

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

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

Vergleichende Untersuchungen zu frühen Wirt-Pathogen-Interaktionen bei akuter und subklinischer Mastitis des Rindes

Inaugural-Dissertation

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

von

Katharina Mühlbauer
aus Geisenhausen

München 2012

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun

Referent: Univ.-Prof. Dr. Zerbe

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Wolf

Tag der Promotion: 11. Februar 2012

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

Für meine Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis		IV
Abkürzungsverzeichnis.....		VIII
1	EINLEITUNG.....	1
2	LITERATURTEIL.....	4
2.1	Die Mastitis des Rindes.....	4
2.1.1	Wirtschaftliche Bedeutung von Mastitiden.....	4
2.2	Einteilung von Mastitiden.....	5
2.2.1	Subklinische Mastitiden.....	5
2.2.2	Klinische Mastitiden.....	6
2.3	<i>S. aureus</i> als Mastitiserreger.....	6
2.3.1	Reservoir von <i>S. aureus</i>	6
2.3.2	Wachstum von <i>S. aureus</i>	7
2.3.3	<i>S. aureus</i> -spezifische Mechanismen bei der Mastitis-Pathogenese.....	7
2.3.4	Virulenzfaktoren von <i>S. aureus</i>	8
2.4	<i>E. coli</i> als Mastitiserreger.....	11
2.4.1	Reservoir von <i>E. coli</i>	11
2.4.2	Wachstum von <i>E. coli</i>	11
2.4.3	Spezifische Mechanismen bei der Pathogenese der <i>E. coli</i> -Mastitis.....	12
2.4.4	Virulenzfaktoren von <i>E. coli</i>	13
2.5	Frühe Wirtsreaktionen nach mammärer bakterieller Infektion.....	16
2.5.1	Zytokine.....	16
2.5.2	Chemokine.....	18
2.5.3	S100-Proteine.....	19
2.5.4	Defensine.....	19
2.5.5	Weitere früh regulierte Faktoren.....	20
2.6	Untersuchungen zu früh regulierten Genen nach Pathogenkontakt in mammären Zellkulturmodellen.....	23
2.7	Untersuchungen zu früh regulierten Genen nach Pathogenkontakt in Mastitis- Tiermodellen.....	24
3	MATERIAL UND METHODEN.....	27
3.1	Materialien.....	27

3.1.1	Geräte	27
3.1.2	Klinikbedarf	28
3.1.3	Laborbedarf	29
3.1.4	Reagenzien, Medikamente und andere Verbrauchsmaterialien	30
3.1.5	Modellbakterien	31
3.1.6	Versuchstiere.....	33
3.2	Methoden	34
3.2.1	Auswahl der Versuchstiere	34
3.2.2	Präparation der Infektionsdosis.....	35
3.2.3	Voruntersuchung der Versuchstiere am Versuchstag	36
3.2.4	Intramammäre Inokulation einzelner Euterviertel mit <i>E. coli</i> ₁₃₀₃ (Pilotversuch)	36
3.2.5	Intramammäre Inokulation einzelner Euterviertel mit <i>E. coli</i> ₁₃₀₃ und <i>S. aureus</i> ₁₀₂₇	38
3.2.6	Gewinnung von Milchproben	40
3.2.7	Klinische Allgemeinuntersuchung	41
3.2.8	Klinische Untersuchung des Euters	42
3.2.9	Bakteriologische Untersuchung des Eutersekrets	43
3.2.10	Bestimmung der Inhaltstoffe und des somatischen Zellgehaltes (SCC) der Milch	44
3.2.11	Klinische Labordiagnostik	44
3.2.12	Gewinnung von venösem Blut	45
3.2.13	Gewinnung von Blutplasma.....	45
3.2.14	Gewinnung von Gewebeproben.....	45
3.2.15	Molekularbiologische Untersuchungen	47
3.2.16	Untersuchung von Wachstum und Adaptation <i>in vitro</i>	52
3.2.16.1	Gewinnung von Milch unter antiseptischen Bedingungen.....	52
3.2.16.2	Quantifizierung des Wachstums von <i>S. aureus</i> ₁₀₂₇ und <i>E. coli</i> ₁₃₀₃ in Milch nach Voranzüchtung in Medium und Milch.....	53
3.2.17	Statistische Auswertung	55
4	ERGEBNISSE.....	57
4.1	Methodische Vorarbeiten	57
4.1.1	Methodische Vorarbeiten zur Etablierung eines Kurzzeit-Mastitis- Infektionsmodells.....	57

4.2	Vergleichende Untersuchungen zu frühen Wirt-Pathogen-Interaktionen im Rahmen des Kurzzeit-Mastitis-Infektionsmodells <i>in vivo</i>	59
4.2.1	Charakterisierung der Modelltiere	59
4.2.2	Systemische und lokale klinische Veränderungen nach intramammärer Inokulation von <i>E. coli</i> ₁₃₀₃ und <i>S. aureus</i> ₁₀₂₇	60
4.2.2.1	Allgemeiner klinischer Score und Euterscore	60
4.2.2.2	Innere Körpertemperatur	61
4.2.2.3	Blutbild.....	63
4.2.2.4	Grobsinnliche Eigenschaften der Milch.....	63
4.2.3	Somatische Zellzahl in der Milch (SCC)	64
4.2.4	Weitere Milchhaltsstoffe.....	67
4.2.5	Bakteriologische Untersuchung der Milch.....	70
4.2.6	Pathologisch-anatomische Veränderungen	73
4.2.7	mRNA-Expression entzündungsrelevanter Kandidatengene im Eutergewebe nach Exposition mit <i>E. coli</i> ₁₃₀₃ und <i>S. aureus</i> ₁₀₂₇	74
4.2.7.1	Regulation der mRNA-Expression ausgewählter Zytokine	76
4.2.7.2	Regulation der mRNA-Expression ausgewählter Chemokine	80
4.2.7.3	Regulation von S100A9	85
4.2.7.4	Regulation von LAP	87
4.2.7.5	Expression weiterer Kandidatengene	89
4.3	Untersuchungen zum Wachstums- und Adaptationsverhalten von <i>E. coli</i> ₁₃₀₃ und <i>S. aureus</i> ₁₀₂₇ <i>in vitro</i>	95
4.3.1	Wachstum von <i>E. coli</i> ₁₃₀₃ und <i>S. aureus</i> ₁₀₂₇ in LB-Medium und Milch.....	95
4.3.2	Adaptation von <i>E. coli</i> ₁₃₀₃ und <i>S. aureus</i> ₁₀₂₇ an das Nährmedium.....	96
5	DISKUSSION.....	99
5.1	Etablierung eines Kurzzeit-Mastitis-Modells <i>in vivo</i>	99
5.2	Expression immunrelevanter Kandidatengene nach experimenteller Infektion mit <i>E. coli</i> und <i>S. aureus</i>	103
5.2.1	<i>E. coli</i> induziert eine stärkere Wirtsimmunantwort als <i>S. aureus</i>	104
5.2.2	Immunrelevante Kandidatengene werden innerhalb der ersten drei Stunden nach Pathogen-Inokulation überwiegend in distalen Bereichen des Euters reguliert	108
5.3	Untersuchungen zur Adaptation von <i>E. coli</i> ₁₃₀₃ und <i>S. aureus</i> ₁₀₂₇ an das Wachstum in Milch	109

5.4	Schlussbetrachtung.....	111
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	113
7	SUMMARY.....	116
8	LITERATURVERZEICHNIS.....	119
9	ANHANG.....	126
10	DANKSAGUNG.....	128

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

α	Alpha
β	Beta
γ	Gamma
μl	Mikroliter (* 10^6)
AMP	Antimikrobielles Peptid
BHI	Brain-Heart-Infusion-Broth (Hirn-Herz-Bouillon)
bzw.	beziehungsweise
C3	Komplementfaktor 3
CCL20	LARC / Macrophage inflammatory protein-3 α / MIP-3 α
CD14	Cluster Of Differentiation 14
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CF	Clumping Factor (Verklumpungsfaktor)
CFU	Colony Forming Units (Kolonie bildende Einheiten)
CMT	California Mastitis Test
CNF-1/2	Cytotoxic Necrotising Factor-1/2 (zytotoxisch nekrotisierender Faktor 1/2)
CSF	Colony Stimulating Factor (Kolonie stimulierender Faktor)
C_t	Cycle Threshold (Schwellenwertzyklus)
CXCL8	CXC-Motiv-Chemokin 8 / Interleukin-8
CYP1A1	Cytochrom p450-1A1
DAMP	Damage Associated Molecular Pattern (Schadens-assoziiertes molekulares Muster)
DCC	DeLaval [®] Cell Counter
DEG	Differentially Expressed Genes (differentiell exprimierte Gene)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DZ	Drüsenzisterne
<i>Ec</i>	<i>E. coli</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EAEC	enteroadhäsive <i>E. coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EHEC	enterohämorrhagische <i>E. coli</i>
EIEC	enteroinvasive <i>E. coli</i>
EPEC	enteropathogene <i>E. coli</i>
ETEC	enterotoxische <i>E. coli</i>
<i>et al.</i>	et alii / aliae (und andere)
EU	ventrales Euterparenchym
EUd	dorsales Euterparenchym
F	Fürstenberg'sche Rosette
Fc	Fragment Cristalline (kristallisierbarer Antikörperteil)
FnBP	Fibronektin Binding Protein (Fibronektin bindendes Protein)
G	Giga (* 10^9)

g	Gramm
GS	Goldstandardtiere
GTPase	Guanosintriphosphatase
h	hora (Stunde)
HL	hinten links
HR	hinten rechts
ICAM-1	Intercellular Cell Adhesion Molecule-1 (intrazelluläres Adhäsionsmolekül-1)
IE	Internationale Einheit(en)
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IgG	Gammaglobulin
IL	Interleukin
IL-6	Interleukin-6 (Protein)
IL6	Interleukin-6 (Gen)
IL1A/B	Interleukin-1 α/β (Gen)
IQR	Inter Quartile Range (Interquartilsabstand)
l	Liter
LAP	Lingual Antimicrobial Peptide (linguales antimikrobielles Peptid)
LB	Lysogeny Broth (LB-Medium)
LBP	Lipopolysaccharide Binding Protein (Lipopolysaccharid bindendes Protein)
LCN2	Lipocalin-2
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
LPS	Lipopolysaccharid
LTA	Lipoteichonsäure
m	milli (*10 ³)
Max.	Maximum
MD2	Myeloid Differentiation Factor 2 (myeloider Differenzierungsfaktor 2)
MEC	Mammary Epithelial Cells (Milchdrüsenepithelzellen)
min	Minute(n)
Min.	Minimum
ml	Milliliter
MLST	Multilocus Sequence Typing
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MW	arithmetischer Mittelwert
MX2	Myxovirus Resistance-Protein 2
n =	Anzahl der Einzelbeobachtungen
nm	Nanometer
NaCl	Natriumchlorid
n.u.	nicht untersucht
o.b.B.	ohne besonderen Befund

OD	optische Dichte
p	Irrtumswahrscheinlichkeit bei der Analyse der Ähnlichkeit zweier Datengruppen
<i>p. inoc.</i>	<i>post inoculationem</i>
PAMP	Pathogen Associated Molecular Pattern (Pathogen-assoziiertes molekulares Muster)
PbMEC	Primary Bovine Mammary Epithelial Cells (primäre bovine Milchdrüsenepithelzellen)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase Kettenreaktion)
PGF _{2α}	Prostaglandin 2α
PMN	Polymorphonuclear Neutrophils (polymorphkernige neutrophile Granulozyten)
PRR	Pattern Recognition Receptor (Muster-Erkennungsrezeptor)
qRT-PCR.	quantitative real-time Polymerase Chain Reaction (quantitative Echtzeit Polymerasekettenreaktion)
RAGE	Multiligand Receptor for Advanced Glycation End Products
RT	Reverse Transkription
S	Strichkanal
s	Sekunde(n)
S100A9	S100-Protein A9, Calgranulin B
SAK	Staphylokinase
<i>Sa</i>	<i>S. aureus</i>
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
s.c.	subkutan
SCC	Somatic Cell Count (somatische Zellen in der Milch)
SD	Standard Deviation (Standardabweichung)
SEM	Standard Error Of The Mean (Standardfehler)
SpA	Protein A
ST	Sequence Type (Sequenztyp)
<i>Str.</i>	<i>Streptococcus</i>
Stx-1/2	Shiga-Toxin-1/2
TGF-β	Transforming Growth Factor-β (transformierender Wachstumsfaktor-β)
TLR	Toll-like-Receptor (Toll-like-Rezeptor)
TMR	Totale Mischraktion
TNF-α	Tumor Necrosis Factor-α (Tumornekrosefaktor-α, Protein)
TNF	Tumor Necrosis Factor-α (Tumornekrosefaktor-α, Gen)
TSB	Tryptic Soy Broth
TSST-1	Toxic-Shock-Syndrom-Toxin-1 (toxisches Schocksyndrom Toxin-1)
u.a.	unter anderem
v.a.	vor allem
VL	vorne links
VR	vorne rechts

z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
ZZ	Zitenzisterne

1 Einleitung

Die Mastitis des Rindes ist die weltweit teuerste Einzeltierkrankung in der Milchviehwirtschaft [1, 2]. Pro Laktation sind rund 30% der Milchkühe von einer Mastitis betroffen [3]. Daraus resultieren hohe Kosten und Verdienstaufschläge sowie mitunter sogar der Verlust des Tieres [4, 5]. *Escherichia coli* (*E. coli*) und *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) zählen dabei zu den wichtigsten Mastitiserregern. *E. coli* verkörpert mit einem Anteil von 27% der Fälle den häufigsten Verursacher akuter, z.T. schwerwiegender klinischer Mastitiden [2]. *S. aureus* dagegen ist mit 25-30% der intramammären Infektionen der häufigste Erreger für subklinische Mastitiden, welche sich zumeist durch einen chronischen Verlauf mit milder oder fehlender Symptomatik auszeichnen und schwer therapierbar sind [6].

Frühe Wirt-Pathogen-Interaktionen sind nach dem Eindringen der Pathogene über den Strichkanal für die Manifestation und den Schweregrad der Euterentzündung von entscheidender Bedeutung [7]. Dabei findet direkt nach der Erregererkennung über zellständige Pathogen-Erkennungs-Rezeptoren eine Aktivierung des angeborenen Immunsystems im Euter statt. Hierbei wird die Expressionsmodulation und Synthese von Immunmediatoren in der Milchdrüse induziert. Die wichtigsten Vertreter dieser endogenen Signalstoffe stellen Zytokine und Chemokine dar, welche v.a. PMN (Polymorphkernige Neutrophile Granulozyten) zur Migration in das betroffene Euterareal sowie zur Phagozytose anregen. Neben den zellulären Mechanismen spielt jedoch auch die vermehrte Bildung antimikrobieller Peptide eine entscheidende Rolle bei frühen Abwehrvorgängen in der Milchdrüse [8, 9].

