Absicherung, dass sich keine Zellen aus dem Blut in Kultur befinden, die bekannt für ihre starke Immunreaktion auf Erreger sind, wurde noch eine Immunozytochemische Färbung mit einem CD11a Antikörper durchgeführt, die negativ für die Zellen aus der Milch war. Darüber hinaus wurde die Expression von CD45, der in der äußeren Plasmamembran von Zellen hämatopoetischer Herkunft exprimiert wird, mittels qRT-PCR gemessen. Als positive Kontrolle wurde Rinderblut benutzt. Auch hier war das Ergebnis für die Zellen aus der Milch negativ.

Es zeigten sich bei einem Vergleich der Zellen aus dem Gewebe und den Zellen aus der Milch ähnliche Ergebnisse in der Immunantwort. Die Zellen von je einer Kuh wurden über eine Zeitreihe von 3, 6 und 12 h mit hitzeinaktivierten *E.coli* behandelt. Die Ergebnisse der qRT-PCR zeigten eine ähnliche mRNA-Expression für TNF sowohl bei den Kontrollen als auch bei den behandelten Zellen. Nach 6 h war die TNF mRNA-Expression bei den Zellen aus der Milch höher als bei denen aus dem Gewebe. Eine statistische Auswertung war nicht möglich, da es sich nur um Zellen von je einer Kuh handelte. Doch aufgrund dieses Ergebnisses und der genannten Vorteile der Zellen aus der Milch wurden für alle weiteren Versuche diese Art der Isolation der Epithelzellen genutzt.

Als Untersuchungsmethode für die Immunantwort der Zellen auf die verschiedenen Mastitiserreger wurde die besonders sensitive Methode der qRT-PCR gewählt. Diese Methode hat den Vorteil, dass schon kleinste Mengen an mRNA eines Proteinkodierenden Zielgens detektiert werden können. So ist eine Aussage über die frühe zelluläre Immunantwort möglich, schon bevor das aktive Protein gebildet wird.

Die Zellen wurden auf die Mastitis-Erreger. *E.coli*, *S.aureus, koagulase negative Staphylokokken* und *Str.uberis*, die alle verschiedene Arten von Mastitiden auslösen, getestet. *S.aureus* und die *KNS* lösen vorwiegend subklinische und chronische Mastitiden aus. Diese Art von Mastitiden sind meist nur schwer oder gar nicht zu therapieren. Dadurch, und durch seine kontagiöse Verbreitungsart stellen nicht abgeheilte Infektionen ein hohes Risiko für weitere Kühe im Bestand dar. Da es bisher auch zu keinen Erfolgen in der Herstellung von Impfstoffen gekommen ist, wird eine Erhöhung der angeborenen Resistenz gegenüber diesen Keimen angestrebt. *E.coli* löst im Gegensatz zu *S.aureus* einen meist akuten Verlauf einer Mastitis aus, der nicht selten zum Tod der Kühe führt. Ein Unterschied der Immunantwort des Milchdrüsenepithels auf die verschiedenen Erreger, anhand der Zytokin-, Chemokin- und Akut-Phase Protein mRNA-Expression, kann helfen die Ursachen für die ungenügende Abwehr, und die daraus resultierenden chronischen Infektionen von *S.aureus* und den *KNS* zu finden. Alle hier benutzten Erreger wurden direkt aus einer Mastitis isoliert. Überraschenderweise löste ein Infektionsdruck zwischen 0,5 und 50 MOI *E.coli* oder *S.aureus* keinen signifikanten Anstieg der TNF und IL-6 mRNA Expression bei steigender Konzentration der Bakterien aus. Deshalb wurden alle weiteren Versuche mit einem MOI von 10 durchgeführt. Dies ist ein relativ hoher Wert verglichen mit *in vivo* Studien, bei denen eine Mastitis schon mit der Injektion von 72-74 CFU Bakterien in ein Euterviertel ausgelöst werden kann (Bannerman *et al.* 2004). Ein Vergleich zwischen *in vivo* Verhältnissen und den Verhältnissen in der Zellkultur ist aber schwierig, da in meinen *in vitro* Studien inaktivierte Bakterien benutzt wurden, die sich nicht mehr weiter vermehren konnten. Eine Inaktivierung der Bakterien war nötig, um zum einen den MOI genau bestimmen zu können, die Bakterien somit

untererinander vergleichbar waren. Aber auch das Überwuchern der Zellkulturen und der frühzeitige Verbrauch des Kulturmediums während der Behandlungsversuche, konnte so vermieden werden. Außerdem konnten die Zellen somit einem gleichen definierten Infektionsdruck ausgesetzt werden, was *in vivo* nicht gegeben ist, da eine Infektion der Milchdrüse in dieser nicht gleichmäßig verteilt ist. Obwohl die Pathogenitätsfaktoren der gram-negativen und gram-positiven Bakterien bekannt und kommerziell erhältlich sind, wurden die inaktivierten Erreger verwendet. Das Hauptpathogen gram-negativer Bakterien ist der Zellwandbestandteil LPS. Bei den gram-positiven Bakterien sind hauptsächlich zwei Zellwandbestandteile, LTA und PGN, am Infektionsgeschehen beteiligt. Strandberg *et. al.* (2005) konnten Unterschiede in der Immunantwort von LPS und LTA behandelten Epithelzelllinien erkennen. So stieg die IL-8 und TNF mRNA-Expression nach 24 h mit LPS behandelten Zellen signifikant an, nicht aber bei den über den gleichen Zeitraum mit LTA behandelten Zellen. Allerdings stammte das dort verwandte LTA von dem Bakterium *Str.pyogenes*. Bei den hier durchgeführten Behandlungen handelte es sich immer um LTA, welches aus *S.aureus* isoliert wurde.

Unser Vergleich von LPS und LTA in verschiedenen Konzentrationen zeigte zwar bei allen Behandlungen eine Reaktion über einen Zeitraum von 24 h im Vergleich zur Kontrolle für die IL-6 mRNA Expression, aber der Wert der mit 10 MOI der inaktivierten Erreger *E.coli* und *S.aureus* behandelten Zellen lag immer über den Werten der LPS und LTA behandelten. Auch bei einer Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen an LTA und PGN, einzeln und zusammen, lagen die Werte der mit 10 MOI *S.aureus* über 6 h behandelten Zellen immer über den Werten der mit den Zellwandbestandteilen behandelten Zellen. Auch die Reaktion der untersuchten Zielgene nach einer Kombination von LTA und PGN in einer Konzentration von je 50 µg blieb darunter. Die anderen Bakterienbestandteile, wie beispielsweise die Adhesine und Toxine von *E.coli* und die Muropeptide von *S.aureus* scheinen also auch eine große Rolle in der Aktivierung der Immunantwort des Milchdrüsenepithels zu spielen und somit wurden alle Versuche mit den inaktivierten Erregern *E.coli*, *S.aureus*, *Str.uberis* und den *KNS* durchgeführt. Natürlich lassen sich 10 MOI

von Bakterien nicht direkt mit den verschiedenen Konzentrationen an Zellwandbestandteilen vergleichen. Diese Konzentrationen waren aber hoch gewählt und trotzdem reagierten die Zellen stärker, wenn man sie mit den inaktivierten Bakterien behandelte.

Ausserdem haben einzelne Arbeitsgruppen (Morath *et al.* 2002; von Aulock *et al.* 2004) immer wieder festgestellt, dass beispielsweise LTA, das kommerziell vertrieben wurde, LPS-Verunreinigungen enthielt. Somit sind die Ergebnisse mit diesen kommerziell erhältlichen Zellwandbestandteilen vorsichtig zu interpretieren.

Als Inaktivierungsverfahren wurden zwei Möglichkeiten getestet. Zum einen wurden die Bakterien nach der Aufzucht für eine halbe Stunde bei einer Temperatur von 63°C im Wasserbad inaktiviert. Zum anderen bestand die Möglichkeit eine French Press™ zur Inaktivierung zu benutzen. Dort werden die Bakterien bei einem Druck von ~10 000 psi in ihre Einzelteile zerpresst. Der Vorteil dieser Methode ist, dass Proteine, die eventuell bei 63°C denaturieren, hier nicht beschädigt wurden. Allerdings war es außerordentlich schwierig, alle Bakterien mit dieser Methode zu inaktivieren. Auch durch mehrmaliges Pressen des Lysats wurde dies oft nicht erreicht. Somit war es nicht mehr gegeben, dass die Anzahl der Bakterien pro Zelle genau bestimmt werden konnte. Aber über dies hinaus überwucherten die überlebenden Bakterien nach kurzer Zeit die Zellkulturgefäße und verursachten damit Schwierigkeiten. Um aber auch hier die Wiederholbarkeit der Versuche zu garantieren wurden für die meisten Versuche die hitzeinaktivierten Bakterien benutzt. Da einige Versuche aber schon mit den French Press™ inaktivierten Bakterien durchgeführt waren, wurden diese nicht wiederholt, wenn es nicht zu sichtbaren Vermehrungen der Bakterien gekommen war. Allerdings war es aber wichtig zu prüfen, inwiefern Unterschiede in der Immunabwehr der Epithelzellen auf die durch verschiedene Weisen inaktivierten Bakterien zu erkennen waren. Dazu wurden Zellen einer Kuh über drei Stunden mit sowohl hitzeinaktivierten als auch French Press™ gepresste *E.coli* und *Str.uberis* auf die Epithelzellen gegeben und die IL-6, IL-8 und TNF mRNA-Expression gemessen. Alle behandelten Zellen reagierten auf die Behandlung. Zwischen den Inaktivierungsarten konnten Unterschiede beobachtet werden. Die mit

hitzeinaktvierten Bakterien behandelten Zellen reagierten immer stärker als jene, die mit den durch die French Press™ inaktivierten Bakterien behandelt wurden. Für die meisten weiteren Versuche wurden danach hitzeinaktivierte Bakterien benutzt. Einerseits war diese Inaktivierungsart wesentlich einfacher, aber auch die Zugabe von Antibiotika zum Kulturmedium während der Versuche, zur Eindämmung eventuell überlebender Bakterien nach French Press™ Inaktivierung, könnte sich auf das Ergebnis der Versuche auswirken. Somit war es sinnvoller die durch Hitze inaktivierten Zellen zu benutzen.

Eine weitere Voraussetzung für die Aktivierung der Immunantwort im Euter ist das Vorhandensein von TLR. Gram-negative und gram-positive Erreger werden vor allem durch TLR2 und TLR4 erkannt (Kopp & Medzhitov 2003; Lehner *et al.* 2001; Morath *et al.* 2002; Opitz *et al.* 2001). Sie aktivieren durch diese Stimulation mit LPS und LTA eine Signalkaskade in der Zelle, die letztendlich die Produktion der Immunmodulatoren in der Zelle aktiviert (Kopp & Medzhitov 2003). Es konnten, wie schon in anderen Arbeitsgruppen (Strandberg *et al.* 2005) für eine Euterepithelzelllinie (MEC), auch für die primären Euterepithelzellen aus der Milch sowohl TLR2, TLR4 als auch TLR9 nachgewiesen werden. Dazu wurden Zellen von einer Kuh mit 10 µg LPS und 10 MOI *S.aureus* über 24 h behandelt und mittels qRT-PCR die mRNA der verschiedenen TLR nachgewiesen. Für alle Produkte konnten durch die Rotor-Gene™ -Software einheitliche Schmelzkurven dargestellt werden.

Ein 4- bis 13-facher Anstieg der TLR2 und TLR4 mRNA-Konzentration konnte für *S.aureus* infizierte Euterviertel nachgewiesen werden, wobei die Anzahl der TLR2 Kopien mit denen der TLR4 Kopien korrelierte. Dies lässt vermuten, dass die Expression dieser zwei Rezeptoren zusammen reguliert werden. Von beiden Rezeptoren ist bekannt, dass sie eventuell Heterodimere bilden (Goldammer *et al.* 2004).

Tendenziell konnte dies auch bei den Euterepithelzellen aus der Milch gemessen werden. Allerdings wurde eine statistische Auswertung nicht vorgenommen, da die Versuche nur mit Zellen einer Kuh, allerdings im Doppelansatz, durchgeführt wurden. Die mRNA-Expression für TLR2 und TLR4 stieg nach 6-stündiger Behandlung mit LPS und *S.aureus* nur bei den LPS behandelten Zellen um ca. zwei Rotor-Gene™ Zyklen gegenüber den

unbehandelten Kontrollzellen an, aber nach 24 h waren es bei LPS behandelten Zellen schon sechs Zyklen und bei den mit *S.aureus* behandelten Zellen sogar acht Zyklen für TLR2, und vier beziehungsweise sechs Zyklen für TLR4. Dieses Ergebnis ist gut mit der Tatsache zu erklären, dass die Signalkaskade für die Immunmodulatoren in der Zelle gerade über diese beiden TLR laufen.

Nach einer Inkubation der Epithelzellen von sechs Kühen mit den hitzeinaktivierten Bakterien für eine Stunde stieg die IL-8 mRNA-Expression bei der Behandlung mit *E.coli* signifikant an. Diese schnelle Antwort der IL-8 mRNA-Expression auf *E.coli* stimmt mit den Ergebnissen von *in vivo* Experimenten überein. Dort stieg IL-8 in der Milch der mit *E.coli* infizierten Euterviertel zwischen 4 und 24 h post infectionem an (Riollet *et al.* 2000; Persson *et al.* 2003), nicht aber bei einer Infektion mit *S.aureus* (Bannerman *et al.* 2004). Folglich ist der Ursprung des IL-8 in der Milch nicht ausschließlich auf die Produktion durch die Leukozyten zurückzuführen, sondern auch auf die Ausschüttung durch die Euterepithelzellen. Da IL-8 sehr stark chemotaktisch auf PMN wirkt (Barber & Yang 1998), könnte dies auch den sehr schnellen Anstieg der somatischen Zellzahl in der Milch während einer *E.coli* Infektion im Vergleich zum langsameren aber länger andauernden Anstieg während einer *S.aureus* Infektion erklären (de Haas *et al.* 2004). Behandlungen der Epithelzellen über 6 h mit *E.coli* und *S.aureus* steigerten die mRNA-Expression von IL-6, IL-8, TNF und SAA. Nach 24 h war sie, bis auf die SAA mRNA-Expression nach *E.coli* Behandlung immer noch signifikant erhöht. Ein hoher TNF-Wert konnte auch nach experimenteller Infusion von 50-500 µg LPS direkt in den Kreislauf im Blut festgestellt werden. Außerdem kam es zu einer deutlichen Neutropenie und Lymphopenie, sowie Fieber (Jain & Lasmanis 1978). Diese innitiale Neutropenie könnte durch ein Auswandern der Entzündungszellen, beispielsweise der neutrophilen Granulozyten, aus dem Blut in die Milch bzw. das entzündete Gewebe erklärt werden (Paape *et al.* 1974). Die zeitliche Korrelation zwischen dem Auswandern aus dem Blut und dem Einstrom ins Gewebe besteht zwar (Bannerman *et al.* 2004), aber die Zahl der sich in der Milch befindlichen PMN machten nur einen Bruchteil der ausgewanderten Zellen aus. Vermutlich bleibt ein Großteil der PMN im entzündeten

Milchdrüsengewebe zurück. TNF scheint auch, neben seiner pyogenen Wirkung, als proapoptotischer Mediator zu dienen. Eine LPS-vermittelte Sekretion von TNF induziert Apoptose in PMN (Takeda *et al.* 1993). Die Apoptose von Lymphozyten wird ebenfalls durch TNF beeinflusst (Norimatsu *et al.* 1995; Sanchez-Cordon *et al.* 2005). Dies könnte ebenfalls die beobachteten Lymphopenien erklären. In der Milch kommt es nach experimenteller *E.coli*-Mastitis nach 16 h p.i. zu Maximalwerten (Bannerman *et al.* 2004). Im Blut ist TNF nach 8-16 h p.i. nachweisbar (Hoeben *et al.* 2000). In unserem Versuchen waren die TNF Werte sowohl bei einer Zeitreihe mit einer Kuh über 3, 6 und 24 h bei einer Behandlung mit *E.coli* und *Str.uberis* tendenziell erhöht. Außerdem war TNF nach 30 min bei einer Behandlung mit *E.coli* und nach 90 min bei einer Behandlung mit *E.coli* und *S.aureus* signifikant erhöht. In einer Zeitreihe über 1, 6 und 24 h zeigte sich eine Erhöhung der TNF mRNA-Expression nach 6 und 24 h.

Das Akut-Phase-Protein Serum Amyloid A wird während einer Infektion schon sehr schnell gebildet (Suffredini *et al.* 1999). Die Produktion der Akut-Phase Proteine erfolgt hauptsächlich in der Leber, wobei vor allem SAA1 und SAA2 freigesetzt werden (Jensen & Whitehead 1998). Beim Rind ist SAA ein Haupt-Akut-Phase-Protein. Die Konzentrationen dieses Proteins können während einer akute-Phase-Reaktion auf das 100-fache im Serum ansteigen (Horadagoda *et al.* 1999). Obwohl die Leber der Hauptproduktionsort von SAA ist, wird eine Isoform des SAA, das SAA3 auch extrahepatisch gebildet. So wurde es auch schon in den Epithelzellen der Milchdrüse des Rindes während eines Infekts mit gram-negativen Erregern (Larson *et al.* 2005), sowie nach Stimulation der Epithelzellen mit LPS und *S.aureus* (Wellnitz & Kerr 2004) nachgewiesen. Die SAA Produktion der Epithelzellen konnte bestätigt werden. So exprimierten die Zellen nach einer Behandlung mit *S.aureus* nach 6 und 24-stündiger Behandlung signifikant erhöhte mRNA-Werte für SAA. Eine Behandlung mit E.coli führte in diesem Versuch hingegen nicht zu signifikanten Erhöhungen der SAA mRNA-Konzentration. Als Stimulanz für die SAA Produktion kann bei den gram-positiven Erregern das LTA angesehen werden (Weber *et al.* 2005).

Erstaunlicherweise erhöhten die Behandlungen mit *Str.uberis* in der gleichen Konzentration wie *E.coli* und *S.aureus* nicht die mRNA-Expression

der gemessenen Zytokine und Chemokine in den durchgeführten Versuchen. Dies entspricht aber den Ergebnissen von Strandberg *et. al*. (2005), bei dem das LTA eines anderen Streptokokken Stammes (*Str.pyogenes)* keine signifikanten Unterschiede in der mRNA-Expression von IL-1ß, IL-8, TNF, CXCL6 und ß-Defesin nach 24-stündiger Exposition ergab. Allerdings kam es dort bei einer Behandlung zwischen zwei und vier Stunden zu einer schnellen Erhöhung der mRNA der genannten Gene. Ein signifikanter Anstieg durch die Behandlung mit *Str.uberis* konnte in unseren Versuchen nur nach einer Behandlung über 1 h für die mRNA-Expression von GM-CSF und IL-8 gemessen werden. Die mRNA-Expression war schon nach 30 min durch eine Behandlung mit *E.coli* erhöht. Nach 1 und 1,5 h waren die Werte allerdings nicht mehr signifikant erhöht. Eine Behandlung mit *S.aureus* löste in diesem gesamten Zeitraum keine Erhöhung der mRNA-Expression für diesen Immunmodulator aus. In *in vivo* Experimenten konnten keine Erhöhung der IL-8 und TNF Werte in Molke nach einer experimentellen Infektion mit ~6-10 x $10^3$ CFU *Str.uberis*/Drüse vor 66 h p.i. erzielt werden (Rambeaud *et al.* 2003). Eine Erklärung dafür ist schwierig zu führen und kann nur vermutet werden. Eventuell umgeht dieses Bakterium die Aktivierungskaskaden der Epithelzellen und regt somit nicht die mRNA-Expressionen der von hier gemessenen Immunmodulatoren in ihnen an.

*Koagulase negative Staphylokokken* spielen seit einiger Zeit eine immer größere Rolle als Auslöser subklinischer und chronischer Mastitiden. Sie wurden häufig sowohl bei Färsen, als auch bei laktierenden und nicht laktierenden Kühen isoliert (Oliver & Jayarao 1997). Die Milch aus Eutern, die mit *KNS* infiziert waren hatte eine höhere somatische Zellzahl (SCC) und die infizierten Viertel produzierten weniger Milch während der Laktation als gesunde. In unserem Epithelzellkulturmodell lösten sie im Vergleich zu *S.aureus* erst bei einer relativ hohen Konzentration von 50 MOI signifikante Unterschiede der mRNA-Produktion der Immunmodulatoren aus. So stiegen die mRNA-Expressionen von IL 6 und IL 8 nur nach einer Behandlung mit 50 MOI über 6 h signifikant an. Für TNF wurde kein Unterschied zwischen den behandelten Zellen und den Kontrollen gemessen. *S.aureus* lies die mRNA-Expression dieses Zytokins hingegen schon in einem Versuch bei einer Behandlung mit 0,5 MOI über 90 min signifikant ansteigen. Tendenziell

reagierten *S.aureus* behandelte Zellen also immer stärker als die mit *KNS* behandelten. Interessanterweise wird TNF nicht von den Epithelzellen sezerniert. Es müssen also andere Zellen (möglicherweise die PMN in der Milch) oder Faktoren eine Rolle bei der anfänglichen Immunantwort auf *KNS* spielen, da es zu einer Erhöhung der SCC in der Milch kommt (Saa & Kruze 1995). IL-8, als eines der wichtigsten Chemokine scheint dabei nur eine untergeordnete Rolle zu spielen. Da auch die Faktoren, die bei den *KNS* für die Infektion verantwortlich sind noch nicht vollends bekannt sind (Saa & Kruze 1995), könnten auch ganz andere Immunmodulatoren, als die hier gemessenen, die sich beispielsweise bei *S.aureus* und *E.coli* bewährt haben, die Immunantwort einleiten.