Veränderungen in der Abundanz von mRNA-Transkripten für Gene solcher endogener Mediatoren und Effektoren gelten als erste messbare Ereignisse nach Erregerkontakt in der bovinen Milchdrüse. Im Zellkulturmodell und kürzlich auch im Tiermodell konnten nach Stimulation mit *E. coli* und *S. aureus* eine Vielzahl differentiell exprimierter Gene (DEG) im Euter identifiziert werden. Die Reaktionsmuster auf die beiden Mastitispathogene stellen sich allerdings sehr unterschiedlich dar. *E. coli* bewirkt hierbei eine deutlich schnellere und stärkere Wirtsantwort als *S. aureus* [10-13]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass bestimmte Gene in verschiedenen Lokalisationen der Milchdrüse unterschiedlich stark reguliert werden und besonders die Gewebe der Zitzen- und Drüsenzisterne eine wichtige Wächterfunktion bei der Erregererkennung und Abwehr im Euter zu übernehmen scheinen [14].

Klinische Symptome und Veränderungen in der Zusammensetzung der Milch treten erst zu späteren Zeitpunkten auf. Daher erscheint es überaus wichtig, erste Signale und grundlegende Mechanismen der sehr frühen Phase einer Mastitis aufzudecken, da diese oftmals den Ausgang der Infektion und den Schweregrad der Entzündung mitbestimmen und bislang nur wenig erforscht wurden. Im Wirt wird nach intialem Erregerkontakt eine komplexe Signalkaskade ausgelöst, um eine effektive Immunantwort bewirken zu können. Aber auch seitens der Pathogene finden vielfältige Veränderungen in der Expression immunologisch wirksamer Proteine und anderer Strukturen statt. Das Vorhandensein einer Vielzahl antibakterieller Faktoren in der Milch erfordert eine möglichst rasche Adaptation an das Milieu im Euter, damit sich die Pathogene vermehren können [7, 15].

Das Hauptziel dieser Arbeit sollte es sein, ein Kurzzeit-Tiermodell zu etablieren, um initiale Vorgänge bei der Entwicklung akuter klinischer sowie subklinischer bis chronischer Mastitiden zu simulieren und erste messbare Veränderungen auf Ebene der Regulation ausgewählter Kandidatengene aufzuzeigen. Im Gegensatz zu vorhergehenden Tiermodellen anderer Arbeitsgruppen sollte dabei eine noch strengere Standardisierung der Versuchstiere erfolgen, um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse sicherzustellen. Anhand eines Pilotversuchs *in vivo* sollten mittels Microarray-Verfahren DEG in verschiedenen Kompartimenten der Milchdrüse identifiziert werden und bei der Auswahl geeigneter Kandidatengene helfen. Auch sollten bestimmte Gene, die bekanntlich in Milchdrüsenepithelzellen *in vitro* früh reguliert werden, ebenfalls als Kandidatengene dienen.

Ein weiteres Ziel war die Untersuchung von Anpassungsvorgängen der Erreger nach dem Eindringen in das Euter. Im Rahmen dieser Arbeit sollte dabei vor allem das Wachstum von *E. coli* und *S. aureus* nach experimenteller Inokulation geprüft werden. Weiterhin sollten ergänzende *in vitro*-Untersuchungen klären, inwieweit eine Anpassung der beiden Pathogene an das Medium Milch Einfluss auf ihre Vermehrungsfähigkeit hat, woraus Rückschlüsse auf eine „Nischenadaptation“ im Euter zu schließen wären.

Die vorliegende Arbeit ist Teil eines wissenschaftlichen Gesamtkonzeptes zur Erforschung der Mastitispathogenese beim Rind. Im Rahmen weiterer Kooperationsprojekte werden frühe Wirt-Pathogen-Interaktionen und damit verbundene lokale und systemische Wirtsmechanismen der Immunabwehr im Zellkultur- und Explantkulturmodell untersucht. Außerdem werden die in dieser Arbeit eingesetzten *E. coli* und

S. aureus durch kooperierende Arbeitsgruppen hinsichtlich genomischer und proteomischer Veränderungen nach Wirtskontakt analysiert. Längerfristiges Ziel ist es, durch prophylaktische Beeinflussung des wirtseigenen Immunsystems Milchkühe vor den Folgen klinischer und subklinischer Mastitiden zu schützen.

2 Literaturteil

2.1 Die Mastitis des Rindes

Unter einer Mastitis versteht man eine Entzündung der milchbildenden und -speichernden Kompartimente der Milchdrüse. Sie wird beim Milchrind überwiegend durch eine intramammäre bakterielle Infektion hervorgerufen. Neben den spezifischen Virulenzmechanismen und dem Wachstumsverhalten von Mastitiserregern spielen auch Umweltfaktoren und Kuh-assoziierte Faktoren wie allgemeine und lokalspezifische Abwehrmechanismen eine bedeutende Rolle. Auch durch traumatische und chemische Einflüsse kann das Risiko einer Erkrankung erhöht werden, weshalb man bei der Mastitis des Rindes auch von einer multifaktoriellen Erkrankung spricht [4, 16, 17].

Die intramammäre Infektion erfolgt zumeist auf galaktogenem Weg. Nach Invasion in den Strichkanal und die Zitzenzisterne erfolgt die Besiedelung des milchbildenden Drüsenparenchyms über die Drüsenzisterne und das System der Milchgänge. Die spezifischen Eigenschaften der Mikroorganismen und die Reaktion des Wirts bestimmen nun, ob die Erreger erfolgreich eliminiert werden können, oder sich eine subklinische oder klinische Mastitis entwickelt [18, 19].

2.1.1 Wirtschaftliche Bedeutung von Mastitiden

Neben der möglichen Beeinträchtigung des Allgemeinzustandes der Tiere dürfen wirtschaftliche Aspekte bei Entzündungen des Euters nicht außer Acht gelassen werden. Die Mastitis gilt als eine der häufigsten und kostenintensivsten Einzeltierkrankungen der Milchwirtschaft. Etwa 30% der Milchkühe erkranken jährlich an einer Mastitis [1, 3]. Finanzielle Verluste entstehen hierbei durch reduzierte Milchleistung, Medikamentenkosten, tierärztliche Behandlung und zusätzlichen Arbeitsaufwand sowie Anfälligkeit für andere Krankheiten, Ansteckungsgefahr für andere Tiere und Ausmerzung schwer betroffener Tiere [2, 4, 5]. Vor allem bei subklinischen Mastitiden, die oftmals unerkant bleiben und bis zu 50mal häufiger auftreten als klinische Euterentzündungen, treten insbesondere durch die verringerte Milchleistung betroffener Tiere die höchsten finanziellen Verluste auf. Der Milchverlust kann dann rund 70% der Gesamtkosten einer subklinischen Euterentzündung ausmachen. Mit ansteigendem Zellgehalt der Milch steigt auch der Milchrückgang prozentual an. Klinische Formen dagegen sind meist von kürzerer Dauer, bleiben nur selten unerkant und können somit häufig früher behandelt werden [3-5, 16, 20].

2.2 Einteilung von Mastitiden

Übergreifend können Mastitiden in zwei Formen eingeteilt werden [2, 21]:

a) die kontagiöse Mastitis, bei der die Übertragung kontagiöser Bakterien v.a. während des Melkens geschieht. Hierzu gehören vor allem die Erreger, die überwiegend subklinische Euterentzündungen hervorrufen, wie *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), aber auch *Streptococcus agalactiae* und *Streptococcus dysgalactiae*.

b) die Umwelt-assoziierte Mastitis, wo das Eindringen z.B. koliformer Umweltkeime aus der Umgebung des Tieres v.a. in der Zwischenmelkzeit stattfindet und anschließend hauptsächlich akute, transiente Mastitiden ausgelöst werden [2, 21].

Des Weiteren ist eine Einteilung der Mastitiden nach dem klinischen Verlauf möglich und sinnvoll. Hierbei unterscheidet man chronische subklinische und akute klinische Euterentzündungen.

2.2.1 Subklinische Mastitiden

Subklinische Mastitiden werden besonders häufig durch Staphylokokken und Streptokokken und somit von typischen Vertretern der kontagiösen Mastitiserreger ausgelöst, welche meist keine starke Pathogenität aufweisen [22]. Abhängig von dem Schweregrad der Entzündung und dem Laktationsstadium treten allerdings Verluste von 10-25% der gesamten Milchleistung innerhalb einer Laktation auf. Bei einer subklinischen Mastitis können meist keine Veränderungen am Euter beobachtet werden, die Milch erscheint grobsinnlich unauffällig, weist jedoch erhöhte Zellzahlen (SCC – Somatic Cell Count) auf. Ursächliche Erreger können, müssen aber nicht in der Milch nachweisbar sein, da eine intermittierende Ausscheidung stattfinden kann. Der Verlauf solch einer Mastitis ist mild, resultiert aber häufig in einem chronischen Prozess, bei dem die Keime monate- bis lebenslang im Euter persistieren können [6].

S. aureus ist mit 25-30% der intramammären Infektionen der häufigste und wichtigste Verursacher subklinischer Mastitiden. Es besteht ein Gleichgewicht zwischen Erregervermehrung und -abwehr in der Milchdrüse, wobei es durch intrazelluläre Besiedelung zur Umgehung des Immunsystems und somit zur Persistenz der Bakterien kommt. Die Infektion erfolgt typischerweise während oder kurz nach dem Melken über kontaminierte Melkgerätschaften und das Personal, also durch mangelnde Hygiene. Die Erreger werden so von Tier zu Tier verschleppt und können sich im Bestand ausbreiten [2, 6].

2.2.2 Klinische Mastitiden

Klinische Mastitiden werden vor allem durch koliforme Keime, aber auch durch Streptokokken, Staphylokokken, *Arcanobacterium pyogenes* und eine Fülle weiterer unbedeutenderer Pathogene verursacht [22]. In Großbritannien ist *Escherichia coli* (*E. coli*) mit 27% der Fälle der häufigste Verursacher klinischer Euterentzündungen, gefolgt von *Streptococcus uberis* mit 23% [2].

Im Gegensatz zu subklinischen Euterinfektionen gehen sie mit mehr oder weniger deutlich ausgeprägten klinischen Symptomen einher. Hierzu gehören bei schwerwiegendem Verlauf eine massive Beeinträchtigung des Allgemeinbefindens, hohes Fieber, Appetitlosigkeit, Apathie, reduzierte Magen-Darm-Tätigkeit und meist starker Milchrückgang [23]. Das betroffene Viertel zeigt die typischen Kardinalsymptome einer Entzündung. Es ist vergrößert, verhärtet, gerötet und schmerzhaft [24]. Bei der Adspektion der Milch lassen sich grobsinnliche Veränderungen feststellen. Es können Abweichungen in Farbe und Konsistenz sowie Beimengungen auftreten. Häufig findet man feine bis grobe Flocken im Sekret. Die Erhöhung des SCC übersteigt deutlich die bei subklinischen Mastitiden vorliegenden Werte [25, 26].

2.3 *S. aureus* als Mastitiserreger

Subklinische Mastitiden aufgrund von Infektionen mit *S. aureus* treten wie bereits erwähnt sehr häufig auf und haben weltweite Bedeutung. In einer Studie von Tenhagen et al. (2006) konnte *S. aureus* als Mastitispathogen mit der höchsten Prävalenz (5,7%) bei klinisch gesunden Kühen in Brandenburg identifiziert werden. Eine Behandlung trockenstehender Kühe kann die Prävalenz von *S. aureus* jedoch deutlich reduzieren [27].

2.3.1 Reservoir von *S. aureus*

Als Reservoir von *S. aureus* gelten hauptsächlich infizierte Kühe, von denen die Keime über Melkgerätschaften und Melkpersonal auf andere Tiere des Bestandes übertragen werden können. Heckmann et al. (1981) konnten auf Zitzengummis und dort vermehrt in kleinsten Haarrissen und Poren sowie auf Melkerhänden *S. aureus* nachweisen [28, 29]. Da die Bakterien natürliche Bewohner von Haut und Schleimhaut sind, haben Zitzen- und Hautverletzungen für die intramammäre Besiedelung große Bedeutung [30].

2.3.2 Wachstum von *S. aureus*

Staphylococcus aureus vermehrt sich fakultativ anaerob, bildet keine Sporen, ist Katalase-positiv sowie Oxidase-negativ und stellt als kokkoides Bakterium von 0,5 - 1,5 µm einen natürlichen Kommensalen von Haut und Schleimhaut dar [6]. *S. aureus* ist charakterisiert durch ein schnelles Wachstum auf Blutagar und in anderen nicht-selektiven Medien sowohl unter aeroben, als auch unter anaeroben Bedingungen, was die Vermehrung und Ansiedelung in der Milchdrüse erheblich begünstigt. Im Euter repliziert sich *S. aureus* sehr schnell, und es können Keimdichten von 10^8 CFU (Colony Forming Units)/ml Milch erreicht werden. Die Adaptationsmechanismen während der ersten Stunden der Infektion scheinen einen entscheidenden Einfluss auf den Ausgang und Verlauf der Euterentzündung zu haben [31]. Durch Wachstum in Milch finden auch auf Genomebene des Pathogens entscheidende Veränderungen statt. So konnten Mamo et al. (1991) eine gesteigerte Pathogenität und Virulenz in Milch angezüchteter *S. aureus* im Maus-Mastitis-Modell belegen [32]. Außerdem stehen *S. aureus* mannigfache Enzyme zur Verfügung, die die Nutzung von Milchbestandteilen wie Laktose und Kaseine zur Energiegewinnung ermöglichen. Somit sind die Keime gut an das Überleben in der Milchdrüse adaptiert und können nach Invasion in Epithelzellen auch über längere Zeit im Euter persistieren [2, 6, 33, 34].

2.3.3 *S. aureus*-spezifische Mechanismen bei der Mastitis-Pathogenese

Nach laktogenem Eindringen erfolgt eine Besiedlung des Strichkanals durch Adhäsion an keratinisierte Epithelzellen. Bei Kontakt mit Milch sowie bei Drucksteigerung im Euter, wie z.B. vor dem Melken oder beim Aufstehen und Hinlegen, wird das Vordringen in die Zitzenzisterne begünstigt [6]. In der Milch findet *S. aureus* ideale Umweltbedingungen vor und kann sich rapide vermehren. Initiale Mechanismen der Immunabwehr des Wirtes werden hierbei scheinbar nur schwach aktiviert. So konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von Erregererkennungsrezeptoren und nachgeschalteten Genen ausbleibt oder vergleichsweise gering ausgeprägt ist. Die Reaktion der wirtseigenen Abwehr auf eine intramammäre Infektion mit *S. aureus* geschieht somit stark verzögert und abgeschwächt. Die genauen molekularen Mechanismen sind derzeit jedoch noch ungeklärt [6, 10, 12, 35].

Charakteristisch für *S. aureus* als Mastitiserreger ist seine Fähigkeit, in Epithelzellen und Makrophagen zu überleben und sogenannte Mikroabszesse zu bilden. Dort sind die Bakterien vor Phagozytose und antimikrobiell wirksamen Substanzen geschützt. Eine

Ausscheidung erfolgt dann zumeist nur intermittierend. Oft können trotz einer bestehenden, persistenten Infektion keine Erreger in der Milch betroffener Tiere nachgewiesen werden [2, 6, 36].