Allerdings müssen weitere Versuche, auch über verschiedene Zeiträume dieses Ergebnis noch untermauern. Diese wurden im Rahmen dieser Dissertation jedoch nicht mehr durchgeführt.

Alle Versuche in dieser Arbeit wurden jeweils mit einem Stamm der entsprechenden Bakterien durchgeführt. Dadurch konnten wichtige Hinweise auf die anfängliche Immunantwort der Epithelzellen des Euters gefunden werden. Da zunächst die Unterschiede in der Immunantwort auf Erreger mit verschiedenen Mastitisverläufen getestet werden sollte, wurde jeweils nur ein Stamm genutzt. Weitere Versuche mit verschiedenen Stämmen könnten Klarheit über eventuelle Unterschiede zwischen den einzelnen Erregerstämmen bringen.

Ein Nachweis von IL-8 mittels eines humanen ELISA gelang bei den Zellen die aus der Milch isoliert wurden nicht. Dazu wurden die Überstände von Zellen, die über 6 und 24 h gleichzeitig aber getrennt voneinander mit *E.coli*, *S.aureus* und *Str.uberis* behandelt wurden auf IL-8 getestet. Allerdings stand kein IL-8 ELISA-Kit für bovines IL-8 zur Verfügung, aufgrund dessen auf einen Kit mit humanen Antikörper zurückgegriffen wurde. Es gelang nicht das bovine IL-8 mit diesem Antikörper nachzuweisen.

Doch ELISA-Studien von Wellnitz und Kerr (2004) beweisen, dass nicht nur die mRNA-Expression von IL-8 bei einer Infektion der Epithelzellen angekurbelt wird, sondern auch das Protein gebildet wird.

## 5.2. Caprine Euterepithelzellen

Ziegenmilch und Produkte aus Ziegenmilch erfreuen sich heutzutage wieder großer Beliebtheit bei den Konsumenten. Auch in diesen Betrieben treten häufig Mastitiden auf. Allerdings hat der Zellgehalt der Tankmilch bei kleinen Wiederkäuern nur sehr geringe Aussagekraft in Bezug auf die Eutergesundheit einer Herde. Deshalb ist es gerade hier wichtig andere Immunmarker für die Diagnose einer Mastitis zu finden. Außerdem spielt *S.aureus* im Gegensatz zur Kuh beim kleinen Wiederkäuer häufig als Erreger einer klinischen Mastitis eine große Rolle (Dahme & Weiss 1999). Um die Ursache für die ungenügende Immunantwort beim Rind, im Vergleich zur Ziege, auf diesen Erreger zu finden war es von großer Bedeutung die Unterschiede in der Immunantwort der Euterepithelzellen mit denen der Kuh zu vergleichen, bei der dieser Erreger meist subklinisch, chronische Mastitiden auslöst,. Als Marker der Eutergesundheit dienten auch hier das Chemokin IL-8 sowie das Zytokin TNF, deren Quantifizierung auch auf mRNA Ebene mittels qRT-PCR erfolgte.

Für die Versuche mit den caprinen Euterepithelzellen wurde für die Kultivierung und Behandlung ganz ähnlich vorgegangen, wie bei den Zellen aus Kuhmilch. Da die Immunohistochemische Färbung auf Cytokeratine bei den Zellen aus Kuhmilch so eindeutig war, und fast 100%-ig Zellen epithelialen Ursprungs zeigte, konnte davon ausgegangen werden, dass es sich bei den Zellen aus Ziegenmilch ähnlich verhält, und somit wurde auf eine Färbung verzichtet. Allerdings wurde auch hier mittels qRT-PCR auf CD45 getestet, um sicher zu gehen, dass keine Zellen hämatopoetischen Ursprungs in der Kultur vorhanden waren. Wie bei den Zellen aus Kuhmilch war auch hier CD45 nicht nachweisbar.

Die Behandlung der Epithelzellen erfolgte mit hitzeinaktivierten *S.aureus* . Als Stamm wurde ebenfalls der bei Bramley *et al*. (1989) beschriebene Stamm M60 benutzt. Die Methoden zur Isolation und Kultivierung der Euterepithelzellen aus Ziegenmilch sind bekannt (Mselli-Lakhal *et al.* 2001), allerdings sind über die Immunantwort im Euter, außer des Anstiegs des Zellgehalts noch keine Informationen publiziert. Bekannt ist, dass *S.aureus* und *KNS* die Milchzusammensetzung verändern. So findet man einen

erhöhten Zellgehalt, eine intermittierende Bakterienausschüttung und eine Erhöhungen der IL-8 Konzentrationen (Winter 2004).

Die Zellen von vier verschiedenen Ziegen wurden für die Versuche zusammen, aber getrennt voneinander angezüchtet und behandelt. Da die Ergebnisse der Versuche mit den bovinen Euterepithelzellen sehr interesannte Hinweise auf die Rolle dieser bei der frühen Erreger-Wirt Interaktion lieferten, wurden die Versuche mit caprinen Euterepithelzellen nach dem selben Behandlungsmuster durchgeführt und auf die selben Immunmodulatoren getestet. So wurden sie mit 10 MOI *S.aureus* und 10 µg LPS, als Positivkontrolle, behandelt. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte Zellen. Die Inkubationsdauer betrug 1, 6 und 24 h. Gemessen wurden die mRNA-Expressionen von IL-8 und TNF. Die Primer für IL-8 und TNF wurden aus den Versuchen mit den Epithelzellen der Kühe herangezogen, nachdem sie auf ihre Homologie zur Ziegensequenz getestet wurden. Die Primer zeigten in der Rotor-Gene™ Software die primerspezifische Schmelzkurven und wurden so auch als für die Ziege geeignet empfunden.

Die IL-8 mRNA-Expression stieg eine Stunde nach der Behandlung mit LPS an. Nach 6 h war die Reaktion sowohl der LPS als auch der *S.aureus* behandelten Zellen signifikant erhöht. Nach 24 h klang die Reaktion wieder ab,die IL-8 Konzentration nicht mehr signifikant erhöht, aber immer noch höher, verglichen mit den Kontrollen.

Die TNF mRNA-Konzentration stieg bei gleicher Behandlung schon nach einer Stunde sowohl bei den LPS, als auch bei den *S.aureus* behandelten Zellen signifikant an. Auch über 6 und 24 h war dieser Unterschied noch zu messen. Die schnelle Antwort durch Produktion von IL-8 stimmt mit der Aussage überein, dass die IL-8 Konzentrationen in der Milch ansteigen (Winter 2004). Wie bei der Kuh sind also für die Existenz von IL-8 in der Milchdrüse nicht nur die PMN sondern auch die Epithelzellen verantwortlich. Verglichen mit der Kuh zeigte sich demnach eine ähnliche anfängliche Immunantwort auf *S.aureus*. Auch die TNF mRNA-Expression stimmt im wesentlichen überein. Bei gleicher Konzentration der Erreger wurden die Ziegenepithelzellen allerdings schon nach einer Stunde signifikant stimuliert, wohingegen die Zellen der Kuh erst nach 6 h mit einer Erhöhung der TNF

mRNA-Produktion reagierten, was für den meist akuten Verlauf, also eine stärkere Reaktion des gesamten Immunsystems auf den Erreger durch eine *S.aureus* Mastitis bei der Ziege hinweisend sein könnte. Das Immunsystem könnte schon nach 6 –23 h so stimuliert sein, dass es nicht mehr nötig ist mehr IL-8 zu produzieren, das chemotaktisch auf PMN wirkt, denn nach 24 h ist keine signifikante Erhöhung der IL-8 mRNA-Expression durch eine Stimulation mit *S.aureus* und LPS mehr zu messen.

Ein relativ gute Vergleichsmöglichkeit bieten auch Versuche mit anderen kleinen Wiederkäuern. So konnte man nach einer experimentellen Infektion verschiedener Euterviertel von Schafen mit *E.coli* und *S.aureus* eine Erhöhung der SCC in der Milch nachweisen. Bei einer *E.coli* Infektion stieg der SCC nach 4 h an und erreichte nach 8 h einen Peak. Nach *S.aureus* Infektion stieg der SCC-Gehalt nach 8 h an und erreichte nach 24 h einen Peak. Als Zytokine in der Milch wurden IL-8, TNF und IL-1β gemessen. Auch hier konnten Peaks gemessen werden, die denen der SCC bei den verschiedenen Erregern entsprach (Persson *et al.* 1997).

Unsere Ergebnisse entsprechen in etwa den *in vivo* Versuchen beim Schaf. Allerdings stiegen die TNF mRNA-Expressionen zwischen 6 und 24 h noch weiter an, egal ob sie mit *S.aureus* oder LPS behandelt wurden. Die LPS behandelten Zellen zeigten immer eine etwas stärkere Reaktion, als die mit *S.aureus* behandelten.Eine außnahme stellte ihre IL-8 mRNA-Expression nach 24 h dar. Hier waren keine signifikanten Unterschiede der behandelten Zellen im Vergleich zu den Kontrollen mehr zu erkennen. Dieses Ergebnis entspricht zwar nicht ganz einer *in vivo* Studie an Schafen, bei der die Schafeuter mit *S.epidermidis*, also einem Vertreter der *KNS*, infiziert wurden. Dort stieg die IL-8 Konzentration in der Milch nach zwei Stunden an, erreichte nach 24 h einen Peak und sank dann stetig wieder ab, konnte aber nach 144 h immer noch nachgewiesen werden (Winter & Colditz 2002). Da unsere Versuche aber auf mRNA-Ebene abliefen, scheint dieses Ergebnis allerdings plausibel.

Interessant wäre es in weiteren Versuchen *S.aureus* und *KNS* gegenüberzustellen, um eventuelle Unterschiede im Zytokinmuster der Ziegenzellen zu erkennen oder zu sehen, ob auch die caprinen

Euterepithelzellen eine 5-fache Konzentration an hitzeinaktivierten *KNS* benötigen, um Reaktionen hervorzurufen.

## 5.3 Schlussfolgerung

In den durchgeführten Versuchen wurde die unterschiedliche Reaktion der Euterepithelzellen auf Erreger, die chronische (*S.aureus, KNS, Str.uberis*) und Erreger die akute (*E.coli, Str.uberis*) Mastitiden hervorrufen, untersucht. Die wichtige Rolle des milchbildenden Epithels in der anfänglichen Immunantwort des Euters auf diese Erreger konnte bestätigt werden.

Der Mastitiserreger der eine klinisch akute Mastitis hervorruft, mit einer starken Immunantwort des Euters, *E.coli*, zeigte sich in diesem Modell als der Erreger, der immer die schnellste und meist auch stärkste Erhöhung der mRNA-Expression der gemessenen Zytokine, Chemokine und Akut-Phase Proteine auslöste. Erste Reaktionen konnten bereits nach 30 min für die TNF, IL-8 und GM-CSF mRNA-Expression festgestellt werden. Auch über 60 min waren diese Reaktionen noch zu messen. Nach 90 min konnte in einem Versuch noch eine Erhöhung der IL-8 und TNF mRNA-Konzentration gemessen werden. Die IL-6 mRNA-Expression war über den gesamten Zeitraum nicht erhöht. Sie scheint erst nach gewisser Zeit einzusetzen, denn nach 6 und 24 h unterschied sie sich signifikant von der Expression der nicht behandelten Zellen. Auch die IL-8 und die TNF mRNA-Level waren über diesen Zeitraum signifikant erhöht. Diese Expressionsmuster spiegeln den akuten Verlauf dieser Mastitisform wieder. Die Hochregulierung der proinflammatorischen Zytokine und Chemokine im Euter rührt also nicht nur von den PMN her, sondern scheint auch von den Epithelzellen selbst auszugehen.

*S.aureus*, als Vertreter der meist chronisch verlaufende Mastitiden auslösenden Erreger, zeigte tendenziell meist eine etwas schwächere Immunantwort, als die gram-negativen *E.coli*. So waren nach 30 min noch keine Unterschiede in der Immunantwort feststellbar, und auch nach einer Stunde und 90 min waren die Unterschiede zu den nicht behandelten Zellen nur minimal. Nach 6 h allerdings stieg die IL-6 mRNA-Expression an, klang aber nach 24 h wieder ab. Die IL-8 und TNF mRNA-Konzentrationen waren nach 6 und 24 h erhöht. Dies galt auch für das Akut-Phase-Protein SAA, welches sogar nur durch *S.aureus* hochreguliert wurde. Auch diese etwas spätere, und nicht ganz so starke Immunantwort der Epithelzellen spiegelt

die Gesamtsituation des Euters *in vivo* weitgehend wieder. Die klinischen Reaktionen auf *S.aureus* unterscheiden sich gravierend von Mastitiden die durch *E.coli* verursacht werden. Das Immunsystem scheint also durch *S.aureus* nicht so lang und nicht so stark aktiviert zu werden um die Reaktionen, die *E.coli* zeigt, hervorzurufen. Das Immunmarkermuster der Epithelzellen spiegelt dies wieder und zeigt ihre bedeutende Rolle bei der Früherkennung der Erreger.

Behandlungen mit *Str.uberis*, als einem weiterem Vertreter der gram-positiven Erreger, der sowohl akute als auch chronische Mastitiden hervorruft, löste bei allen Versuchen unter den selben Bedingungen erstaunlicherweise immer eine schwächere oder keine Immunantwort der Euterepithelzellen aus. Er scheint also die Epithelzellen nur wenig oder gar nicht dazu zu aktivieren, Immunmarker zu bilden. Eine Erkennung dieses Erregers findet also wahrscheinlich außerhalb der Epithelzellen statt oder erst zu einem späteren Zeitpunkt als nach 24 h, dem längsten hier untersuchtem Zeitraum.

Die Behandlung mit *koagulase negativen Staphylokokken* zeigte, dass eine 5-fach höherer Infektionsdruck als bei den anderen Erregern nötig war, um überhaupt eine Immunreaktion von IL-8 und IL-6 nach 6 h zu erreichen. Dieser Erreger zeigt sich auch in *in vivo* als sehr hartnäckig in der Diagnose und Bekämpfung, aber ohne starke klinische Symptome. Auch hier erfolgt die Stimulierung des Immunsystems eventuell nicht, oder nur kurz (nach 6 h) und mit hohem Infektionsdruck, über die Epithelzellen. Wenn man die Reaktion der Epithelzellen auf das Euter überträgt könnte das bedeuten, dass *KNS* zwar PMN in das Euter locken, beispielsweise durch die IL-8 Produktion, und es zu einer Erhöhung der Zellzahl kommt, die Anzahl und Stimulierung der Immunzellen aber nicht zur Anlockung weiterer PMN in das Euter reicht und somit klinische Symptome ausbleiben.

Die Versuche an caprinen Euterepithelzellen gaben erste interessante Hinweise auf die Rolle der Epithelzellen während einer Mastitis beim kleinen Wiederkäuer. Der meist akute Verlauf einer *S.aureus* Mastitis kann durch das IL-8 und TNF mRNA-Muster der Zellen durchaus erklärt werden. So wird IL-8 mRNA schnell produziert, sinkt aber nach 24-stündiger Behandlung wieder ab. Die TNF mRNA bleibt hingegen auf einem hohen Level. Bezogen auf das

Euter könnte dies bedeuten, dass es zu einer schnellen und heftigen Antwort im Euter kommt und das Immunsystem stark mit der Rekrutierung von PMN ins Euter reagiert.

Das in dieser Arbeit etablierte Zellkultursystem zeigte, dass es unterschiedliche Reaktionen des milchbildenden Epithels auf verschiedene Mastitiserreger gab. Interessant wären nun noch weitere Studien an diesem Modell, die mehrere Stämme eines Bakteriums testen, um auch zwischen diesen eventuelle Unterschiede zu erkennen, und die Aussagekraft jedes einzelnen Stammes noch zu unterstützen.

.

## 6. Zusammenfassung

Entzündungen des Euters stellen, neben dem Leid der Tiere, eine der verlustreichsten Krankheiten für die Milchindustrie dar. Ein besseres Verständnis der anfänglichen Immunantwort des Wirtes könnte zu einer genaueren Auswahl resistenter Tiere oder zu besseren prophylaktischen und therapeutischen Maßnahmen führen. Das Ziel dieser Arbeit war es die Reaktionen der Euterepithelzellen auf Mastitiserreger mit verschiedenen Verläufen zu untersuchen. Primäre Epithelzellkulturen aus Milch von Braunviehkühen und Bunten Deutschen Edelziegen sowie aus Gewebe einiger Kühe wurden verwendet, um die Immunantwort zu testen. Da die Zellen verschieden auf einzelne bakterielle Zellwandbestandteile (Lipopolisaccharid, Lipoteichonsäure und Peptidoglykane) im Vergleich zu den Bakterien selbst reagierten, wurden sie mit inaktivierten (10 MOI) gram-negativen *Escherichia coli (E.coli)*, einem sehr gängigen Erreger einer akuten klinischen Euterentzündung, den gram-positiven *Staphylococcus aureus (S.aureus)* und *koagulase negativen Staphylokokken* (*KNS*), die meist eine subklinische und chronische Mastitis auslösen und *Streptococcus uberis* (*Str.uberis)*, der beide Arten von intramammären Entzündungen auslösen kann, behandelt. Die caprinen Euterepithelzellen wurden mit 10 MOI inaktivierten *S.aureus*, der im Gegensatz zur Kuh bei der Ziege meist eine klinisch akute Mastitis auslöst, und LPS behandelt. Die bovinen Euterepithelzellen reagierten nach einer 30 min Behandlung mit einem Anstieg der Interleukin- (IL-) 8, IL-6, Tumor Nekrose Faktor alpha (TNF) und Granulozyten, Makrophagen-Koloniestimulierender Faktor (GM-CSF) mRNA-Expression. Die IL-8, IL-6 und TNF mRNA Werte waren auch nach 60 min, 6 h und 24 h noch erhöht. Nach 6 und 24-stündiger Behandlung mit *S.aureus* waren die mRNA-Expressionen von IL-6, IL-8, TNF und Serum Amyloid A (SAA) hochreguliert. Interessanterweise stimulierte *Str.uberis* nur die GM-CSF mRNA-Expression nach 60 min und die von IL-8 nach 6 h, hatte aber keinen Einfluß auf die mRNA-Mengen der anderen gemessenen Immunmodulatoren. Die mit *KNS* behandelten Zellen zeigten erst nach einer Stimulation mit 50 MOI über 6 h eine Reaktion. Dieser MOI steigerte die mRNA-Expressionen von IL-8 und IL-6, nicht aber die von TNF. Eine

Behandlung der caprinen Euterepithelzellen mit *S.aureus* steigerte die mRNA-Werte von IL-8 und TNF nach 1 h und 6 h. Nach 24 h war nur noch der mRNA-Wert von TNF erhöht.

Somit konnte gezeigt werden, dass die Epithelzellen bei der unterschiedlichen Immunantwort auf verschiedene Mastitiserreger eine große Rolle spielen. Verglichen mit *S.aureus* löste *E.coli* bei der Kuh immer eine schnellere Immunantwort aus. *S.aureus* löste eine spätere und schwächere Immunantwort der Epithelzellen aus, die vielleicht zu schwach ist, um das Immunsystem zu einer stärkeren Reaktion im Euter zu bewegen. *Str.uberis* löste nur eine Erhöhung der mRNA-Konzentration für GM-CSF nach 30 min und IL-8 nach 6 h aus. Eventuell stimuliert dieses Bakterium andere immunrelevante Gene die hier nicht gemessen wurden, oder es stimuliert die Epithelzellen der Milchdrüse gar nicht. Die Zellen brauchten eine 5-fache Dosis an *KNS* um überhaupt einen Anstieg der mRNA-Expression von IL-6 und TNF, nicht aber von IL-8 nach 6 h hervorzurufen. Vielleicht stimulieren die *KNS* das Immunsystem auch nicht stark genug, um eine akute Reaktion des Euters hervorzurufen, oder der Erreger wird, wie von den Epithelzellen auch, erst in sehr hohen Dosen wahrgenommen. Außerdem spielt IL-8 als chemoattraktiver Stimulus eine große Rolle, der hier fehlt. Die Ziegeneuterepithelzellen zeigten einen frühen Anstieg der IL-8 und TNF mRNA nach *S.aureus* Behandlung, der, kombiniert mit der Immunantwort der Zellen aus der Milch, hoch genug sein könnte, um eine klinisch, akute Mastitis auszulösen.