2.3.4 Virulenzfaktoren von *S. aureus*

Die Pathogenität von *S. aureus* beruht auf der Wirkung einer Vielzahl von Enzymen und Toxinen, die zusammenfassend in Tabelle 1 wiedergegeben und im Folgenden näher erläutert werden.

Als Pendant zum Lipopolysaccharid (LPS, Synonym Endotoxin) gramnegativer Bakterien besitzen grampositive Keime wie *S. aureus* mit der Lipoteichonsäure (LTA) ebenfalls ein hochkonserviertes Pathogen-assoziiertes molekulares Muster (PAMP) in Form eines Zellwandbestandteiles. Die Wirkung besteht in einer Aktivierung des angeborenen Immunsystems durch Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren und Bildung und Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen [37].

Die Bedeutung von Exotoxinen wie Hämolysinen und Leukozidinen ist unter verschiedenen Stämmen von *S. aureus* sehr unterschiedlich ausgeprägt. So können 20-50% der Stämme das stark toxische α -Hämolysin Cytolysin bilden und 75-100% das weniger toxische β -Hämolysin C-Sphingomyelinase. Beide besitzen die Fähigkeit, an Zellmembranen zu binden und durch Bildung von Poren die Wirtszellen, insbesondere Leukozyten, Erythrozyten und Thrombozyten, zu zerstören. Außerdem sind fast alle *S. aureus*-Isolate aus bovinen intramammären Infektionen in der Lage, Leukozidine freizusetzen, welche ebenfalls zytolytisch und toxisch auf Leuko- und Erythrozyten wirken, die Migration von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) hemmen und das umliegende Gewebe stark schädigen. Zudem induzieren sie auch proinflammatorische Reaktionen in den Wirtszellen [6, 38].

Staphylokokken-Enterotoxine können in etwa 65% der aus subklinisch infizierten Eutervierteln gewonnenen Isolate gefunden werden. Sie aktivieren T-Zellen und führen zu einer unkontrollierten Freisetzung von Interleukin-1 (IL-1), Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und weiteren Signalstoffen [39, 40].

Das Toxic-Shock-Syndrom-Toxin-1 (TSST-1) ist ein wichtiges proteinöses *S. aureus*-Toxin, welches T-Lymphozyten aktiviert und Entzündungsfaktoren wie Interferon- γ (IFN- γ) und IL-1 freisetzt. Es kann in rund 20% der Mastitis-Isolate nachgewiesen werden. Es ist maßgeblich am Krankheitsbild des toxischen Schocksyndroms beteiligt

und kann zu einem akuten, lebensbedrohlichen Krankheitsbild führen [6, 36].

Des Weiteren spielen Adhäsine eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese der *S. aureus*-Mastitis. Über das Fibronektin-bindende Protein (FnBP), welches an der Oberfläche der Keime angesiedelt ist, erfolgt eine Anheftung an Epithel- und Endothelzellen, insbesondere an Mikroläsionen, wo Fibronektin und Kollagen freiliegen [33, 34, 36, 41].

Um die Bakterien vor der Phagozytose durch Immunzellen des Wirtes zu schützen hat *S. aureus* verschiedene Strategien, sogenannte antiphagozytäre Faktoren, entwickelt. Hierzu zählt die Bildung eines Biofilmes, zu welcher etwa 37,5% der Isolate in der Lage sind. Dadurch wird es *S. aureus* ermöglicht, sich an das Milchdrüsenepithel zu heften und dort eine schützende Umhüllung aus Exopolysaccharid-Polymeren auszubilden. Diese schützt einerseits vor Phagozytose, aber auch vor Antibiotika und begünstigt die Erregerpersistenz [42, 43]. Weiterhin beinhaltet die Zellwand von 50-60% der *S. aureus*-Stämme das Protein A (SpA), welches durch Bindung an das Fc-Fragment von Immunglobulinen die Opsonierung von *S. aureus* verhindert [6]. Vermutet wird außerdem, dass sich die Mastitiserreger durch Ausbildung einer Kapsel oder Pseudokapsel vor phagozytierenden Wirtszellen schützen [6, 44].

Fast alle Koagulase-positiven Staphylokokken wie *S. aureus* bilden auch den sogenannten Clumping Factor (CF), der die Verklumpung von Blutplasma bewirkt. So wird eine Fibrinbarriere ausgebildet, welche die Erkennung durch Zellen des Immunsystems erschwert und damit die Entwicklung chronischer Mastitiden durch Maskierung vor der Abwehr des Wirtes begünstigt. Hinzukommend induziert CF die Verklumpung der Staphylokokken selbst, was ebenfalls Schutz vor Phagozyten bietet [19, 44-47].

Darüberhinaus kann *S. aureus* über ein weiteres Repertoire an Enzymen, wie Hyaluronidase, Phosphatase, Nuklease, Lipase, Katalase, Protease, Kollagenase, Staphylokinase (SAK) und andere verfügen, welche allesamt bei der Etablierung einer Infektion behilflich sind [6, 47].

Tabelle 1: *S. aureus*: Virulenzfaktoren und deren Wirkung

Faktor	Wirkung
Lipoteichonsäure (LTA)	Aktivierung des Immunsystems, Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen [37]
α -Hämolysin (Cytolysin)	Porenbildung bei Wirtszellen, Vasokonstriktion [6]
β -Hämolysin	Membrangift, induziert Entzündung, Ödem und PMN-Infiltration [6]
Leukotoxine (Leukozidin)	zytolytisch, Freisetzung von Entzündungsmediatoren [6]
Staphylokokken-Enterotoxine A-Q (exklusive F)	Aktivierung von T-Zellen und Freisetzung von IL-1, TNF- α und weiteren Entzündungsmediatoren [6, 39, 40]
Toxic-Shock-Syndrom-Toxin (TSST-1)	Aktivierung von T-Lymphozyten und Freisetzung von IFN- γ und IL-1, fördert Adhäsion und Invasion [6]
Fibronektin-bindendes Protein (FnBP)	ermöglicht Anheftung an Epithel- und Endothelzellen, Fibroblasten und Drüsenzellen [36, 41]
Protein A (SpA)	bindet IgG am Fc-Fragment und verhindert so die Opsonierung [6]
second Ig-binding Protein (Sbi)	bindet IgG am Fc-Fragment und β 2-Glycoprotein, verhindert so die Opsonierung der Keime [48, 49]
Biofilm	Anheftung an Milchdrüsenepithel, Schutz vor Phagozytose, begünstigt die Persistenz [42, 43]
Pseudokapsel	hemmt Chemotaxis und Phagozytose, Unterbindung der Aktivierung von C3 (Komplementfaktor 3) [6]
Hyaluronidase	Lyse von interzellulärem Bindegewebe und Parenchymzellen, begünstigt somit Invasion der Keime [6, 47]
Staphylokinase (SAK)	bindet α -Defensine und blockiert deren bakterizide Wirkung, Auflösung von Fibrin [6, 47]
Thermonuklease	Spaltung und Abbau von DNA und RNA [47, 50]
Koagulase	Bildung von Staphylothrombin, Blutgerinnung [6], hemmt Bakterizidie des Serums, Schutz vor intraphagozytärem Verdau [47]
Clumping Factor (CF)	Verklumpung von Blutplasma und somit Bildung einer Fibrinbarriere, Phagozytoseschutz [44-46]

2.4 *E. coli* als Mastitiserreger

Escherichia coli stellt mit 27% die häufigste Ursache für klinische Mastitiden dar. Vor allem die moderne Hochleistungskuh trägt in der peripartalen Phase und der frühen Laktation ein erhöhtes Risiko, schwerwiegend an einer *E. coli*-Mastitis zu erkranken [2, 51].

2.4.1 Reservoir von *E. coli*

Als Hauptreservoir von *E. coli* gilt die Umgebung der Kühe. Koliforme Bakterien befinden sich bei Säugetieren als Kommensalen v.a. im Darm, auf der Haut, den Tonsillen und in der Vagina. Sie werden mit dem Kot in großen Mengen ausgeschieden und gelangen so in die unmittelbare Umwelt der Tiere. Besonders das Einstreumaterial, zu der die Zitzenkuppen beim Liegen direkten Kontakt haben, scheint ein ideales Substrat für die Vermehrung darzustellen, weshalb in den warmen Sommermonaten die höchste Gefahr für eine Infektion mit umweltassoziierten Erregern besteht [2, 21, 52, 53].

2.4.2 Wachstum von *E. coli*

Escherichia coli gehört zu den gramnegativen Stäbchenbakterien der Familie *Enterobacteriaceae*. Die Stäbchen sind zwischen 2,0 - 6,0 µm lang, Oxidase-negativ und durch peritriche Begeißelung meist beweglich. Es gibt viele verschiedene Stämme, die sich durch ihre Virulenz und Epidemiologie unterscheiden. Hierbei stellt Serotypisierung mit Hilfe der O-, K-, F- und H-Antigene einen wichtigen diagnostischen Schritt dar. Die Anzüchtung ist einfach und die Fähigkeit zur Laktosespaltung auf Selektivnährböden ein bedeutendes Differenzierungsmerkmal. Anschließend kann mit Hilfe biochemischer Methoden eine genaue Speziesbestimmung erfolgen. *E. coli* bildet große, gräuliche und schleimig-glänzende Kolonien. Der Keim wächst oft hämolysierend unter aeroben, aber auch anaeroben Bedingungen. Letzteres gilt als begünstigender Faktor für die Manifestation in der mikroaerophilen Umgebung im Euter [52, 54, 55].

In der bovinen Milchdrüse kann sich *E. coli* durch Laktosefermentation schnell vermehren und Keimzahlen von bis zu 10^8 CFU/ml Milch erreichen. Daneben brauchen die Infektionserreger Eisen als nutritive Grundlage. Dieses steht bei laktierenden Tieren in großer Menge zur Verfügung, ist aber in trockenstehenden Eutern vermehrt an Laktoferrin gebunden und somit nicht für den Bakterienstoffwechsel verfügbar [52, 55-

57]. Blum et al. (2008) konnten bei Mastitisstämmen von *E. coli* im Vergleich zu Umweltstämmen eine erhöhte Wachstumsrate und Laktosefermentation in der Milch feststellen [56]. Das Wachstum in Milch weist allerdings starke tierindividuelle Unterschiede auf und ist abhängig von der Zusammensetzung des Sekrets, wobei der SCC hier keine Rolle zu spielen scheint. So unterschieden sich die erreichten Keimzahlen in einer Studie von Kornalijnslijper et al. (2004) nach 6-stündiger Inkubation von *E. coli* in Vollmilch bis um den Faktor 100 [7]. Generell fallen Keimzahlen von in Milch kultivierten *E. coli* deutlich niedriger aus als in standardisierten Wachstumsmedien, da Milch eine Vielzahl von antimikrobiell wirksamen Komponenten enthält, darunter Lipide, Proteine/Peptide, Kohlenhydrate und Immunzellen, welche das Wachstum von Bakterien hemmen können. Ähnlich wie bei *S. aureus* können somit auch bei *E. coli* frühe Mechanismen der Adaptation an die neue Umgebung in den ersten Stunden nach Invasion des Euters von entscheidender Bedeutung für die Etablierung einer Infektion sein [15, 58].

2.4.3 Spezifische Mechanismen bei der Pathogenese der *E. coli*-Mastitis

E. coli-Mastitiden sind die Folge opportunistischer Infektionen [23]; der Schweregrad variiert stark und hängt primär von der Immunantwort des Tieres und der Virulenz und Vermehrungsgeschwindigkeit der Bakterien ab [23, 51].

Die Tiere sind v.a. in der Zeitspanne um die Abkalbung und in der Früh lactation empfänglich für Mastitiden durch *E. coli*, da der Organismus hier mit einer massiven Stoffwechsellumstellung zu kämpfen hat und das Immunsystem der Kuh geschwächt ist. Anzahl und Funktion der PMN sind in diesem Zeitraum reduziert, weshalb deren Immigration in das Euter nur verzögert und nicht ausreichend stattfinden kann [51]. Dagegen gehen Infektionen während der fortgeschrittenen Laktation häufig nur mit geringen entzündlichen Symptomen einher und können meist schnell vom Wirtstier eliminiert werden. Weiterhin scheint eine hohe Milchleistung das Risiko einer Umwelt-assoziierten Mastitis zu erhöhen [51], da hier der Strichkanal durch erhöhten intramammären Druck vermehrt geweitet wird und somit eine schlechtere Barriere für eindringende Keime darstellt [51].

Eine Infektion erfolgt meist zwischen oder kurz vor und nach dem Melken wegen der oben beschriebenen Weitstellung des Strichkanals. Nur selten kommt es auch zu hämatogener Besiedelung der Milchdrüse [2]. Signifikant ist auch ein vermehrtes Auftreten bei multiparen Tieren im Vergleich zu Erstkalbinnen [21].

Nach dem Eindringen der Pathogene und erfolgreicher Erregererkennung im Euter wird das Immunsystem aktiviert und insbesondere PMN wandern in das Eutergewebe ein, um die Keime mittels Phagozytose zu bekämpfen [51]. Bei der Vermehrung und dem Absterben von *E. coli* im Euter kommt es zur Freisetzung des Zellwandbestandteils LPS. Abhängig von der freigesetzten Menge kommt es zur mehr oder weniger starken Ausschüttung von Entzündungsmediatoren und somit zu unterschiedlich schweren Allgemeinstörungen bei den Tieren. Der Verlauf der Erkrankung ist abhängig von der Effizienz der PMN-Einwanderung; es besteht also ein direkter Zusammenhang zwischen bakterieller Vermehrung und Abwehrbereitschaft des Tieres [51].

Umwelt-assoziierte Erreger wie *E. coli* sind im Gegensatz zu den kontagiösen Mastitiserregern kaum dazu prädisponiert, im Euter zu persistieren. Dennoch wird auch von sich häufenden Fällen von persistenten Infektionen berichtet, was sich häufig durch wiederkehrende klinische *E. coli*-Mastitiden äußert. Hierbei gelingt es den Bakterien vermutlich, in Euter- und Epithelzellen einzudringen und sich so der Erkennung durch die Wirtsabwehr zu entziehen. Vor allem während der Trockenstehzeit können sich die Erreger im Euter festsetzen und werden in der frühen Phase der Laktation durch erhöhtes Nährstoffangebot und Absinken antimikrobieller Faktoren wie z.B. Laktoferrin wieder aktiviert [2, 53, 59]. Die Fähigkeit zum Eindringen in Euter- und Epithelzellen basiert nach neuesten Studien auf endozytotischen Mechanismen und ist bei Stämmen, die rekurrente Mastitiden auslösen, stärker ausgeprägt [59-61]. Oft können diese persistenten Infektionen mit speziellen bakteriellen Faktoren wie die Cytotoxic Necrotizing Factors-1 und 2 (CNF-1/2) sowie S- und P-Fimbrien in Verbindung gebracht werden. Weiterhin wird eine spezifische „Nischenadaptation“ von *E. coli* an das bovine Euter diskutiert [2, 24].