## 7. Summary

Infections of the bovine mammary gland are, in addition to the affliction of the animals, a great economic burden in the dairy industry. A better understanding of the innate immune response of the host could lead to a better selection of mastitis resistant cows or to better prophylactic and therapeutical treatments. The objective of the present study was to investigate the involvement of the epithelial cells into the outcome of mastitis induced by different pathogens. Primary epithelial cell cultures isolated from milk of Brown swiss cows and coloured german goats, and tissue of cows were used to test the immune response. Because the cells of the cows showed different responses to isolated bacterial endotoxins (lipopolysaccharide, lipoteichoic acid, and peptidoglycans) compared to whole bacteria, they were treated with heat inactivated (10 MOI) gram-negative *Escherichia coli (E.coli)*, a very common pathogen causing acute and severe intra-mammary infections, with *Staphylococcus aureus (S.aureus)* and coagulase-negative *Staphylococcus* (*CNS*), both prevalent cause of chronic and subclinical, and, *Streptococcus uberis (Str.uberis)* an inducer of acute and chronic mastitis. Goat cells were treated with 10 MOI heat inactivated *S.aureus* causing in opposite to cows an acute, clinical mastitis and LPS. In cows *E.coli* induced an increased mRNA expression of interleukin-(IL) 8, IL-6, tumor necrosis factor alpha (TNF) and granulozytes, macrophage-stimulating factor (GM-CSF) within a 30 min treatment. IL-8, IL-6 and TNF mRNA levels were still elevated after 60 min, 90 min, 6 h and 24 h. After 6 h *S.aureus* induced an increase in mRNA expression of IL-6, IL-8, TNF and SAA. After a 24 h treatment the expression of these immunomodulators was still elevated. Interestingly, *Str.uberis* in the same concentration did only induce the mRNA expression of GM-CSF after 60 min and the IL-8 after a 6 h treatment but had no influence on other immunomodulator mRNA expression. *CNS* treated cells needed a MOI of 50 for any reaction. This MOI induced a reaction on mRNA levels of IL-6 and IL-8 but not on TNF after 6 h. In goats *S.aureus* induced an increase in mRNA expression of IL-8 and TNF after 1 and 6 h. After a 24 h treatment just the mRNA level of TNF was elevated.

In conclusion mammary gland epithelial cells are involved in the different immune response to various mastitis pathogens. In cows, *E.coli* always induced an earlier immune response compared to *S.aureus*. This pathogen induced a later and probably for the immne system weaker reaction, not strong enough to cause an acute intramammary infection. *Str.uberis* in the same concentration induced only an increased GM-CSF and IL-8 mRNA expression after a 60 min or a 6 h treatment, respectively. This bacterium probably stimulates different immune relevant gene expressions not measured here or does not stimulate the mammary gland epithelial cells. The cells needed a 5-fold higher dose of *KNS* to respond with induced mRNA levels of IL-6 and TNF but not IL-8. *KNS* maybe does not stimulate the immune system enough to induce an acute mastitis and is like by the epithelial cells just recognized in very high dosis. IL-8 plays an important role as a chemotactic stimulus that is missing here. Goat mammary gland epithelial cells showed a early increase of IL-8 and TNF, that could be high enough, combined with the response of the immune cells in the milk, to induce an acute and severe intra-mammary infection.

## 8. Literaturangaben

Aasjord P & Grov A 1980 Immunoperoxidase and electron microscopy studies of staphylococcal lipoteichoic acid. *Acta Pathol.Microbiol.Scand.[B]* **88** 47-52.

Akira S, Yamamoto M & Takeda K 2003 Role of adapters in Toll-like receptor signalling. *Biochem.Soc.Trans.* **31** 637-642.

Almeida RA, Calvinho LF & Oliver SP 2000 Influence of protein kinase inhibitors on Streptococcus uberis internalization into bovine mammary epithelial cells. *Microb.Pathog.* **28** 9-16.

Almeida RA, Luther DA, Kumar SJ, Calvinho LF, Bronze MS & Oliver SP 1996a Adherence of Streptococcus uberis to bovine mammary epithelial cells and to extracellular matrix proteins. *Zentralbl.Veterinarmed.B* **43** 385-392.

Almeida RA, Matthews KR, Cifrian E, Guidry AJ & Oliver SP 1996b Staphylococcus aureus invasion of bovine mammary epithelial cells. *J.Dairy Sci.* **79** 1021-1026.

Almeida RA & Oliver SP 2001 Interaction of coagulase-negative Staphylococcus species with bovine mammary epithelial cells. *Microb.Pathog.* **31** 205-212.

Anderson KV 2000 Toll signaling pathways in the innate immune response. *Curr.Opin.Immunol.* **12** 13-19.

Bainton DF 1973 Sequential degranulation of the two types of polymorphonuclear leukocyte granules during phagocytosis of microorganisms. *J.Cell Biol.* **58** 249-264.

Bannerman DD, Paape MJ, Hare WR & Sohn EJ 2003 Increased levels of LPS-binding protein in bovine blood and milk following bacterial lipopolysaccharide challenge. *J.Dairy Sci.* **86** 3128-3137.

Bannerman DD, Paape MJ, Lee JW, Zhao X, Hope JC & Rainard P 2004 Escherichia coli and Staphylococcus aureus elicit differential innate immune responses following intramammary infection. *Clin.Diagn.Lab Immunol.* **11** 463-472.

Barber M & Yang T 1998 Chemotactic activities in nonmastitic and mastitic mammary secretions:presence of interleukin-8 in mastitc but not nonmastitic secretion. *Clin.Diagn.Lab Immunol.* **5** 82-86.

Barkema HW, Schukken YH, Lam TJ, Beiboer ML, Wilmink H, Benedictus G & Brand A 1998 Incidence of clinical mastitis in dairy herds grouped in three categories by bulk milk somatic cell counts. *J.Dairy Sci.* **81** 411-419.

Barrow PA & Hill AW 1989 The virulence characteristics of strains of Escherichia coli isolated from cases of bovine mastitis in England and Wales. *Vet.Microbiol.* **20** 35-48.

Blobel H & Brückler J 1980 Staphylokokken. In *Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren*, pp 21-129. Eds Blobel H & Schliesser T. Jena: Gustav Fischer Verlag.

Bradley AJ & Green MJ 2001 Adaptation of Escherichia coli to the bovine mammary gland. *J.Clin.Microbiol.* **39** 1845-1849.

Bramley AJ, Patel AH, O'Reilly M, Foster R & Foster TJ 1989 Roles of alpha-toxin and beta-toxin in virulence of Staphylococcus aureus for the mouse mammary gland. *Infect.Immun.* **57** 2489-2494.

Brouillette E, Grondin G, Lefebvre C, Talbot BG & Malouin F 2004 Mouse mastitis model of infection for antimicrobial compound efficacy studies against intracellular and extracellular forms of Staphylococcus aureus. *Vet.Microbiol.* **101** 253-262.

Browning JW, Mein GA, Barton M, Nicholls TJ & Brightling P 1990 Effects of antibiotic therapy at drying off on mastitis in the dry period and early lactation. *Aust.Vet.J.* **67** 440-442.

Buehring G 1990 Culture of Mammary Epithelial Cells from Bovine Milk. *J.Dairy Sci.* **73** 956-963.

Burvenich C, Paape MJ, Hill AW, Guidry AJ, Miller RH, Heyneman R, Kremer WD & Brand A 1994 Role of the neutrophil leucocyte in the local and systemic reactions during experimentally induced E. coli mastitis in cows immediately after calving. *Vet.Q.* **16** 45-50.

Burvenich C, Van M, V, Mehrzad J, Diez-Fraile A & Duchateau L 2003 Severity of E. coli mastitis is mainly determined by cow factors. *Vet.Res.* **34** 521-564.

Collier R, Bauman D & Hays R 1977 Lactogenesis in explant cultures of mammary tissue from pregnant cows. *Endocrinology* **100**.

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

Dahme E & Weiss E 1999 *Grundriß der speziellen anatomischen Pathologie der Haustiere*. Stuttgart: Enke Verlag.

de Haas Y, Veerkamp R, Barkema H, Gröhn Y & Schukken YH 2004 Associations between pathogen-specific cases of clinical mastitis and somatic cell count patterns. *J.Dairy Sci.* **87** 95-105.

Deinhofer M & Pernthaner A 1995 Staphylococcus spp. as mastitis-related pathogens in goat milk. *Vet.Microbiol.* **43** 161-166.

Deininger S, Stadelmaier A, von Aulock S, Morath S, Schmidt RR & Hartung T 2003 Definition of structural prerequisites for lipoteichoic acid-inducible cytokine induction by synthetic derivatives. *J.Immunol.* **170** 4134-4138.

Dmitriev BA, Toukach FV, Holst O, Rietschel ET & Ehlers S 2004 Tertiary structure of Staphylococcus aureus cell wall murein. *J.Bacteriol.* **186** 7141-7148.

Doggweiler R & Hess E 1983 Zellgehalt in der Milch ungeschädigter Euter. *Milchwissenschaft* 5-8.

Dopfer D, Almeida RA, Lam TJ, Nederbragt H, Oliver SP & Gaastra W 2000 Adhesion and invasion of Escherichia coli from single and recurrent clinical cases of bovine mastitis in vitro. *Vet.Microbiol.* **74** 331-343.

Drößler K & Gemsa D 2000 *Wörterbuch der Immunologie Allgemeine und klinische Immunologie*. Elsevier Verlag.

Ebner K, Hoover E, Hageman E & Larson B 1961 Cultivation and properties of bovine mammary cell cultures. *Exp.Cell Res.* **23**.

Eckersall PD, Young FJ, McComb C, Hogarth CJ, Safi S, Weber A, McDonald T, Nolan AM & Fitzpatrick JL 2001 Acute phase proteins in serum and milk from dairy cows with clinical mastitis. *Vet.Rec.* **148** 35-41.

Ellouz F, Adam A, Ciorbaru R & Lederer E 1974 Minimal structural requirements for adjuvant activity of bacterial peptidoglycan derivatives. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **59** 1317-1325.

Erskine RJ, Tyler JW, Riddell MG, Jr. & Wilson RC 1991 Theory, use, and realities of efficacy and food safety of antimicrobial treatment of acute coliform mastitis. *J.Am.Vet.Med.Assoc.* **198** 980-984.