2.4.4 Virulenzfaktoren von *E. coli*

Da *E. coli* zu den ubiquitären Umweltkeimen in Milchviehbetrieben zählt, mit denen die Tiere zu jeder Zeit konfrontiert sind, geht man davon aus, dass der Schweregrad einer *E. coli*-Mastitis hauptsächlich durch Wirts-Faktoren bestimmt wird und weniger von der Pathogenität des Erregers abhängt. Kann das Immunsystem die eindringenden und sich in der Milch rapide vermehrenden Keime nicht schnell genug eliminieren, so manifestiert sich eine klinische *E. coli*-Mastitis [23, 51]. Die Keime heften sich hierbei nicht wie *S. aureus* über Fibrinogen an das Epithel; somit scheint Adhärenz bei der „koliformen Mastitis“ keine ausschlaggebende Wichtigkeit zu besitzen. Für diese

Bakterien gilt also vermutlich vor allem die Strategie, sich möglichst schnell an das Milieu im Euter anzupassen und mit der Vermehrung zu beginnen. Je schneller dieser Anpassungs- und Wachstumsvorgang geschieht und je schwächer die Immunabwehr des betroffenen Tieres ist, desto schwerwiegender fällt die klinische Manifestation der Mastitis aus [51, 52, 61, 62].

Zahlreiche Studien konnten das Vorhandensein von Virulenzfaktoren bei Mastitis-isolaten von *E. coli* identifizieren, die meisten von ihnen waren allerdings nicht regelmäßig zu finden. Es ist noch unklar, inwieweit diese mit der Pathogenese der *E. coli*-Mastitis in Zusammenhang stehen und deren Schweregrad und Symptomatik beeinflussen. Eventuell werden Virulenzfaktoren, die im Genom verankert sind nur nach entsprechenden Signalen des Tieres oder der Umwelt aktiviert [24].

Trotz der Abhängigkeit einer erfolgreichen Infektion von Wirts-assoziierten Faktoren dürfen bestimmte Virulenzfaktoren von *E. coli* in diesem Zusammenhang nicht außer Acht gelassen werden. Vor allem LPS wird eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese zugesprochen. Dieser hitzestabile Bestandteil der Außenmembran gramnegativer Bakterien wird v.a. bei Lyse, Zerstörung und Vermehrung von *E. coli* frei und wirkt abhängig von seiner Struktur unterschiedlich toxisch. Durch Auslösung eines „Zytokinsturms“ kann es zu Schockzuständen führen. Bei Zerstörung der Blut-Euter-Schranke kann es darüberhinaus zu Bakteriämie mit anschließender Septikämie kommen [51, 52, 62, 63].

CNF-1 und CNF-2 führen zur Nekrose oberflächlicher Schichten der Zitzenschleimhaut und Drüsenzisterne sowie zur Zerstörung von Gefäßendothelien und zur Thrombenbildung. Das Auftreten dieser Faktoren kann direkt mit persistierenden Mastitiden in Verbindung gebracht werden [24, 62, 64].

Viele Isolate von aus bovinen Eutern gewonnenen *E. coli* exprimieren weitere Toxine wie Enterotoxine, Shiga-Toxine, Zytotoxine und Hämolysine. Diese scheinen jedoch von geringer Bedeutung für die initialen Mechanismen der Erregererkennung (oder Nichterkennung) durch das Immunsystem sowie für Verlauf und Schweregrad der Mastitis zu sein [52, 65, 66]

Curli sind proteinöse Bestandteile der extrazellulären Matrix, welche in Fasern angeordnet sind und zu den Amyloiden gezählt werden. Sie vermitteln die Adhäsion an Oberflächen von Wirtszellen und fördern Invasion, Zellaggregation und Biofilmbildung. Es kommt zu einer Zerstörung des Parenchyms, wodurch die Bakterien in

tieferes Gewebe vordringen können. Durch Bindung an H-Kininogen, Fibrinogen und Faktor VII wird die Blutgerinnung verlangsamt [67].

TraT ist ein Plasmid-codiertes Protein der äußeren bakteriellen Zellmembran, das durch Störung der Opsonierung zu den antiphagozytären Faktoren gezählt wird und die koliformen Keime vor Immunzellen des Wirtes schützt [68, 69].

Eisen stellt einen essentiellen Faktor für Überleben und Wachstum von *E. coli* im Wirtstier dar. Das Siderophor Aerobactin wird hierzu als Chelatbildner benötigt, welcher das Eisen für den Stoffwechsel der Bakterien verfügbar macht und so eine wichtige Rolle bei der Vermehrung der Erreger bei der *E. coli*-Mastitis spielt [57, 70].

Nur 3,2% der Isolate aus *E. coli*-Mastitiden zeigten in einer Studie von Nemeth et al. (1991) Kapselbildung, die den Keim ebenfalls vor Mechanismen der Immunabwehr schützen und somit zur Manifestation von länger andauernden Mastitiden beitragen soll [68, 71].

In Tabelle 2 sind die im Zusammenhang mit Mastitis diskutierten Virulenzfaktoren von *E. coli* zusammenfassend wiedergegeben.

Tabelle 2: *E. coli*: Virulenzfaktoren und deren Wirkung

Faktor	Wirkung
Lipopolysaccharid (LPS)	Aktivierung des Immunsystems, Chemotaxis, Endotoxin, Erhöhung der Gefäßpermeabilität [51, 52, 62, 63]
Cytotoxic Necrotizing Factors (CNF-1/2)	Schädigung von Epi- und Endothelzellen, Thrombenbildung [24, 62]
Shiga-Toxine (Stx1/2)	zytolytisch bei Endothelzellen von Blutgefäßen [65]
Curli	Adhäsion an Wirtszellen, Invasion, Zellaggregation und Biofilmbildung, Zerstörung von Parenchym [67]
Kapsel (K-Antigene)	Schutz vor Immunabwehr [68, 71]
TraT	Störung der Opsonierung und somit Verhinderung der Phagozytose [68, 69]
Aerobactin	Chelatbildner, um Eisen in der Milch für die Verstoffwechslung durch <i>E. coli</i> verfügbar zu machen [57, 70]

2.5 Frühe Wirtsreaktionen nach mammärer bakterieller Infektion

Unmittelbar nach einer Infektion mit Mastitiserregern kommt es zu einer Aktivierung verschiedenster Erkennungs- und Reaktionsmechanismen in der bovinen Milchdrüse. Viele regulatorische Schritte sind notwendig, um eine akute oder subklinische Entzündungsreaktion auszulösen. Eine bedeutende Rolle spielen dabei Wege der Erregererkennung sowie Modulation der Genexpression im infizierten Gewebe. Hierbei werden charakteristische PAMPs durch zellständige Rezeptoren (PRR, Pattern Recognition Receptors), die sich z.B. auf Epithelien in der Milchdrüse befinden, erkannt und gebunden. Diese Rezeptorbindung setzt eine Signalkaskade in Gang und dient so der Aktivierung des angeborenen Immunsystems [8, 51]. So wird LPS als wichtigstes PAMP bei einer Infektion mit *E. coli* von Toll-like Rezeptor-4 (TLR-4) und seinen assoziierten Molekülen CD14 (Cluster Of Differentiation14), MD2 (Myeloid Differentiation Factor 3) und LBP (Lipopolysaccharid bindendes Protein) erkannt. Für *S. aureus* galt bisher eine TLR-2-vermittelte Erkennung von LTA als entscheidendes Ereignis. Neueren Studien zufolge ist LTA jedoch kein TLR-2-Ligand. Es wird angenommen, dass v.a. bakterielle Lipopeptide an TLR-2 binden; der Rezeptor für die LTA-Erkennung ist derzeit noch unbekannt [72]. Diese Erkennungsvorgänge führen zur Zellaktivierung und setzen somit eine Kaskade in Gang, welche letztendlich die Synthese und Freisetzung von Immunmediatoren in der Milchdrüse induziert und die Immunantwort v.a. durch Zellrekrutierung und Synthese antimikrobieller Peptide auslöst. Die wichtigsten Vertreter dieser Signalstoffe stellen Zytokine und Chemokine dar, die Informationen auf Zellebene vermitteln und Dauer sowie Stärke der Immunreaktion mitbestimmen [8].

Als erste messbare Ereignisse in der bovinen Milchdrüse nach Erregerkontakt gelten Veränderungen in der Abundanz von mRNA-Transkripten für Gene endogener Mediatoren.

2.5.1 Zytokine

Proinflammatorische Zytokine gehören zu den ersten sezernierten Signalstoffen nach Erregerkontakt in der Milchdrüse. Sie werden lokal von verschiedensten Zelltypen gebildet und geben in der Frühphase der Infektion entscheidende Signale, die den Entzündungsprozess vorantreiben und eine prompte Reaktion des Immunsystems ermöglichen. So regulieren sie unter anderem die Expression immunrelevanter Gene, darunter weitere Zytokine, Chemokine, Enzyme für die Synthese von Eikosanoiden und

akute-Phase-Proteine. Zu den bedeutendsten proinflammatorischen Zytokinen gehören TNF- α , IL-1 β und Interleukin-6 (IL-6), wobei IL-6 auch eine antiinflammatorische Potenz aufweist. Antiinflammatorische Zytokine hemmen die Aktivität der proinflammatorischen Zytokine und greifen so regulatorisch ins entzündliche Geschehen ein. Als klassische Vertreter dieser Gruppe sind v.a. IL-10 und Transforming Growth Factor- β (TGF- β) zu nennen [8, 10, 73-75].

Zytokine lassen sich in folgende Hauptgruppen gliedern: Interleukine (IL), Interferone (IFN), Kolonie-stimulierende Faktoren (CSF, Colony Stimulating Factors) und Tumornekrosefaktoren (TNF). Im Folgenden wird nur auf die in dieser Arbeit untersuchten Zytokine IL-6 und TNF- α eingegangen.

Interleukin-6:

IL-6 wird von einer Vielzahl verschiedener Zelltypen gebildet, darunter Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen, PMN, Fibroblasten, Endothel- und Epithelzellen. Eine Steigerung der Expression geschieht durch Bakterien und Viren, jedoch auch durch andere Zytokine wie TNF- α und IL-1 β .

IL-6 fungiert als Aktivator der Akute-Phase-Proteine, wirkt pyrogen und stimuliert die B-Zell-Differenzierung. Dies hat eine verstärkte Bildung von Immunglobulinen zur Folge und lockt PMN zum Ort des Erregerkontakts [76].

In mehreren Studien konnte sowohl in mit *E. coli*, als auch mit *S. aureus* infizierten Eutervierteln eine deutlich erhöhte Expression dieses Zytokins nachgewiesen werden [77-79].

Tumornekrosefaktor- α :

TNF- α spielt eine wichtige Rolle in der frühen Phase der Infektion und stimuliert die Synthese sekundärer Mediatoren [74, 80]. Dieses Zytokin fördert die Expression von endothelialen Adhäsionsmolekülen, die Chemotaxis und die Phagozytose. Es beschleunigt die Ausschüttung anderer Zytokine, wirkt pyrogen und steigert die Aktivität der Cyclooxygenase-2 [80]. Bei der perakuten Verlaufsform der „koliformen Mastitis“ konnte TNF- α als hauptauslösender Faktor des Toxin-vermittelten Schocksyndroms identifiziert werden. TNF- α wird v.a. von Makrophagen, aber auch Lymphozyten, PMN und Endothelzellen gebildet [76, 80].

2.5.2 Chemokine

Chemokine sind relativ kleine Peptide, die chemoattraktiv auf Entzündungszellen wirken und deren Migration stimulieren. Während Zytokine wie IL-1 β und TNF- α Selektine auf Endothelzellen aktivieren, stimulieren Chemokine Integrine auf Leukozyten, um so Rollen und Adhäsion an Gefäßendothelien bei der Diapedese zu ermöglichen. Chemokine werden sowohl durch Zytokine wie IL-1 β und TNF- α , als auch durch exogene Stimuli induziert. Man unterscheidet vier Untergruppen: C, CC, CXC und CX₃C. Im Folgenden wird nur auf die in dieser Arbeit behandelten Chemokine CXCL8/IL-8 und CCL20 eingegangen.

Interleukin-8 (CXCL8):

CXCL8 reagiert mit den spezifischen Rezeptoren CXCR1 und CXCR2. Diese Bindung wirkt entzündungsfördernd und stimuliert v.a. PMN zur Chemotaxis, Adhäsion und Freisetzung von Granulaenzymen. In geringerem Maße wirkt CXCL8 auch auf Monozyten chemoattraktiv. Verschiedenste Zellen, darunter Makrophagen, Monozyten, Endothel- und Epithelzellen, Fibroblasten, PMN und T-Lymphozyten sind in der Lage, CXCL8 freizusetzen. Es kann nach Stimulation mit LPS, *E. coli* oder *S. aureus* von bovinen Milchdrüsenepithelzellen (MEC) freigesetzt werden und gehört zu den ersten hochregulierten Genen nach Erregerkontakt [8, 9, 73, 74, 80].

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

CCL20, welches zur Familie der CC-Chemokine gehört, wirkt chemotaktisch auf T-Lymphozyten sowie Monozyten und wird vermehrt in Fibroblasten, intestinalen Epithelzellen und Keratinozyten gebildet [81, 82]. Eine Induktion von CCL20 erfolgt durch verschiedene Zytokine, insbesondere TNF- α [83]. In einer Studie, in der primäre bovine MEC (pbMEC) mit hitzeinaktivierten *E. coli* stimuliert wurden, konnte CCL20 unter den am stärksten heraufregulierten Genen gefunden werden [84]. Diese starke Aktivierung konnte auch im Tiermodell in infizierten Eutervierteln beobachtet werden [14].

2.5.3 S100-Proteine

S100-Proteine sind Kalzium-bindende Proteine, die während entzündlicher Prozesse in hohen Konzentrationen im extrazellulären Raum anzutreffen sind und die Migration von PMN an den Ort der Entzündung stimulieren [85]. Sie werden der Gruppe der „damage-associated molecular patterns“ (DAMPs) zugeordnet, welche als proinflammatorische Faktoren einen wichtigen Teil des angeborenen Immunsystems darstellen. Zellulärer Stress durch aktivierte, geschädigte oder zerstörte Zellen führt zur Ausschüttung solcher DAMPs, welche wiederum über RAGE (Multiligand Receptor for Advanced Glycation End Products) und TLRs erkannt und gebunden werden. Einer Studie von Günther et al. (2009) zufolge werden S100-Proteine im Euter nach Kontakt mit *E. coli* stark in ihrer Expression verstärkt [84]. Immunhistochemisch gelang der Nachweis einer gesteigerten Synthese von S100A10 24 h nach experimenteller Infektion mit *E. coli* [86].

S100A9 (Calgranulin B; MRP14):

S100A9 wird zu den Calgranulinen gezählt, denn es besitzt wie auch S100A8 und S100A12 die Fähigkeit, Kalzium zu binden. Es wird besonders stark von Granulozyten, aber auch von Monozyten und Makrophagen exprimiert und freigesetzt. Extrazellulär zeigt es starke antimikrobielle Aktivität gegen Mikroorganismen, darunter auch *E. coli* und *S. aureus*, und kann bei Infektionen und Entzündungen vermehrt im Serum und anderen Körperflüssigkeiten nachgewiesen werden. Nach der Freisetzung bindet S100A9 spezifisch an Endothelzellen und induziert dort eine vermehrte Expression von Signalstoffen wie *CXCL8* und Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 (Intracellular Adhesion Molecule-1). Außerdem sorgt das Protein für eine erhöhte Gefäßpermeabilität und bei Phagozyten für die Heraufregulation der Adhäsionsmoleküle CD11b/CD18 [87, 88].

2.5.4 Defensine

Defensine gehören zu den antimikrobiellen Peptiden (AMPs) des angeborenen Immunsystems und können als „körpereigene Antibiotika“ bezeichnet werden. Sie weisen eine hohe antimikrobielle Aktivität gegenüber grampositiven und gramnegativen Mikroorganismen auf, wirken aber auch gegen Pilze, Viren und bestimmte Protozoen. Man unterscheidet die α -Defensine und die β -Defensine. Die α -Defensine werden spezifisch in epithelialen Paneth-Zellen des Dünndarms und im Blut gebildet, β -Defensine dagegen in sämtlichen Epithelien des Körpers. Durch Bildung von

Mikroporen an mikrobiellen Oberflächen kommt es zum Zusammenbruch des homöostatischen Gleichgewichts und folglich zum Absterben der Pathogene [89, 90]. So kommt es bereits wenige Stunden nach einer Infektion zur Infiltration des betroffenen Gewebes mit Defensinen [91].

Lingual Antimicrobial Peptide (LAP):

LAP ist ein antimikrobielles Peptid der Wirtsabwehr, welches zu den β -Defensinen gezählt wird und *in vitro* antibakterielle Aktivität gegenüber *S. aureus* und *E. coli* zeigt. In infizierten Eutervierteln konnte eine Expressionssteigerung von LAP in Epithelien der Zitze und der Drüsenzisterne festgestellt werden, was die These untermauert, dass dieses β -Defensin eine bedeutende Rolle bei der Wirtsantwort im Euter spielt [8, 73, 92].

2.5.5 Weitere früh regulierte Faktoren

LCN2 (Lipocalin-2 / NGAL, Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin / Siderocalin):

LCN2 ist ein kleines Protein aus der Familie der Lipocaline, welche in der Lage sind, kleine, hydrophobe Moleküle zu binden und zu transportieren. Daneben spielen sie auch in der Regulation immunologischer Prozesse eine entscheidende Rolle [93]. LCN2 behindert das Bakterienwachstum nach einer Infektion durch Sequestrierung des eisenbeladenen bakteriellen Siderophors und verhindert so die für effizientes Wachstum essentielle Eisenaufnahme der Bakterien. Der bakteriostatische Effekt tritt nur bei Bakterien auf, welche ihr Eisen durch Lipocalin-2-bindende Siderophore, wie das bei den *Enterobacteriaceae* vorkommende Enterochelin gewinnen. Deshalb wird das Wachstum von *E. coli* durch LCN2 stark behindert, *S. aureus* dagegen gewinnt das benötigte Eisen über Siderophore, die kein LCN2 binden, weshalb das Wachstum bei diesen Keimen durch LCN2 nicht beeinträchtigt wird [94, 95].

Nach Kontakt mit Infektionserregern oder LPS wird die Produktion und Sekretion von LCN2 in Zellen des angeborenen Immunsystems, wie z.B. Makrophagen, induziert. Dieser Mechanismus spielt besonders in der frühen Phase der Infektion eine bedeutende Rolle, in der es für *E. coli* auf eine möglichst schnelle Vermehrung ankommt [94, 95]

MX2 (Myxovirus Resistance-Protein 2):

Das MX-Gen wurde in Mäusen eines bestimmten Inzuchtstammes erstmals entdeckt, da die Tiere Resistenz gegen Orthomyxoviren zeigten. Mittlerweile wurden diese MX-Proteine bei einer Vielzahl von Tierarten nachgewiesen, u.a. auch beim Rind. Die molekularen Mechanismen der antiviralen Aktivität sind jedoch bis heute nicht vollständig entschlüsselt [96]. Bei den MX-Proteinen unterscheidet man MX1 und MX2, welche zur Gruppe der GTPasen gezählt werden und zur Superfamilie der Dynamine gehören [97, 98]. Sie werden durch IFN- α und IFN- β induziert [99, 100].

In zwei Studien von Günther et al. (2009, 2010) konnten MX1 und MX2 6 bis 24 h nach Stimulation von pbMEC mit hitzeinaktivierten *E. coli* als Schlüsselmediatoren unter den am stärksten hochregulierten Genen gefunden werden [10, 84].

CYP1A1 (Cytochrom p450-1A1):

CYP1A1 gehört zu den Cytochrom p450-Enzymen. Diese große Gruppe von Monooxygenasen ist im endoplasmatischen Retikulum und der mitochondrialen Innenmembran angesiedelt. Als Vertreter der Phase-I-Enzyme wirkt *CYP1A1* als Katalysator für die Ausscheidung, Konjugation und weitere Transformation von Xenobiotika und karzinogenen Stoffen. Eine Hochregulation findet durch Bindung verschiedener toxischer Substanzen, aber auch endogener Stoffe am AhR (Aryl Hydrocarbin Receptor) statt [101, 102]. Neben den für die Immun- und Entzündungsantwort relevanten Genen konnte auch *CYP1A1* als ein stark reguliertes Gen nach Stimulation mit hitzeinaktivierten *S. aureus* und *E. coli* identifiziert werden [10].

In Tabelle 3 sind die unter 1.6 ausführlich dargestellten früh regulierten Gene der mammären Wirt-Pathogen-Interaktionen zusammengefasst.

Tabelle 3: In der Frühphase der Mastitis regulierte Gene in der bovinen Milchdrüse

Bezeichnung	Gruppe	Funktion
IL6	Zytokine	Aktivator der Akute-Phase-Proteine und Lymphozyten-stimulierender Faktor, Pyrogen [76]
TNF	Zytokine	stimuliert Chemotaxis, Phagozytose und Ausschüttung weiterer Zytokine, Pyrogen, Aktivitätssteigerung der Cyclooxygenase-2 [74, 76, 80]
CXCL8	Chemokine	wirkt v.a. auf PMN; Chemotaxis, Adhäsion, Aktivierung und Freisetzung von Granula und Sauerstoffradikalen; Angiogenese [8, 73, 80]
CCL20	Chemokine	stimuliert Chemotaxis von PMN, Homöostase [81, 82]
S100A9	S100-Proteine, DAMPs	wirkt antimikrobiell und chemotaktisch; Regulation der Entzündungsantwort; Calcium bindendes Protein [87, 88]
LAP	β -Defensine, antimikrobielle Peptide	fördert Zell-Lyse, wirkt bakterizid [8, 73, 92]
LCN2	Lipocaline	verhindert die Eisenaufnahme der Bakterien, wirkt antimikrobiell [93-95]
MX2	GTPasen	Schlüsselmediator, wirkt antiviral [96-98, 103]
CYP1A1	Phase-I-Enzyme	Entgiftung xenobiotischer Substanzen [101, 102]

2.6 Untersuchungen zu früh regulierten Genen nach Pathogenkontakt in mammären Zellkulturmodellen

Einige Forschungsgruppen haben sich in den letzten Jahren vermehrt mit transkriptomweiten Veränderungen in Mastitis-Infektionsmodellen auseinandergesetzt. Hierbei ist insbesondere der Zeitraum kurz nach der Infektion und vor der eigentlichen Entzündungsreaktion von besonderem Interesse. Da sich die Dynamik immunologischer Reaktionen im Tiermodell z.B. durch wiederholte Beprobung eines Individuums nur unbefriedigend klären lässt oder eine sehr hohe Anzahl an Versuchstieren fordert, wurden diese Mechanismen v.a. in Milchdrüsenepithelzellkulturen untersucht. Diese MEC-Kulturen sind leicht zu standardisieren und versprechen damit eine gute Reproduzierbarkeit [10, 84].

Nach einer Studie von Griesbeck-Zilch et al. (2008) belegen die Expressionsmuster von TLRs eine effizientere Erkennung von gramnegativen im Vergleich zu grampositiven Pathogenen. Dies führte in Zellen, die mit *E. coli* interagieren, zu einer verstärkten Expression von Zytokinen und Chemokinen im Vergleich zu Ansätzen, bei denen *S. aureus* eingesetzt worden waren [12].

In einer Microarray-Studie von Günther et al. (2010) konnten eine Vielzahl von regulierten Genen bei mit hitzeinaktivierten *E. coli*₁₃₀₃ und *S. aureus*₁₀₂₇ behandelten pbMEC identifiziert werden. Aus diesen wurden Kandidatengene ausgewählt, deren Expression durch qRT-PCR quantifiziert werden konnte. Die Zellen wurden hierbei über Zeiträume von 1, 3, 6 und 24 h stimuliert. So wurden bei der Exposition mit *E. coli* eine sehr hohe Anzahl regulierter Gene gefunden, während nach Stimulation mit *S. aureus* nur etwa 20% dieser Gene reguliert wurden. Außerdem reagierten die Zellen bei *E. coli* um ein Vielfaches schneller als bei *S. aureus* mit mRNA-Expressionssteigerung von Genen, obwohl die Erregererkennung gleich schnell stattfand. Es konnte schon innerhalb der ersten Stunde eine pathogenspezifische Antwort auf die Noxen festgestellt werden. Durch Stimulation mit *E. coli* wurden nach 1 h bereits 10mal mehr Gene reguliert als bei *S. aureus*-Stimulation. Maximale Veränderungen der mRNA-Konzentrationen konnten bereits 3 h nach Kontakt mit *E. coli* verzeichnet werden. Bei *S. aureus* dagegen wurden maximale mRNA-Konzentrationen erst nach 24 h erreicht. Die Reaktion auf Transkriptomebene erfolgte hier also zeitlich verzögert [10].

Für das Chemokin CCL20, welches sowohl in MEC als auch im Euter sehr stark

exprimiert wird, konnte in dieser Studie bereits nach 1 h Exposition mit *E. coli* eine massive Induktion der Genexpression festgestellt werden, wohingegen *S. aureus* wiederum eine verzögerte und abgeschwächte Expressionssteigerung auslöste. *E. coli* aktiviert also möglicherweise durch die antimikrobielle Aktivität dieses Gens prompt Schutzmechanismen gegen eindringende Bakterien [9, 10]. Die proinflammatorischen Zytokine IL1A und B, TNF und IL6 wurden ebenfalls unmittelbar durch *E. coli* in ihrer Expression gesteigert. Bei *S. aureus* fand für TNF erst nach 24 h eine deutliche Hochregulation statt. IL6 dagegen war das einzige Zytokin, welches schnell und stark sowohl durch *S. aureus*, als auch durch *E. coli* reguliert wurde. CYP1A1, welches maßgeblich an der Detoxifikation xenobiotischer Substanzen beteiligt ist, wurde durch *S. aureus* und *E. coli* ähnlich schnell und stark hochreguliert, die Schlüsselmediatoren MX1 und MX2 hingegen erst 6 bis 24 h *post infectionem* [10].

Strandberg et al. (2005) führten Versuche mit LPS und LTA im Zellkulturmodell durch und konnten feststellen, dass 24 h nach Stimulation boviner MEC mit LPS die mRNA von IL-1 β , CXCL8, TNF- α , IL-6 und β -Defensinen vermehrt exprimiert wurde, wohingegen nach gleich langer Stimulation mit LTA keine signifikante Expressionsänderung stattfand. Dagegen konnten 2 bis 4 h nach Exposition der MEC mit LPS und LTA in beiden Fällen jeweils erhöhte mRNA-Transkriptwerte der genannten Gene gemessen werden. Diese gingen jedoch im LTA-Ansatz nach 8 bis 16 h wieder auf das Ausgangsniveau zurück. Möglicherweise beruht das Potential von *S. aureus*, chronische Euterinfektionen auszulösen zu können, auch auf der schnellen Rückkehr der Zytokin- und Chemokinexpression zu den Basalwerten [73].

Lahouassa et al. (2007) sowie Günther et al. (2009) konnten ebenfalls eine erhöhte Expression und Freisetzung von TNF- α und CXCL8 nach Koinkubation mit *S. aureus* und *E. coli* feststellen [11, 104].

2.7 Untersuchungen zu früh regulierten Genen nach Pathogenkontakt in Mastitis-Tiermodellen

In vivo wurden auf dem Gebiet der Frühregulation von Genen nach einer Infektion mit Mastitiserregern bisher nur wenige Studien durchgeführt. Insgesamt bedingen intramammäre Infektionen mit *E. coli* auch im Tiermodell eine weitaus stärkere Immun- und Entzündungsantwort als Infektionen mit *S. aureus*.

Um sich der Thematik anzunähern, wurde innerhalb der eigenen Arbeitsgruppe in einer Studie von Petzl et al. (2008) die Regulation der Erregererkennungsrezeptoren TLR-2

und TLR-4 sowie antimikrobiell wirksamer β -Defensine im Tierversuch untersucht. Hierbei wurde vor allem auf eine starke Standardisierung der Modelltiere geachtet. *E. coli*₁₃₀₃ verursachte 24 h nach intramammärer Inokulation eine signifikante Hochregulation von TLR-2, TLR-4 und β -Defensinen im Vergleich zu einem nichtinfizierten Kontrollviertel des gleichen Tieres. Bei *S. aureus* dagegen konnten erst nach 72 und 84 h signifikante Veränderungen der Genexpression von Defensinen beobachtet werden, TLR-2 und TLR-4 erfuhren selbst zu diesen späten Zeitpunkten keine signifikante Hochregulation [35]. Diese Ergebnisse decken sich mit denen aus dem Zellkulturmodell von Griesbeck-Zilch et al. (2008) [12]. Bei experimentell induzierter *E. coli*-Mastitis konnte 12 h nach Inokulation gut reproduzierbar neben ersten klinischen Symptomen ein signifikanter Zellzahlanstieg festgestellt werden. Bei Inokulation mit *S. aureus* hingegen kam es zu keiner Veränderung klinischer Parameter, außer einer reduzierten Milchleistung 24 h *post inoculationem* (*p. inoc.*). Somit kann angenommen werden, dass die Erkennung von *E. coli*₁₃₀₃ über TLRs prompt erfolgte und binnen kurzer Zeit die Bildung von Immunmediatoren induzierte. Die Erkennung oder die Antwort auf eine Inokulation mit *S. aureus* aber verläuft verzögert und abgeschwächt [35].

Mitterhuemer et al. (2010) beschäftigten sich mit den lokalen und systemischen Transkriptomveränderungen nach Inokulation mit 500 CFU *E. coli*₁₃₀₃ nach 6 und 24 h *post inoculationem*. Hier konnten mittels Microarray-Verfahren nach 6 h kaum differentiell regulierte Gene nachgewiesen werden, dagegen nach 24 h in großer Anzahl. Antimikrobielle Faktoren wie S100A9 wurden in infiziertem Gewebe stark hochreguliert, dagegen konnte 6 h *p. inoc.* keine erhöhte Expression proinflammatorischer Zytokine wie TNF verzeichnet werden. Für Chemokine vom CC-Typ konnte eine erhöhte Expression im Rahmen der lokalen Immunantwort gesehen werden, die CXC-Chemokine dagegen wurden systemisch reguliert [13].