Fischer W 1988 Physiology of lipoteichoic acids in bacteria. *Adv.Microb.Physiol* **29** 233-302.

Fischer W 1994 Lipoteichoic acid and lipids in the membrane of Staphylococcus aureus. *Med.Microbiol.Immunol.(Berl)* **183** 61-76.

Friton GM, Sobiraj A & Richter A 1998 [Effects of various antibiotic treatments of lactating cows with subclinical mastitis]. *Tierarztl.Prax.Ausg.G.Grosstiere.Nutztiere.* **26** 254-260.

Gangur V, Birmingham NP & Thanesvorakul S 2002 Chemokines in health and disease. *Vet.Immunol.Immunopathol.* **86** 127-136.

Gedek W 1972 *Die Staphylokokken-Mastitis bei Haustieren*. Jena: Gustav Fischer Verlag.

Gedek W 1981 Empfindlichkeitsprüfung von Mastitiserregern gegnüber Penicillinen 2. Staphylococcus aureus. *Tierärztliche Umschau* **36** 767-770.

Gertler A, Cohen N & Maoz A 1983 Human growth hormone but not ovine or bovine growth hormones exhibits galactopoietic prolactin-like activity in organ culture from bovine lactating mammary gland. *Mol.Cell.Endocr.* **33**.

Goldammer T, Zerbe H, Molenaar A, Schuberth H, Brunner R, Kata S & Seyfert H 2004 Matitis Increases Mammary mRNA Abundance of ß-Defensin 5, Toll-Like-Receptor 2 (TLR2), and TLR4 but not TLR9 in Cattle. *Clin.Diagn.Lab Immunol.* **11** 174-185.

Goodman G, Akers M, Friderici K & Tucker H 1983 Hormonal regulation of alpha-lactalbumin secretion from bovine mammary tissue cultured in vitro. *Endocrinology* **112**.

Gronlund U, Johannisson A & Persson WK 2006 Changes in blood and milk lymphocyte sub-populations during acute and chronic phases of Staphylococcus aureus induced bovine mastitis. *Res.Vet.Sci.* **80** 147-154.

Gruys E & Snel FW 1994 Animal models for reactive amyloidosis. *Baillieres Clin.Rheumatol.* **8** 599-611.

Gruys E, Toussaint MJ, Niewold TA & Koopmans SJ 2005 Acute phase reaction and acute phase proteins. *J.Zhejiang.Univ Sci.B* **6** 1045-1056.

Hamann J & Fehlings K 2003 Zur Ökonomie der Mastitistherapie. In pp 150-163. Kiel: DVG.

Harada A, Sekido N, Akahoshi T, Wada T, Mukaida N & Matsushima K 1994 Essential involvement of interleukin-8 (IL-8) in acute inflammation. *J.Leukoc.Biol.* **56** 559-564.

Harmon RJ 1994 Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. *J.Dairy Sci.* **77** 2103-2112.

Harz H, Burgdorf K & Holtje JV 1990 Isolation and separation of the glycan strands from murein of Escherichia coli by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Anal.Biochem.* **190** 120-128.

Hermann C, Spreitzer I, Schroder NW, Morath S, Lehner MD, Fischer W, Schutt C, Schumann RR & Hartung T 2002 Cytokine induction by purified lipoteichoic acids from various bacterial species--role of LBP, sCD14, CD14 and failure to induce IL-12 and subsequent IFN-gamma release. *Eur.J.Immunol.* **32** 541-551.

Hess E & Egger B 1969 Correlation between the cell count in milk and the results of histological and bacteriological examinations. *J.Dairy Sci.* **83** 418-429.

Hill AW & Shears AL 1979 Recurrent coliform mastitis in the dairy cow. *Vet.Rec.* **105** 299-301.

Hoeben D, Burvenich C & Trevesi E 2000 Role of endotoxin and TNF alpha in the pathogenesis of experimentally induced coliforme mastitis in periparturient cows. *J.Dairy Res.* **67** 503-514.

Hoedemaker M, Korff B, Edler B, Emmert M & Bleckmann E 2001 Dynamics of Staphylococcus aureus infections during vaccination with an autogenous bacterin in dairy cattle. *J.Vet.Med.B Infect.Dis.Vet.Public Health* **48** 373-383.

Hogan JS, Smith KL, Hoblet KH, Schoenberger PS, Todhunter DA, Hueston WD, Pritchard DE, Bowman GL, Heider LE, Brockett BL & . 1989 Field survey of clinical mastitis in low somatic cell count herds. *J.Dairy Sci.* **72** 1547-1556.

Holmberg O & Concha C 1985 The function of leucocytes in mammary secretion. *Kieler Milchwirtschaftlicher Forschungsbericht* **37** 458-461.

Horadagoda N, Knox K, Gibbs H, Reid S, Horadagoda A, Edwards S & Eckersall PD 1999 Acute phase proteins in cattle: discrimination between acute and chronic inflammation. *Vet.Rec.* **144** 437-441.

Howard CJ, Taylor G & Brownlie J 1980 Surface receptors for immunoglobulin on bovine polymorphonuclear neutrophils and macrophages. *Res.Vet.Sci.* **29** 128-130.

Ibelgaufts H 1995 *Dictionary of cytokines*. Basel, Schweiz: Editiones Roche.

Jackson JA, Shuster DE, Silvia WJ & Harmon RJ 1990 Physiological responses to intramammary or intravenous treatment with endotoxin in lactating dairy cows. *J.Dairy Sci.* **73** 627-632.

Jain N & Lasmanis J 1978 Leucocytic changes in cowsgiven intravenous injections of Escherichia coli endotoxin. *Res.Vet.Sci.* **24** 386-387.

Jensen L & Whitehead A 1998 Regulation of serum amyloid A protein expression during the acute -phase response. *Biochem.J.* **334** 489-503.

Jung HK 1999 Identification of serotype by use of serologic assay and detection of the enterotoxin gene of Escherichia coli by means of a polymerase chain reaction assay for isolates from pigs, chickens, and cows. *Am.J.Vet.Res.* **60** 468-472.

Jungi T 2000 *Klinische Veterinärimmunologie*. Stuttgart: Enke Verlag.

Keller R 2000 *Immunologie und Immunpathologie*. Stuttgart: Thieme Verlag.

Kerr DE & Wellnitz O 2003 Mammary expression of new genes to combat mastitis. *J.Anim Sci.* **81 Suppl 3** 38-47.

Kirchner H, Kruse A, Neustock P & Rink L 1994 *Cytokine und Interferone*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag GmbH.

Koj A 1996 Initiation of acute phase response and synthesis of cytokines. *Biochim.Biophys.Acta* **1317** 84-94.

Kopp E & Medzhitov R 2003 Recognition of microbial infection by Toll-like receptors. *Curr.Opin.Immunol.* **15** 396-401.

Kopp EB & Medzhitov R 1999 The Toll-receptor family and control of innate immunity. *Curr.Opin.Immunol.* **11** 13-18.

Lam TJ, Lipman LJ, Schukken YH, Gaastra W & Brand A 1996 Epidemiological characteristics of bovine clinical mastitis caused by Staphylococcus aureus and Escherichia coli studied by DNA fingerprinting. *Am.J.Vet.Res.* **57** 39-42.

Larson MA, Weber A, Weber AT & McDonald TL 2005 Differential expression and secretion of bovine serum amyloid A3 (SAA3) by mammary epithelial cells stimulated with prolactin or lipopolysaccharide. *Vet.Immunol.Immunopathol.* **107** 255-264.

Lehner MD, Morath S, Michelsen KS, Schumann RR & Hartung T 2001 Induction of cross-tolerance by lipopolysaccharide and highly purified lipoteichoic acid via different Toll-like receptors independent of paracrine mediators. *J.Immunol.* **166** 5161-5167.

Lerondelle C & Poutrel B 1984 Characteristics of non-clinical mammary infections of goats. *Ann.Rech.Vet.* **15** 105-112.

Linton AH, Howe K, Sojka WJ & Wray C 1979 A note on the range of Escherichia coli O-serotypes causing clinical bovine mastitis and their antibiotic resistance spectra. *J.Appl.Bacteriol.* **46** 585-590.

Linton AH & Robinson TC 1984 Studies on the association of Escherichia coli with bovine mastitis. *Br.Vet.J.* **140** 368-373.

Lipman LJ, de Nijs A, Lam TJ & Gaastra W 1995 Identification of Escherichia coli strains from cows with clinical mastitis by serotyping and DNA polymorphism patterns with REP and ERIC primers. *Vet.Microbiol.* **43** 13-19.

MacKay CR 2001 Chemokines: immunology's high impact factors. *Nat.Immunol.* **2** 95-101.

Majcherczyk PA, Rubli E, Heumann D, Glauser MP & Moreillon P 2003 Teichoic acids are not required for Streptococcus pneumoniae and Staphylococcus aureus cell walls to trigger the release of tumor necrosis factor by peripheral blood monocytes. *Infect.Immun.* **71** 3707-3713.

Mamo W, Froman G & Wadstrom T 1988 Interaction of sub-epithelial connective tissue components with Staphylococcus aureus and coagulase-negative staphylococci from bovine mastitis. *Vet.Microbiol.* **18** 163-176.

Mancuso G, Tomasello F, Ofek I & Teti G 1994 Anti-lipoteichoic acid antibodies enhance release of cytokines by monocytes sensitized with lipoteichoic acid. *Infect.Immun.* **62** 1470-1473.

McClenahan DJ, Evanson OA, Walcheck BK & Weiss DJ 2000 Association among filamentous actin content, CD11b expression, and membrane deformability in stimulated and unstimulated bovine neutrophils. *Am.J.Vet.Res.* **61** 380-386.

McDonald TL, Larson MA, Mack DR & Weber A 2001 Elevated extrahepatic expression and secretion of mammary-associated serum amyloid A 3 (M-SAA3) into colostrum. *Vet.Immunol.Immunopathol.* **83** 203-211.

McGrath M 1987 A novel system for mammary epithelial cell culture. *J.Dairy Sci.* **70**.

Morath S, Geyer A & Hartung T 2001 Structure-function relationship of cytokine induction by lipoteichoic acid from Staphylococcus aureus. *J.Exp.Med.* **193** 393-397.

Morath S, Stadelmaier A, Geyer A, Schmidt RR & Hartung T 2002 Synthetic lipoteichoic acid from Staphylococcus aureus is a potent stimulus of cytokine release. *J.Exp.Med.* **195** 1635-1640.

Morr M, Takeuchi O, Akira S, Simon MM & Muhlradt PF 2002 Differential recognition of structural details of bacterial lipopeptides by toll-like receptors. *Eur.J.Immunol.* **32** 3337-3347.