In einer weiteren Studie von Rinaldi et al. (2009) war der Fokus ebenfalls auf Expressionsmuster während der frühen Phase, also 12 und 24 h nach intramammärer Inokulation von 100 CFU *E. coli* und auf Unterschiede bei verschiedenen Lokalisationen im Euter gerichtet. Die Immunantwort auf Transkriptebene war 12 h nach der Inokulation in den Geweben der Zitzenzisterne und Drüsenzisterne am höchsten, wobei in der Zitzenzisterne nach 12 h besonders S100-Proteine, LAP, CCL20, IL6, IL1B und CXCL8 hochreguliert wurden und in der Drüsenzisterne CCL20, IL6, IL1B, CXCL8, CXCL1 und CXCL2. Zum Zeitpunkt 24 h *post infectionem* konnte in

diesen beiden Lokalisationen bereits eine Herabregulation von CCL20, TNF und CXCL8 festgestellt werden. Das Drüsengewebe reagierte jedoch erst zu diesem Zeitpunkt mit einer Heraufregulation von S100-Proteinen, LAP, akute-Phase-Proteinen, IL1B, TNF und CXCL8. In der Fürstenberg'schen Rosette fand zu beiden Zeitpunkten kaum Regulation von Genen statt. Die proinflammatorischen Zytokine TNF, CXCL8 und IL1B konnten bereits nach 12 h Expositionszeit in der Milch mittels ELISA nachgewiesen werden. Distale Kompartimente der bovinen Milchdrüse scheinen also eine Art Wächterfunktion einzunehmen, um schon kurz nach Keiminvasion und lokal begrenzt reagieren zu können [14].

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Geräte

Autoklav „D65“	(Systec, Wettenberg)
automatischer Kolonienzähler „Flash and Grow“ mit Software Flash & Go (Version 1.0)	(IUL. Instruments, Königswinter)
Brutschrank „Incucell“	(MMM Medcenter, Planegg)
DeLaval [®] Cell Counter (DCC)	(DeLaval, Tumba, Schweden)
Eismaschine „ZBE 70-35“	(Ziegra, Isernhagen)
Fluoreszenzmikroskop „DM IL LED“	(Leica, Wetzlar)
heizbarer Magnetrührer „M6“	(CAT, Staufen)
Kühlzentrifuge „Rotina 420 R“	(Hettich, Tuttlingen)
Kühlschrank mit Gefrierfach (-20°C)	(Einzelhandel)
Laborwaage „SBC22“	(Scaltec Instruments, Heiligenstadt)
LightCycler [®] 2.0. System Instruments	(Roche, Mannheim)
Melkanlage „RPA 40“	(Westfalia, Oelde)
Mikroskop Biomed	(Leitz, Wetzlar)
Photometer „LP 800“	(Dr. Lange, Berlin)
Pipette, einstellbar „Transferpette [®] “ (10-100 µl)	(Brand, Wertheim)
Pipetten, einstellbar (100-1000 µl, 1-5 ml)	(Biohit, Köln)
Reinstwassersystem „GenPure“	(TKA, Niederelbert)
Schüttler „WiseShake SHO-2D“	(Wisd Laborgeräte, Wertheim)
Schüttler „Vortex Genius 3“	(IKA, Staufen)
Sicherheitswerkbank „Safeflow 1.2.“	(Nunc, Langenselbold)
Sicherheits-Laborgasbrenner „Gasprofi 2 SCS“	(WLD-Tec, Göttingen)

Thermometer	(Microlife, Widnau, Schweiz)
Tiefkühltruhe (-80°C) „Forma ULT Freezer“	(Thermo Electron, Dreieich)
Vierviertel-Melkeinheit (Spezialanfertigung)	(Melk- und Kühltechnik Josef Zirnbauer, Anzing)
Vierwegemelkzeug	(GEA, Westfalia Surge, Bönen)

3.1.2 Klinikbedarf

Applikatoren, steril	(Böttger, Bodenmais)
California-Mastitis-Test	(WDT, Garbsen)
Dispenser, „Calibrex“, 20 ml	(Socorex Swiss, Ecublens, Schweiz)
Einmalspritzen „BD Discardit™“ II (steril; 2 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml)	(Becton Dickinson, Heidelberg)
Einmal-Überziehtiefel „Clinhand“	(Samco clinhand, Mainburg)
Einmal-Untersuchungshandschuhe „Gentle skin® sensitive“	(Meditrade, Kiefersfelden)
Einmal-Untersuchungshandschuhe für rektale Untersuchung „Krutex“	(Kruuse, Dänemark)
Einmal-Zitzenkanüle „Bovivet“	(Kruuse, Dänemark)
Intravaginalspange für Rinder „EAZI-BREED™ CIDR®“	(Pfizer, New Zealand)
Kanülen „BD Microlance™ 3“ (steril, 1,2*40 mm)	(Becton Dickinson, Heidelberg)
Kanülen „TSK STERIJECT“ (steril, 1,80*40 mm)	(TSK-Supra, Japan)
Knopfsonden, (1,5 mm*14,5 cm)	(Eickemeyer, Tuttlingen)
Pinzette, chirurgisch, 130 mm	(Heiland Vet, Hamburg)
Polystyrol-Röhrchen, steril	(Sarstedt, Nümbrecht)
Präparierschere Metzenbaum, 180 mm, gebogen	(Heiland Vet, Hamburg)
Serum-Blutentnahmesystem „Monovette®“, 9 ml	(Sarstedt, Nümbrecht)

Skalpellklingen „Bayha“, steril (Eickemeyer, Tuttlingen)

3.1.3 Laborbedarf

ComoRack-24 (Micronic Europe B.V., Niederlande)

Cryotubes, 3,5 ml (Roth, Karlsruhe)

Drigalski-Glasspatel (Roth, Karlsruhe)

Einmalküvetten makro (PMMA, 2,5 ml) (Brand, Wertheim)

Einmal-Nitrilhandschuhe „Blue Nitril“ (neoLab Migge, Heidelberg)

Einmal-Pasteurpipetten aus Pe-Ld (Merck, Darmstadt)

Flat bottom bulk, 7,5 ml (Micronic Europe B.V., Niederlande)

Gewichts- und Stabilisierungsringe,
„Rotilabo[®]“ (Roth, Karlsruhe)

Glasperlen Kalknatron, 4 mm (Roth, Karlsruhe)

Isolierbox mit Deckel, NEOPOR (Storopack, Metzingen)

Kappen für Kulturkolben, „Labocap“ (Roth, Karlsruhe)

Kappen für Reagenzröhrchen, „Labocap“ (Roth, Karlsruhe)

Kryo-Boxen aus Karton (Süd Laborbedarf, Gauting)

Kulturkolben in Erlenmeyerform, 250 ml (Roth, Karlsruhe)

Laborglasflaschen mit Gewinde, Schott-
Duran[®] (200 ml, 500 ml, 1000 ml) (VWR international, Hannover)

Mikrobank-System Cryobank[™] (Mast Diagnostika, Reinfeld)

Pipettenspitzen, blau, 100-1000 µl (Brand, Wertheim)

Pipettenspitzen, gelb, 2-100 µl (Brand, Wertheim)

Pipettenspitzen „Biohit optifit Tip 5000 µl“ (Biohit, Köln)

Polystyrolröhrchen, 160 mm hoch (Nerbe Plus, Winsen/Luhe)

PP-Schraubverschluss-Röhrchen "Cellstar"
(steril; 50 ml) (Greiner Bio-One, Frickenhausen)

Reagenzglasständer	(Roth, Karlsruhe)
Röhrchen für die Durchflusszytometrie, 5 ml	(Becton Dickinson, Heidelberg)
Schraubdeckeldosen „Rotilabo ^{®cc} “	(Roth, Karlsruhe)
Sterilindikatorband für Dampfsterilisation	(Roth, Karlsruhe)

3.1.4 Reagenzien, Medikamente und andere Verbrauchsmaterialien

Baird-Parker-Agar	(Oxoid, Wesel)
Columbia-Agar mit Schafblut	(Oxoid, Wesel)
Dalmazin [®] , Cloprostenol-Natriumsalz	(Selectavet, Weyarn)
Dithiothreitol (DTT)	(Invitrogen, Karlsruhe)
dNTP Mix	(Invitrogen, Karlsruhe)
Edwards-Nährböden mit Schafblut (modifiziert)	(Oxoid, Wesel)
Ethanol 70%	(Roth, Karlsruhe)
Kristallviolett-Galle-Laktose-Agar (VRB-Agar)	(Oxoid, Wesel)
LB-Broth Vegitone	(Sigma-Aldrich, Steinheim)
Light Cycler Kit, „Fast Start DNA Master Plus SYBR green“	(Roche, Mannheim)
Natriumchlorid (NaCl)	(Sigma-Aldrich, Steinheim)
Oligo(dT) ₂₀	(Invitrogen, Karlsruhe)
Oxytozin <i>ad us. vet.</i>	(aniMedica, Senden-Bösensell)
RNAlater [®]	(Sigma-Aldrich, Steinheim)
RNase H	(Invitrogen, Karlsruhe)
RNaseOUT [®]	(Invitrogen, Karlsruhe)
RT Puffer	(Invitrogen, Karlsruhe)
SuperScript III [®] Reverse Transcriptase	(Invitrogen, Karlsruhe)
Trizol LS Reagent	(Invitrogen, Karlsruhe)

3.1.5 Modellbakterien

Die verwendeten Stämme *E. coli*₁₃₀₃ und *S. aureus*₁₀₂₇ waren in früheren Experimenten jeweils aus dem Eutersekret von an klinischer Mastitis erkrankten Kühen in der Klinik für Rinder der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover isoliert worden.

Die Stammhaltung der Bakterien in Glycerinstocks und die biochemische Charakterisierung erfolgte freundlicherweise im Institut für Mikrobiologie der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover unter der Leitung von Prof. Valentin-Weigand.

Der *E. coli*-Stamm wurde nach der für *Enterobacteriaceae* zusammengestellten „Bunten Reihe“ [105] charakterisiert (siehe Tabelle 4). Die benötigten Testmedien wurden im Institut für Mikrobiologie der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover hergestellt.

Tabelle 4: Biochemisches Reaktionsspektrum des verwendeten *E. coli*-Stamms 1303

-	Kligler (H ₂ S-Nachweis)	+	Methylrot
+	Indolbildung	-	Voges-Proskauer-Reaktion
-	Citrat	+	Glukose
-	Urease	+	Gasbildung
-	Malonat	+	Laktose
-	Phenylalanindecaboxylase	-	Saccharose
+	Lysindecaboxylase	+	Adonit
-	Ornithindecaboxylase	+	Rhamnose
-	Gelatinase	+	Oxidativer Glukoseabbau
-	Motilität	+	Fermentativer Glukoseabbau

+ = positiver Nachweis; - = kein Nachweis

Das Isolat *E. coli*₁₃₀₃ gehört zur phylogenetischen Hauptgruppe A von *E. coli* (*E. coli*-Sammlung von Referenzstämmen, ECOR-A). Ein multiplex PCR-basiertes Screening nach bekannten Virulenzfaktoren von intestinal und extraintestinal pathogenen *E. coli* hat ergeben, dass es sich weder um einen klassischen EHEC, EPEC, EIEC, ETEC oder EAEC noch um einen klassischen extraintestinal pathogenen *E. coli*-Stamm handelt [106, 107]. Es konnten nur die Gene identifiziert werden, die Typ 1 Fimbrien, F17 Fimbrien, Antigen 43, das Eisenzitratsiderophorensystem und das EAST1-Toxin kodieren [13]. Des Weiteren konnte in einer Studie von Duda et al. (2011) für das LPS

von *E. coli*₁₃₀₃ die O-Antigen-Struktur sowie die Core Region K-12 aufgezeigt werden [108].

Bei dem *S. aureus*-Stamm 1027 konnte kulturell-biochemisch die Mannitspaltung, der Clumping Faktor (gebundene Koagulase) sowie die freie Koagulase (Röhrchenkoagulase) nachgewiesen werden. Für die weitere Charakterisierung des Stammes wurden Multilocus Sequence Typing (MLST) und DNA-Arrays an der Ernst Moritz Arndt Universität, Abteilung für Mikrobiologie und Molekularbiologie in Greifswald von Frau Dr. Engelmann durchgeführt.

Einem MLST-basierten Screening zufolge besitzt der *S. aureus*-Stamm 1027 den sequence type (ST) 133 [109]. Der *agr*-type war 1. Des Weiteren konnten keine Gene von Superantigenen mittels DNA-Array nachgewiesen werden [110]. Allerdings ist der *S. aureus* Stamm 1027 im Stande Leukocidine (lukF-PV(P83)/lukM) zu bilden, die humane und bovine Leukozyten schädigen [111].

Zu den biochemischen Eigenschaften wurden zusätzlich Antibiotika-Resistenztestungen in der Zentrumsabteilung Hygiene und Technologie der Milch des Zentrums für Lebensmittelwissenschaften der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover unter der fachlichen Anleitung von Frau Dr. Schröder durchgeführt (siehe Tabelle 5).

Tabelle 5: Antibiotika-Resistenzprofil der verwendeten Stämme *E. coli*₁₃₀₃ und *S. aureus*₁₀₂₇

Antibiotika	<i>E. coli</i> ₁₃₀₃	<i>S. aureus</i> ₁₀₂₇
Amoxicillin/Clavulansäure	S	S
Ampicillin	S	S
Apramycin	S	-
Cefquinom	S	S
Cephalothin	R	-
Cefazolin	-	S
Cefaperazon	S	S
Colistin	S	R
Enrofloxacin	S	S
Erythromycin	R	I
Gentamycin	S	S
Neomycin	S	I
Tetracyclin/Oxytetracyclin	R	S
Trimethoprim/Sulphamethoxazol	S	S
Pirlimycin/Lincomycin	R	S
Penicillin G	R	S
Oxacillin/Cloxacillin	R	S

S = sensibel; R = resistent; I = intermediär; - = nicht untersucht

3.1.6 Versuchstiere

Die Versuchstiere wurden nach den Kriterien eines standardisierten Tiermodells ausgewählt (siehe 3.2.1).

Diese Voraussetzungen wurden von allen 13 im Rahmen des Versuchs verwendeten Tieren erfüllt. Das Alter der Probanden der Rasse Holstein-Friesian lag bei 26 bis 35 Monaten. Alle Tiere befanden sich in der ersten Laktation und waren 59 bis 185 Tage in Milch.

Die Aufstallung der Versuchstiere erfolgte in einem abgeschlossenen, 5 Kuhplätze umfassenden Stallabteil. Die Tiere standen auf Gummimatten mit Stroheinstreu und wurden mit TMR (Totale Mischration) und Heu *ad libitum* und leistungsabhängigen Mengen an Kraftfutter und Getreideschrot gefüttert.

Bei dem Tierversuch handelte es sich um ein durch die Regierung von Oberbayern genehmigtes Versuchsvorhaben mit dem Aktenzeichen 55.2-1-54-2531-102-09.

3.2 Methoden

3.2.1 Auswahl der Versuchstiere

Die Versuchstiere wurden nach Kriterien eines standardisierten Tiermodells ausgewählt. Hierzu wurden ausschließlich Tiere der Rasse Holstein-Friesian verwendet, die sich in der ersten Laktation (2.-6. Monat in Milch) befanden, klinisch gesund und vorberichtlich noch nie an einer Mastitis erkrankt waren. Die Milch aller vier Euterviertel musste einen Zellgehalt von $< 50.000/\text{ml}$ Milch aufweisen und frei von Bakterien sein. Die durchschnittliche tägliche Milchleistung sollte zwischen 15 und 30 l liegen.

Die Erstkalbinnen wurden im Herkunftsbetrieb dreimal im Abstand von sieben Tagen auf diese Kriterien untersucht. Besonderes Augenmerk richtete sich auf die Untersuchung des Euters: Die Euter mussten in allen Untersuchungsparametern (siehe Tabelle 7) mit „o.b.B.“ bewertet werden. Die Milch der vier Viertel wurde nach der Melkbarkeitsprüfung makroskopisch beurteilt und die somatische Zellzahl (SCC) mit Hilfe des DeLaval[®] Cell Counters bestimmt. Eine weitere Probe wurde gezogen, um das Ergebnis im Zentrallabor des Milchprüfrings Bayern später bestätigen zu lassen (siehe 3.2.10). Für eine bakteriologische Untersuchung wurden sterile Milchproben jedes Euterviertels unter antiseptischen Bedingungen gewonnen, gekühlt ins Labor der Klinik für Wiederkäuer mit Ambulanz und Bestandsbetreuung der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) München transportiert und umgehend bakteriologisch untersucht (siehe 3.2.9).

Des Weiteren wurde zu den drei Beprobungsterminen eine komplette klinische Allgemeinuntersuchung durchgeführt [112]. Um die Beurteilung der Allgemeingesundheit zu vervollständigen, wurde ein rotes und weißes Blutbild angefertigt und die chemischen Blutparameter untersucht. Nur wenn alle Parameter physiologische Werte zeigten, insbesondere die Parameter des Scores zur Beurteilung der Allgemeingesundheit (siehe Tabelle 6) ohne besonderen Befund waren, und das Tier als klinisch gesund einzustufen war, wurde es angekauft und in der Klinik für Wiederkäuer der LMU München eingestallt. Während der folgenden zwei Wochen wurden die Tiere an Futter, Umgebung, Melkzeug und Melker gewöhnt. In dieser Zeit wurden die Tiere auf

ein 12 h Melkintervall eingestellt. Einmal wöchentlich wurden Milchproben auf Mastitiserreger sowie Milchinhaltsstoffe untersucht (siehe 3.2.10) und Blutproben zur Überwachung von Entzündungsparametern genommen (siehe 3.2.11, 3.2.12). Ab dem Tag der Einstellung an der Klinik für Wiederkäuer in Oberschleißheim wurde täglich zweimal die Milchleistung, die rektal gemessene Temperatur und die Futteraufnahme dokumentiert [113].

Nach einer zweiwöchigen Eingewöhnungsphase wurden die Versuchstiere durch intravaginale Applikation einer Progesteronspange (siehe 3.1.2) über einen Zeitraum von 7 Tagen und intramuskuläre Injektion von 150 µg Cloprostenol (PGF_{2α}, Prostaglandin_{2α}) am Tag 6 zyklussynchronisiert, so dass sich diese zum Versuchsbeginn (24 h nach Entfernung der Spange) in Brunst befanden. Durch die Synchronisation der Tiere sollten hormonelle Einflüsse verschiedener Zyklusstadien auf die Milchinhaltsstoffe sowie die verschiedenen Zellpopulationen minimiert werden.

3.2.2 Präparation der Infektionsdosis

Die beiden Bakterienstämme (*E. coli*₁₃₀₃ und *S. aureus*₁₀₂₇), die in den Versuchen eingesetzt wurden, stammten aus dem Milchsekret klinisch an Mastitis erkrankter Kühe (Patienten der Klinik für Rinder der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover; siehe 3.1.5). Die Bakterien lagen kryokonserviert auf Cryoballs vor (Mikrobank-System „CryobankTM“). Nach dem Ausplattieren auf einem Columbia-Schafblut-Agar erfolgte die Inkubation bei 37°C. Nach 24 h wurden mehrere Kolonien mittels einer Öse in 10 ml Hirn-Herz-Bouillon (Brain-Heart-Infusion-Broth, BHI) überführt, auf dem Vortexer gut durchmischt und 6 h bei 37°C inkubiert. Nach erneutem intensivem Durchmischen wurden 100 µl dieser Suspension in 9,9 ml Trypton-Soja-Bouillon (TSB) überführt, gut durchmischt und über 18 h bei 37°C inkubiert. Um eine definierte Anzahl an CFU sicherzustellen, wurde die photometrisch bestimmte optische Dichte einer Bouillon mit der Keimzahlbestimmung durch das Spatelverfahren verknüpft: Dazu wurde zunächst eine Verdünnungsreihe in Zehnerschritten mit 0,9%iger NaCl-Lösung bis zu einer Stufe von 10⁻⁸ hergestellt. Anschließend wurden jeweils 100 µl der Verdünnungsstufen 10⁻⁶ bis 10⁻⁸ bei *E. coli*₁₃₀₃ und 10⁻⁵ bis 10⁻⁷ bei *S. aureus*₁₀₂₇ als Triplikate auf Columbia-Schafblut-Agar ausplattiert. Dies erfolgte mit Hilfe von rund 10 sterilen Glasperlen, welche zuvor auf den Nährboden verbracht worden waren. Hierzu wurde die aufgebrauchte Bakteriensuspension durch vorsichtiges Schütteln der vorbereiteten Platten gleichmäßig auf der Oberfläche verteilt. Nachdem die Suspension

vollständig vom Nähragar aufgenommen worden war, wurden die Glasperlen durch Auskippen entfernt. Die Platten wurden daraufhin bei 37°C über 24 h inkubiert. Platten, die zwischen 3 und 300 Kolonien aufwiesen, wurden ausgezählt. Diese Zahl wurde nun ins Verhältnis zu der photometrisch bestimmten optischen Dichte (OD) der ersten Verdünnungsstufe (10^{-1}) gesetzt. Durch wiederholt reproduzierbare Werte nach Ausplattieren konnte eine Eichkurve erstellt werden, die es ermöglichte, durch Ermittlung der OD der ersten Verdünnungsstufe bei einer Wellenlänge von 623 nm auf die Anzahl CFU in der Bouillon zu schließen. Mit ihrer Hilfe wurde danach durch Bestimmung der OD in der Bouillon die entsprechende Bakterienkonzentration in CFU errechnet. Die angestrebte Infektionsdosis von $5 \cdot 10^6$ CFU/ml wurde mit entsprechenden Teilen steriler 0,9%iger NaCl-Lösung eingestellt und durch Ausplattieren sowie Inkubation bei 37°C über 24 h kontrolliert.

3.2.3 Voruntersuchung der Versuchstiere am Versuchstag

Am Morgen des Versuchstages (Versuchszeitpunkt: Std. -3) erfolgte nach gründlicher Reinigung des Euters eine Untersuchung des Vor- und Viertelanfangsgemelks. Hierzu wurde das Sekret in einer Viertelgemelksschale zunächst makroskopisch beurteilt und anschließend ein California-Mastitis-Test (CMT) sowie die Messung der Zellzahl mittels des DeLaval[®] Cell Counters (DCC) durchgeführt (siehe 3.2.6 und 3.2.10). Dann wurde das Versuchstier mit einer speziellen Vierviertelmelkmaschine (siehe Abbildung 3) ohne Gabe von Oxytozin gemolken. Die Milchmenge der einzelnen Euterviertel wurde dokumentiert, die Zellzahl im Gesamtgemelk mit Hilfe des DCC ermittelt und Proben für die Untersuchung auf Milchinhaltsstoffe asserviert (siehe 3.2.10). Die gründliche Adspektion und Palpation des leergemolkenen Euters schloss die Voruntersuchung ab. Des Weiteren wurde die innere Körpertemperatur gemessen und eine rektale Untersuchung des Tieres mit vorheriger Adspektion des äußeren Genitale durchgeführt, um zu bestätigen, dass sich das Tier im Östrus befindet.

3.2.4 Intramammäre Inokulation einzelner Euterviertel mit *E. coli*₁₃₀₃ (Pilotversuch)

Im Vorfeld wurden anhand eines Pilotversuchs die Auswirkungen der Inokulation einer hohen Dosis *E. coli*₁₃₀₃ auf die frühe Regulation entzündungsrelevanter Faktoren im Euter untersucht. Hierzu wurde im Unterschied zu früheren Tierversuchen im Rahmen der Forschergruppe [35, 114] die Infektionsdosis von 500 CFU auf $5 \cdot 10^6$ CFU erhöht, um initial innerhalb des kurzen Expositionszeitraumes von 4 h eine möglichst gute

Verteilung der Pathogene im Euter zu ermöglichen und die Reaktion auf Wirtsebene zu beschleunigen.

Das verwendete Versuchstier entsprach den Auswahlkriterien des standardisierten Tiermodells (siehe 3.2.1).

Inokuliert wurden die beiden hinteren Euterviertel (siehe 3.2.5 und Abbildung 1). Das Viertel HR (hinten rechts) wurde bis zur Probennahme nach der Tötung des Tieres nicht manipuliert, um die inokulierten Keime nicht auszumelken oder den Keimgehalt durch eine Probennahme zu verfälschen. Das andere inokulierte Viertel (HL, hinten links) diente der Gewinnung von Milchproben während des Versuchs, um das Sekret makroskopisch beurteilen, bakteriologische Untersuchungen durchführen und die somatische Zellzahl (SCC) messen zu können (siehe 3.2.6, 3.2.9 und 3.2.10).

Nach der Tötung des Tieres 4 h *post inoculationem* wurden unmittelbar im Anschluß Gewebeproben aus den beiden rechtsseitig gelegenen Eutervierteln gewonnen (siehe 3.2.14) und in RNAlater[®] fixiert. Folgende der in Abbildung 5 aufgeführten Lokalisationen wurden hierbei beprobt: Strichkanal (S), Fürstenberg'sche Rosette (F), Zitenzisterne (ZZ), Drüsenzisterne (DZ), ventrales Euterparenchym (EU) und dorsales Euterparenchym (EUd). Anschließend erfolgte die Probenaufarbeitung und RNA-Extraktion sowie Vermessung mittels Affymetrix-Microarray-Technologie wie bei Mitterhuemer (2009) beschrieben im Genzentrum der Ludwig-Maximilians-Universität München unter der Leitung von Dr. Helmut Blum [13].

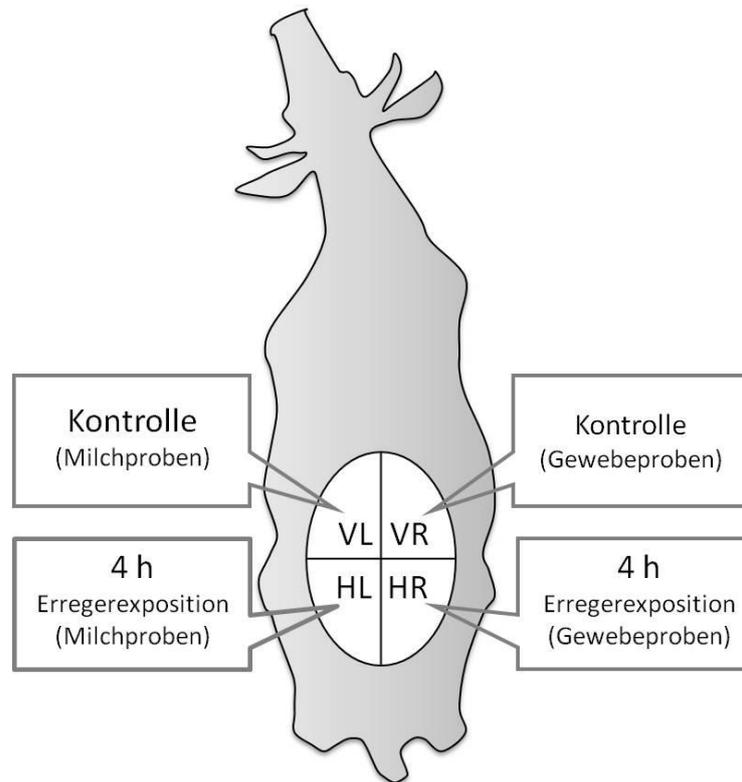


Abbildung 1: Inokulationsschema im Rahmen des Pilotversuchs

Zu Versuchsbeginn wurden die Euterviertel hinten rechts (HR) und hinten links (HL) mit $5 \cdot 10^6$ CFU *E. coli*₁₃₀₃ inokuliert. Die Viertel vorne rechts (VR) und vorne links (VL) blieben unbehandelt. Die linksseitigen Euterviertel dienten während der Versuchsdauer zur Gewinnung von Milchproben. Das Tier wurde nach 4 h geschlachtet. Unmittelbar darauf erfolgte die Gewinnung von Gewebeprobe aus den rechtsseitigen Vierteln.

3.2.5 Intramammäre Inokulation einzelner Euterviertel mit *E. coli*₁₃₀₃ und *S. aureus*₁₀₂₇

Es wurden 2 Versuchsgruppen gebildet: In der Gruppe *Ec 3h* wurden 6 Erstkalbinnen über 3 h intramammär mit *E. coli*₁₃₀₃ exponiert; in der Gruppe *Sa 3h* (n = 6) mit *S. aureus*₁₀₂₇.

Vor der Inokulation der Pathogene (3 h nach dem Morgenmelken, Versuchszeitpunkt Std. 0) wurden sterile Milchproben zur anschließenden bakteriologischen Untersuchung gewonnen (siehe 3.2.6 und 3.2.9). Unmittelbar nach intravenöser Verabreichung von 20 IE Oxytozin (in 2 ml) wurden die Tiere mit der Vierviertelmelkmaschine ausgemolken. Ziel hierbei war es, das Euter möglichst leermelken, damit die inokulierte Infektionsdosis sich nicht in unterschiedlichen Volumina Residualmelk verteilt. Dies wurde durch manuelle Massage des Organs zum Ende des Melkvorgangs hin unterstützt. Die Milchmenge pro Viertel wurde dokumentiert und die Zellzahl des

Residualgemelks gemessen. Außerdem wurden Milchproben genommen, um die Milchbestandteile durch das Zentrallabor des Milchprüfrings Bayern e.V. analysieren zu lassen (siehe 3.2.10.)

Unmittelbar nach dem Ausmelken mit Oxytozin erfolgte die Inokulation der Infektionsdosis in das Euterviertel hinten links (HL). Hierzu wurde die Zitze, insbesondere die Zitzenkuppe des zu inokulierenden Viertels mit 70%igem Ethanol getränktem Zellstoff gründlich gereinigt und antiseptisch vorbereitet. Die Infektionsdosis von $5 \cdot 10^6$ CFU wurde in einem Volumen von 2 ml steriler 0,9%iger NaCl-Lösung mittels einer Einwegspritze und einer sterilen Zitzenkanüle in die Zitzenzisterne appliziert. Während der Entfernung der Zitzenkanüle aus dem Zitzenkanal, wurde die Zitzenkuppe mit Daumen und Zeigefinger zusammengedrückt, um ein Zurücklaufen der Flüssigkeit zu verhindern. Nach Inokulation der Infektionsdosis erfolgte kein weiteres Massieren des Eutergewebes. Die Inokulation der Viertel vorne links (VL) und hinten rechts (HR) erfolgte jeweils eine bzw. zwei Stunden nach dem ersten Viertel auf die gleiche Art und Weise (siehe Abbildung 2).