Moser B & Willimann K 2004 Chemokines: role in inflammation and immune surveillance. *Ann.Rheum.Dis.* **63 Suppl 2** ii84-ii89.

Mselli-Lakhal L, Guigen F, Fornazero C, Favier C, Durand J, Grezel D, Moussa A, Mornex J & Chebloune Y 2001 Immortalized goat milk epithelial cell lines replicated CAEV at high level. *Vet.Res.* **32** 429-440.

Nakayama T, Sonoda S, Urano T, Yamada T & Okada M 1993 Monitoring both serum amyloid protein A and C-reactive protein as inflammatory markers in infectious diseases. *Clin.Chem.* **39** 293-297.

Nelson PJ, Pattison JM & Krensky AM 1997 Gene expression of RANTES. *Methods Enzymol.* **287** 148-162.

Nemeth J, Muckle CA & Gyles CL 1994 In vitro comparison of bovine mastitis and fecal Escherichia coli isolates. *Vet.Microbiol.* **40** 231-238.

Nickerson S, Heald C, Bibb T & McGilliard M 1978 Cytological effects of hormones and plasma on bovine mammary tissue in vitro. *J.Endocrinol.* **79**.

Norimatsu M, Ono T, Aoki A, Ohishi K & Tamura Y 1995 In-vivo induction of apoptosis in murine lymphocytes by bacterial lipopolysaccharrides. *J.Med.Microbiol.* **43** 251-257.

Okada H, Ohtsuka H, Kon NS, Kirisawa R, Yokomizo Y, Yoshino T & Rosol TJ 1999 Effects of lipopolysaccharide on production of interleukin-1 and interleukin-6 by bovine mammary epithelial cells in vitro. *J.Vet.Med.Sci.* **61** 33-35.

Oliver SP & Jayarao BM 1997 Coagulase-negative staphylococcal intramammary infections in cows and heifers during the nonlactating and periparturient periods. *Zentralbl.Veterinarmed.B* **44** 355-363.

Opitz B, Schroder NW, Spreitzer I, Michelsen KS, Kirschning CJ, Hallatschek W, Zahringer U, Hartung T, Gobel UB & Schumann RR 2001 Toll-like receptor-2 mediates Treponema glycolipid and lipoteichoic acid-induced NF-kappaB translocation. *J.Biol.Chem.* **276** 22041-22047.

Oseas R, Yang HH, Baehner RL & Boxer LA 1981 Lactoferrin: a promoter of polymorphonuclear leukocyte adhesiveness. *Blood* **57** 939-945.

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

Paape MJ, Schutze W, Desjardins C & Miller RH 1974 Plasma corticosteroid, circulating leukocyte and milk somatic cell responses to Escherichia coli endotoxin induced mastitis. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* **145** 553-559.

Pareek R, Wellnitz O, Van Dorp R, Burton J & Kerr D 2005 Immunorelevant gene expression in LPS-challenged bovine mammary epithelial cells. *J.Appl.Genet.* **46** 171-177.

Persson WK, Colditz IG & Seow H 1997 Accumulation of leucocytes and cytokines in the lactating ovine udder during mastitis due to Staphylococcus aureus and Escherichia coli. *Res.Vet.Sci.* **62** 63-66.

Persson WK, Colditz I, Lun S & Östensson K 2003 Cytokines in mammary lymph and milk during endotoxin-induced bovine mastitis. *Res.Vet.Sci.* **74** 31-36.

Phuektes P, Mansell PD, Dyson RS, Hooper ND, Dick JS & Browning GF 2001 Molecular epidemiology of Streptococcus uberis isolates from dairy cows with mastitis. *J.Clin.Microbiol.* **39** 1460-1466.

Pohl P, Oswald E, Van Muylem K, Jacquemin E, Lintermans P & Mainil J 1993 Escherichia coli producing CNF1 and CNF2 cytotoxins in animals with different disorders. *Vet.Res.* **24** 311-315.

Prgomet C, Sarikaya H, Bruckmaier R & Pfaffl M 2005 Short-term effects on pro-inflammatory cytokine, lactoferrin and CD14 mRNA expression levels in bovine immunoseperated milk and blood cells treated by LPS. *Journal of Veterinary Medicine* **A52** 317-324.

Radostits, Otto M, Gay CC, Blood DC & Hinchcliff KW 2000 *Veterinary Medicine*. Elsevier Health Sciences.

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

Rahmann G 2001 Breeding goats for organic production in Germany. *Proceedings of 4th NAHWOA Workshop, March 2001, Wageningen, Netherlands*.

Rainard P, Riollet C, Poutrel B & Paape MJ 2000 Phagocytosis and killing of Staphylococcus aureus by bovine neutrophils after priming by tumor necrosis factor-alpha and the des-arginine derivative of C5a. *Am.J.Vet.Res.* **61** 951-959.

Rambeaud M, Almeida RA, Pighetti GM & Oliver SP 2003 Dynamics of leukocytes and cytokines during experimental induced Streptococcus uberis mastitis. *Vet.Immunol.Immunopathol.* **96** 193-205.

Reichmuth J 1975 Somatic cell counting-interpretation of results. *IDF* **85** 93-124.

Riley LW 1987 The epidemiologic, clinical, and microbiologic features of hemorrhagic colitis. *Annu.Rev.Microbiol.* **41** 383-407.

Riollet C, Rainard P & Poutrel B 2000 Differential induction of complement fragment C5a and inflammatory cytokines during intramammary infections with Escherichia coli and Staphylococcus aureus. *Clin.Diagn.Lab Immunol.* **7** 161-167.

Rolle M & Mayr A 2002 *Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*. Stuttgart: Enke Verlag.

Rose RK & Hogg SD 1995 Competitive binding of calcium and magnesium to streptococcal lipoteichoic acid. *Biochim.Biophys.Acta* **1245** 94-98.

Rossi D & Zlotnik A 2000 The biology of chemokines and their receptors. *Annu.Rev.Immunol.* **18** 217-242.

Saa E & Kruze J 1995 [Virulence factors of coagulase-negative Staphylococcus of human and bovine origin]. *Rev.Latinoam.Microbiol.* **37** 201-208.

Sanchez-Carlo V, McDonald JS & Packer RA 1984 Virulence factors of Escherichia coli isolated from cows with acute mastitis. *Am.J.Vet.Res.* **45** 1775-1777.

Sanchez-Cordon P, Nunez A, Salguero F, Pedrera M, Fernandez de Marco M & Gomez-Villamandos J 2005 Lymphocyte apoptosis and trombocytopenia in spleen during classical swine fever:role of macrophages and cytokines. *Vet.Pathol.* **42** 477-488.

Schällibaum 1991 Bakteriologische Befunde bei Mastitiden des Rindes in der Schweiz zitiert von Schulz (1994). In *Euter- und Gesäugekrankheiten*, pp 230. Eds Wendt K, Bostedt H, Mielke H & Fuchs HW. Jena: Gustav Fischer Verlag.

Schleifer KH & Kandler O 1972 Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol.Rev.* **36** 407-477.

Schmidt E, Franke W, Grund C, Schiller D, Heiderose K & Paweletz N 1983 An epithelial cell line with elongated myoid morphology derived from bovine mammary gland. *Exp.Cell Res.* **164**.

Schroder NW, Morath S, Alexander C, Hamann L, Hartung T, Zahringer U, Gobel UB, Weber JR & Schumann RR 2003 Lipoteichoic acid (LTA) of Streptococcus pneumoniae and Staphylococcus aureus activates immune cells via Toll-like receptor (TLR)-2, lipopolysaccharide-binding protein (LBP), and CD14, whereas TLR-4 and MD-2 are not involved. *J.Biol.Chem.* **278** 15587-15594.

Schroedl W, Fuerll B, Reinhold P, Krueger M & Schuett C 2001 A novel acute phase marker in cattle: lipopolysaccharide binding protein (LBP). *J.Endotoxin.Res.* **7** 49-52.

Schukken YH, Lam TJ, Nielen M, Hogeveen H, Barkema HW & Grommers FJ 1995 [Subclinical and clinical mastitis on dairy farms in The Netherlands: epidemiological developments]. *Tijdschr.Diergeneeskd.* **120** 208-213.

Schulz J 1994 Erkrankungen der Milchdrüse des Rindes. In *Euter- und Gesäugekrankheiten*, Eds Wendt K, Bostedt H, Mielke H & Fuchs HW. Jena Stuttgart: Gustav Fischer Verlag.

Seffner W & Bergmann A 1994 Staphylokokken-Infektion. In *Euter- und Gesäugekrankheiten*, pp 349-359. Eds Wendt K, Bostedt H, Mielke H & Fuchs HW. Jena-Stuttgart: Gustav Fischer Verlag.

Seffner W & Bergmann A 1994 Staphylokokken-Infektion. In *Euter- und Gesäugekrankheiten*, pp 349-359. Eds Wendt K, Bostedt H, Mielke H & Fuchs HW. Jena-Stuttgart: Gustav Fischer Verlag.

Selbitz H 2002 Infektionen und Krankheiten durch grampositive Bakterien. In *Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*, edn 7. Auflage, pp 506-518. Eds Rolle M & Mayr A. Stuttgart: Enke Verlag.

Shockman G & Höltje J-V 1994 Microbial peptidoglycan (murein) hydrolases. In *Bacterial cell wall*, pp 132-166. Eds Ghuysen JM & Hakenbeck R. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science Publishing.

Shuster DE, Harmon RJ, Jackson JA & Hemken RW 1991 Suppression of milk production during endotoxin-induced mastitis. *J.Dairy Sci.* **74** 3763-3774.

Silva E, Siqueira A, Martins JCD, Ferreira WPB & Silva N 2004 Identification and in vitro antimicrobial susceptibility of Staphylococcus species isolated from goat mastitis in th Northeast of Brazil. *Small Ruminant Research* **55** 45-49.

Sobiraj A, Kron A, Schollmeyer U & Failing K 1997 [Federal investigations on the distribution and in vitro resistance of udder pathogenic bacteria in the milk of cows with subclinical mastitis]. *Tierarztl.Prax.* **25** 108-115.

Sordillo LM & Streicher KL 2002 Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *J.Mammary.Gland.Biol.Neoplasia.* **7** 135-146.

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

Suffredini AF, Fantuzzi G, Badolato R, Oppenheim JJ & O'Grady NP 1999 New insights into the biology of the acute phase response. *J.Clin.Immunol.* **19** 203-214.

Swain SD, Jutila KL & Quinn MT 2000 Cell-surface lactoferrin as a marker for degranulation of specific granules in bovine neutrophils. *Am.J.Vet.Res.* **61** 29-37.

Tabeta K, Georgel P, Janssen E, Du X, Hoebe K, Crozat K, Mudd S, Shamel L, Sovath S, Goode J, Alexopoulou L, Flavell RA & Beutler B 2004 Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **101** 3516-3521.

Takeda K, Watanabe H, Yonehara S, Yamashita T, Saito S & Sendo F 1993 Rapid accerleration of neutrophil apoptosis by tumor necrosis faktor alpha. *Int.Immunol.* **167** 3555-3558.

Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, Sanjo H, Takada H, Ogawa T, Takeda K & Akira S 1999 Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity.* **11** 443-451.

Takeuchi O, Kawai T, Muhlradt PF, Morr M, Radolf JD, Zychlinsky A, Takeda K & Akira S 2001 Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int.Immunol.* **13** 933-940.

Thiemermann C 2002 Interactions between lipoteichoic acid and peptidoglycan from Staphylococcus aureus: a structural and functional analysis. *Microbes.Infect.* **4** 927-935.

Traeder W & Irion T 1996 Wirtschaftliche Bedeutung der subklinischen Mastitiden und deren Behandlung zum Zeitpunkt des Trockenstellens mit Orbenin Extra. *Tierärztliche Umschau* 362-371.

Travnicek M & Federic F 1994 Euterkrankheiten der kleinen Wiederkäuer. In *Euter- und Gesäugekrankheiten*, Ed Wendt K. Jena und Stuttgart: Gustav Fischer Verlag.

Tumilowicz J & Shirahama S 1969 Abberant characteristics and virus-like particles of bovine mammary cell cultures. *Am.J.Vet.Res.* **30**.

Tyler JW, Cullor JS, Erskine RJ, Smith WL, Dellinger J & McClure K 1992 Milk antimicrobial drug residue assay results in cattle with experimental, endotoxin-induced mastitis. *J.Am.Vet.Med.Assoc.* **201** 1378-1384.

Uehara A, Sugawara S & Takada H 2002 Priming of human oral epithelial cells by interferon-gamma to secrete cytokines in response to lipopolysaccharides, lipoteichoic acids and peptidoglycans. *J.Med.Microbiol.* **51** 626-634.

Valente C, Fruganti G, Tesei B, Ciorba A, Cardaras P, Floris A & Bordoni E 1988 Vaccination of pregnant cows with K99 antigen of enterotoxigenic Escherichia coli and protection by colostrum in newborn calves. *Comp Immunol.Microbiol.Infect.Dis.* **11** 189-198.

van Miert AS 1995 Pro-inflammatory cytokines in a ruminant model: pathophysiological, pharmacological, and therapeutic aspects. *Vet.Q.* **17** 41-50.

Vollmer W & Holtje JV 2004 The architecture of the murein (peptidoglycan) in gram-negative bacteria: vertical scaffold or horizontal layer(s)? *J.Bacteriol.* **186** 5978-5987.

von Aulock S, Schroder NW, Traub S, Gueinzius K, Lorenz E, Hartung T, Schumann RR & Hermann C 2004 Heterozygous toll-like receptor 2 polymorphism does not affect lipoteichoic acid-induced chemokine and inflammatory responses. *Infect.Immun.* **72** 1828-1831.

Wang JE, Jorgensen PF, Almlof M, Thiemermann C, Foster SJ, Aasen AO & Solberg R 2000 Peptidoglycan and lipoteichoic acid from Staphylococcus aureus induce tumor necrosis factor alpha, interleukin 6 (IL-6), and IL-10 production in both T cells and monocytes in a human whole blood model. *Infect.Immun.* **68** 3965-3970.

Weber A, Weber AT, McDonald TL & Larson MA 2005 Staphylococcus aureus lipoteichoic acid induces differential expression of bovine serum amyloid A3 (SAA3) by mammary epithelial cells:Implications for early diagnosis of mastitis. *Vet.Immunol.Immunopathol.* **7216**.

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

Wendt K, Bostedt H, Mielke H & Fuchs H 1994 *Euter- und Gesäugekrankheiten*. Jena und Stuttgart: Gustav Fischer Verlag.

White E & Hinckley L 1999 Prevalence of mastitis pathogens in goat milk. *Small Ruminant Research* **33** 117-121.

Williamson JH, Woolford MW & Day AM 1995 The prophylactic effect of a dry-cow antibiotic against Streptococcus uberis. *N.Z.Vet.J.* **43** 228-234.

Winter P 2002 Mastitis-ein aktuelles Thema. *Fachtagung für Ziegenzüchter und -halter, Bundesanstalt für alpenländische Landwirtschaft Gumpenstein, 8952 Irdning, Österreich*.

Winter P 2004 *bpt-Kongress 2004 Vortragsband Schwein, Rind, kleine Wiederkäuer*. Frankfurt am Main: bpt Akademie GmbH.

Winter P & Colditz IG 2002 Immunological responses of the lactating ovine udder following experimental challenge with Staphylococcus epidermidis. *Vet.Immunol.Immunopathol.* **89** 57-65.

Yang S, Tamai R, Akashi S, Takeuchi O, Akira S, Sugawara S & Takada H 2001 Synergistic effect of muramyldipeptide with lipopolysaccharide or lipoteichoic acid to induce inflammatory cytokines in human monocytic cells in culture. *Infect.Immun.* **69** 2045-2053.

Youngerman SM, Saxton AM, Oliver SP & Pighetti GM 2004 Association of CXCR2 polymorphisms with subclinical and clinical mastitis in dairy cattle. *J.Dairy Sci.* **87** 2442-2448.

Zhang DM & Mao BL 2003 [Relationships between LPS-tolerance and TLR4 as well as its signaling pathway]. *Sheng Li Ke.Xue.Jin.Zhan.* **34** 277-279.

Zhang S & Maddox CW 2000 Cytotoxic activity of coagulase-negative staphylococci in bovine mastitis. *Infect.Immun.* **68** 1102-1108.

Ziv G 1992 Treatment of peracute and acute mastitis. *Vet.Clin.North Am.Food Anim Pract.* **8** 1-15.

## 9. Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Professor Dr. Dr. Heinrich H.D. Meyer für die hervorragenden Arbeitsbedingungen am Institut und die fachlichen Ratschläge.

Meiner Betreuerin Dr. Olga Wellnitz danke ich für die Bereitstellung des spannenden Themengebiets, die sehr gute wissenschaftliche Betreuung, die hervorragende Zusammenarbeit und die regen Diskussionen

Prof. Dr. Bernd Kaspers danke ich für seine Bereitschaft, die Arbeit an der Tierärztlichen Fakultät der LMU-München zu vertreten.

Der wechselnden Belegschaft der „Denkerzentrale“ danke ich für die Unterstützung und Mithilfe, besonders Bettina Griesbeck und Irmgard Riedmaier für die kritische Durchsicht des Manuskripts.

Allen anderen Mit-Doktoranden, technischen Assistenten und restlichen Mitarbeitern des Instituts danke ich für die gute Zusammenarbeit, das nette Arbeitsklima und die Diskussions- und Hilfsbereitschaft auf allen Ebenen.

Der Abteilung Mikrobiologie des Zentralinstituts für Ernährungs- und Lebensmittelforschung, dort im besonderen Dr. Monika Ehling-Schulz, danke ich für das Einweisen in die French Press.

Der Abteilung Tierhygiene des Zentralinstituts für Ernährungs- und Lebensmittelforschung, dort im besonderen Barbara, für die Unterstützung bei der Bakterienaufzucht.

Dr. Kempf vom LGL in Oberschleißheim danke ich für das Bereitstellen der koagulase negativen Staphylokokken.

Den Freunden und Förderern der Milchwissenschaften sei herzlichst für die finanzielle Unterstützung der Arbeit gedankt.

All meinen Freunden danke ich für die unermüdliche Unterstützung, vor allem Diane, Hauke und Vera.

Elena für einfach alles.

Meinen „Ersatzgroßeltern“ Margret und Günther Seuster für Ihren unermüdlichen Beistand.

Nicht zuletzt geht mein größter Dank an meine Eltern, sowie Katti, Markus, Gina und Pia die an mich geglaubt, und immer wieder motiviert und unterstützt haben.

Vielen Dank!

## 10. Lebenslauf

| | |
|---|---|
| **Name:** | Peter Reith |
| **Geburtdatum:** | 19. April 1977 |
| **Geburtsort:** | Lüdenscheid, NRW |
| **Eltern:** | Bärbel Reith<br>Rolf-Dieter Reith |
| **Schulausbildung:** | 1983 – 1987 evangelische Grundschule Werdohl<br>1987 – 1996 Albert-Schweitzer Gymnasium Plettenberg |
| **Zivildienst:** | 1996 – 1997 Johanniter Unfallhilfe e.V. Werdohl |
| **Studium:** | 1998 – 1999 Studium der Tiermedizin an der Szent-Istvan Universität Budapest, Ungarn<br>1999 – 2004 Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians- Universität München |
| **Promotion:** | 2004 – 2006 Promotion am Lehrstuhl für Physiologie der Technischen Universität München in Freising-Weihenstephan<br>dort seit Januar 2005 wissenschaftlicher Mitarbeiter |

**11. Publikation:**

Wellnitz, O.; Reith, P.; Haas, S.C.; Meyer, H.H.D.: Immune relevant gene expression of mammary epithelial cells and their influence on leukocyte chemotaxis in response to different mastitis pathogens. Veterinarni Medicina 51 (2006) 125-132

**Abstracts und Vorträge**:

Reith, P.; Wellnitz, O.: Die Immunantwort von primären Euterepithelzellkulturen auf die Mastitiserreger Escheria coli, Staphylococcus aureus und Streptococcus uberis. – In: Abstractband der „Milchkonferenz 2005“, 29.-30.09.2005, Deutsche Gesellschaft für Milchwissenschaft, Kiel, (2005) S. 45-46

Reith, P.; Wellnitz, O.: Immunrelevant gene expression of primary bovine epithelial cells in response to different mastitis pathogens. – In: Proceedings of the 2nd International qPCR Symposium, Industrial Exhibition, TATAA Application Workshop & qPCR Matrix Workshop, Technische Universität München, Freising-Weihenstephan, 05.-09.09.2005, (2005) Abstr. No. P22, S. 28

Reith, P.; Wellnitz, O.: Einfluß verschiedener Mastitiserreger auf Milchdrüsenepithelzellen *in vitro*; Immunologisches Seminar am Institut für Physiologie, Physiologische Chemie und Tierernährung der Tierärztlichen Fakultät der LMU-München, 05.12.2005