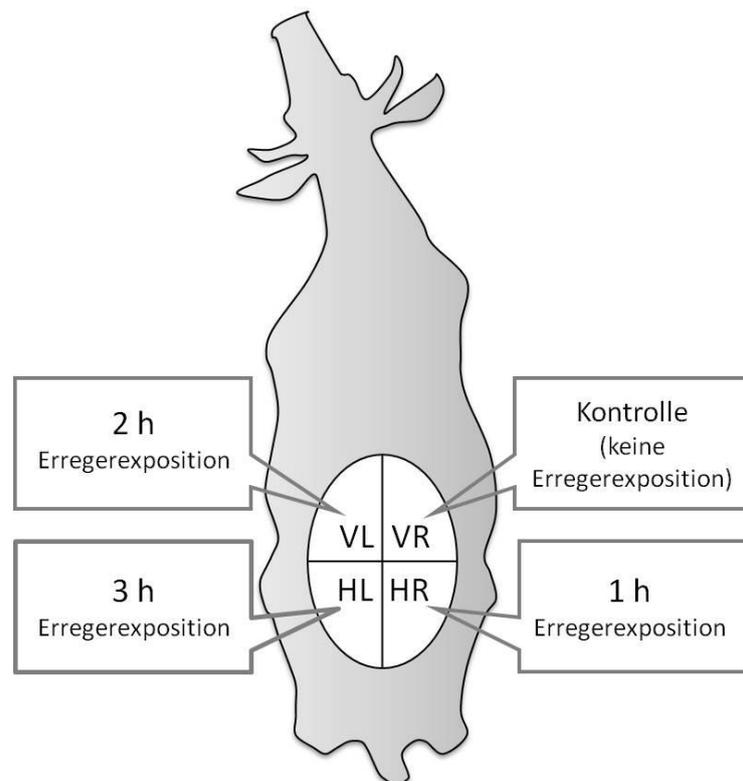


Abbildung 2: Inokulationsschema im Rahmen des Hauptversuchs

Das Viertel vorne rechts (VR) diente als Kontrolle und wurde nicht inokuliert. Die Inokulation der anderen drei Viertel mit $5 \cdot 10^6$ CFU *E. coli*₁₃₀₃ oder *S. aureus*₁₀₂₇ erfolgte stets in der gleichen Reihenfolge im Abstand von genau einer Stunde, beginnend beim Viertel hinten links (HL), dann vorne links (VL) und abschließend hinten rechts (HR).

3.2.6 Gewinnung von Milchproben

Vor Beginn des Melkens wurden per Hand etwa 2 ml Milch in die Vertiefungen einer Viertelgemelksschale gemolken. Anschließend wurde die Milch grobsinnlich beurteilt und der CMT durchgeführt. Bei Vorliegen grober Verschmutzungen wurden die Zitzen jeweils mit einem feuchten Eutertuch vorgereinigt und unmittelbar danach mit Zellstoff getrocknet. Darauffolgend wurden die Zitzenkuppen mit 70%igem Ethanol getränktem Zellstoff gründlich desinfiziert. Danach wurden aus jedem Viertel ca. 5 ml Milch steril entnommen und umgehend zur bakteriologischen Untersuchung ins Labor gebracht. Nach kurzem manuellen Anrühren des Euters wurde die Vierviertelmelkmaschine ans Euter angesetzt (siehe Abbildung 3). Nach Beendigung des Melkakts wurde die Milchmenge pro Viertel gemessen und Milch zur Untersuchung auf Inhaltsstoffe und Zellgehalt (siehe 3.2.10) entnommen.



Abbildung 3: Vierviertelmelkmaschine mit angesetztem Melkzeug

Gezeigt ist der Melkakt mittels Vierviertelmelkmaschine: Das Sammelstück ist in 4 Kammern geteilt und über 4 Milchschräuche mit den Milchauffangzylindern der Melkmaschine verbunden. An den Zylindern ist eine Eichskala angebracht, um die ermolkene Milchmenge pro Viertel direkt ablesen zu können.

3.2.7 Klinische Allgemeinuntersuchung

Eine klinische Untersuchung der Tiere wurde zu folgenden Zeitpunkten durchgeführt:

Dreimal im Abstand von einer Woche im Herkunftsbetrieb, bei Einstellung in die Klinik für Wiederkäuer der LMU München, daraufhin im wöchentlichen Rhythmus, unmittelbar vor der ersten Infektion (Std. 0) und 3 h nach der ersten Infektion (Std. 3). Die innere Körpertemperatur wurde während des Infektionsversuchs stündlich gemessen und dokumentiert.

Zu den Beobachtungszeitpunkten wurden Herzfrequenz, Schleimhautfarbe, Pansenmotorik, Futteraufnahme, Körperhaltung und Verhalten der Tiere festgestellt und hinsichtlich pathologischer Abweichungen bewertet (siehe Tabelle 6).

Tabelle 6: Klinischer Score für Allgemeingesundheit [115]

Variable	Kriterium	Punkte
innere Körpertemperatur (°C)	37,8-39,2	0
	39,3-40,0	1
	40,1-41,4	2
	≥ 41,5 oder < 37,8	3
Herzfrequenz (Schläge/min)	< 90	0
	≥ 90	1
Pansenkontraktionsrate (Kontraktionen/2 min)	≥ 2	0
	1	1
	0	2
Verhalten (Anzeichen von Depression)	aufmerksam	0
	lethargisch	1
	apathisch	2
	hochgradig erkrankt, festliegend	3
Futteraufnahme	unverändert	0
	reduziert	1
	keine	2
Gesamtpunktzahl systemischer Parameter	geringgradig erkrankt	1-3
	mittelgradig erkrankt	4-8
	hochgradig erkrankt	9-11

Abkürzung: o. b. B. = ohne besonderen Befund

3.2.8 Klinische Untersuchung des Euters

Zu den unter 3.2.7 genannten Beobachtungszeitpunkten wurde auch eine gründliche Untersuchung des Euters durchgeführt. Bei der Adspektion und Palpation wurden alle Euterviertel vergleichend zum Kontrollviertel anhand des klinischen Scores für lokale Parameter am Euter beurteilt (siehe Tabelle 7).

Tabelle 7: Klinischer Score für Eutergesundheit [115]

Variable	Kriterium	Punkte
Schwellung/Induration des Viertels	o. b. B.	0
	1,5fach	1
	2fach	2
Subkutanes Ödem	o. b. B.	0
	< 50% des Viertels	1
	> 50% des Viertels	2
Anzeichen für Schmerzhaftigkeit des Viertels	o. b. B.	0
	schmerzhaft	1
Oberflächentemperatur	unverändert	0
	erhöht	1
Milchsekret	o. b. B.	0
	einige Flocken	1
	viele Flocken	2
	Verlust des Milchcharakters, serumartiges Sekret	3
Gesamtpunktzahl der lokalen Parameter	geringgradige Entzündung	1-3
	mittelgradige Entzündung	4-7
	hochgradige Entzündung	8-9

Abkürzung: o. b. B. = ohne besonderen Befund

3.2.9 Bakteriologische Untersuchung des Eutersekrets

Die unter antiseptischen Bedingungen entnommene Milch (siehe 3.2.6) wurde unmittelbar nach der Entnahme auf Eis gelagert. Aus jeder Milchprobe wurde mittels einer sterilen Impföse (Durchmesser 5 mm) durch einmaliges Eintauchen die nochmals resuspendierte Milch entnommen und jeweils auf Columbia-Schafblut-Agar, Edwards-Agar mit Schafblut und Kristallviolett-Galle-Laktose-Agar ausgestrichen. Die Agarplatten wurden anschließend über 24 h bei 37°C im Brutschrank bebrütet und auf bakterielles Wachstum untersucht. Gewachsene Kolonien wurden ausgezählt. Anschließend wurden die Platten über weitere 24-36 h (insgesamt also 48 h) bebrütet und erneut ausgewertet.

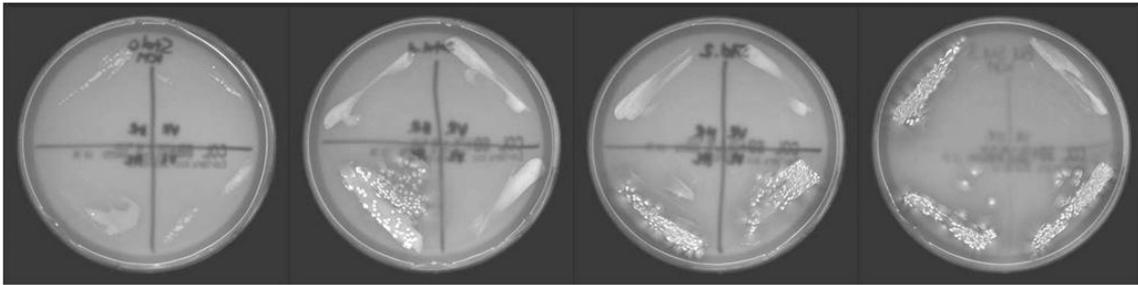


Abbildung 4: Bakteriologische Untersuchung von Viertelgemelksproben

Die in vier Kompartimente für die jeweiligen Viertel unterteilten Agarplatten spiegeln den Infektionsverlauf im Rahmen des Tiermodells nach Inokulation von *E. coli*₁₃₀₃ wider.

Zur Bestimmung der Keimdichte im Verlauf des dreistündigen *in vivo*-Versuchs wurde zu den Zeitpunkten Std. 1, Std. 2 und Std. 3 aus allen vier Vierteln 2 ml Milch steril ermolken, zum Zeitpunkt Std. 1,5 nur aus dem Viertel HL und zum Zeitpunkt Std. 2,5 nur aus den Vierteln HL und VL, um die Viertel nach der Inokulation für einen Zeitraum von einer Stunde unmanipuliert zu belassen. Die Milchproben aus bereits infizierten Vierteln wurden nach dem Ausstreichen für die bakteriologische Untersuchung zur Herstellung einer Verdünnungsreihe mit steriler 0,9%iger NaCl verwendet und die Verdünnungsstufen 10^{-1} bis 10^{-3} mittels steriler Glaskügelchen auf Columbia-Schafblut-Agar ausplattiert (siehe 3.2.2). Nach Inkubation über 24 h bei 37°C erfolgte die Auszählung der gewachsenen Kolonien mit Hilfe eines automatischen Koloniezählers und die Berechnung der CFU/ml Milch zu den entsprechenden Versuchszeitpunkten während des Versuchs.

Am Ende des Versuchs wurden nach dem Ausmelken mit der Vierviertelmelkmaschine aus dem Auffangbehälter jedes Viertels nach kräftigem Schwenken etwa 10 ml Milch in ein steriles Röhrchen überführt, wiederum eine Verdünnungsreihe von 10^{-1} bis 10^{-3} angefertigt und auf Selektivnährböden ausplattiert. Bei *E. coli*₁₃₀₃ erfolgte dies auf VRB-Agar, bei *S. aureus*₁₀₂₇ auf Baird-Parker-Agar. Die Platten wurden 24 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert und anschließend ebenfalls mit dem automatischen Koloniezähler ausgezählt. So konnte die Keimzahl/ml Milch nach unterschiedlich langer Erregerexposition errechnet werden. Um einen Eindruck zu gewinnen, ob sich die inokulierten Erreger im Euter nach 3 h bereits vermehrt hatten, wurde diese Keimzahl/ml mit der zum Versuchsende gewonnenen Milchmenge in ml multipliziert und so die absolute Milchkeimzahl der inokulierten Euterviertel berechnet.

3.2.10 Bestimmung der Inhaltstoffe und des somatischen Zellgehaltes (SCC) der Milch

Die in spezielle Gefäße, in denen das Konservierungsmittel Acidiol vorgelegt war, überführten Milchproben wurden an das Zentrallabor (DIN EN/ISO 17025 akkreditiert) des Milchprüfrings Bayern e.V. in Wolnzach gesandt. Die Bestimmung des SCC erfolgte durch fluoreszenzoptische Zählung somatischer Zellen ($1 \cdot 10^3$ /ml) in Rohmilch mit dem Fossomatic[®]-5000. Die Untersuchung der Rohmilch auf Fett- und Eiweißgehalt (%) erfolgte mittels einer Infrarot-spektroskopischen Methode mit dem MilcoScan-FT-6000. Die Untersuchung der Milch auf den Laktosegehalt (%) und Harnstoffgehalt (mg/l) erfolgte ebenfalls mit dem MilcoScan-FT-6000 nach einer Hausmethode der Firma FOSS Deutschland, Hamburg.

Zusätzlich zur fluoreszenzoptischen Zählung beim Milchprüfing Bayern e.V. wurde der SCC stets parallel in der Klinik für Wiederkäuer der LMU München in Oberschleißheim mit dem DCC bestimmt. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgt dabei ebenfalls durch fluoreszenzoptische Messung ($1 \cdot 10^3$ /ml).

3.2.11 Klinische Labordiagnostik

Das Differentialblutbild und das rote Blutbild wurden im klinischen Labor der Klinik für Wiederkäuer der LMU München erstellt. Das rote Blutbild wurde mittels eines Sysmex pochH100i angefertigt. Für das Differentialblutbild wurde ein Blutausschrieb nach Pappenheim gefärbt und mikroskopisch differenziert. Die Tiere wurden zunächst unmittelbar vor und nach der Aufstallung und im Versuch zu den Zeitpunkten Std. 0

und Std. 3 untersucht. Dabei war die Zahl zirkulierender Leukozyten von besonderem Interesse, da sie ein Parameter der systemischen Reaktion im Rahmen einer Immunantwort ist.

3.2.12 Gewinnung von venösem Blut

Das Blut wurde durch Punktion der *Vena jugularis* unter antiseptischen Kautelen nach Fixierung des Tieres und manueller Stauung des Gefäßes gewonnen. Zur Blutentnahme wurde eine sterile 14G-Kanüle und das EDTA- sowie Serum-Blutentnahmesystem Monovette® für die Gewinnung von Blutleukozyten, -plasma und -serum eingesetzt.

3.2.13 Gewinnung von Blutplasma

Das mittels EDTA-Monovetten® entnommene Blut ruhte bei Raumtemperatur etwa 10 min. Die Röhrchen wurden anschließend bei 5000*g über 10 min bei Raumtemperatur mit Bremse zentrifugiert. Der Überstand (Plasma) wurde vorsichtig mit einer Eppendorfpipette abgesaugt. Dabei war zu beachten, dass der Blutkuchen nicht aufgeschwemmt wird.

3.2.14 Gewinnung von Gewebeproben

Die Teilsektion der Versuchstiere wurde in der Abteilung Pathologie des Bayerischen Landesamts für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit in Oberschleißheim durch Frau Priv.-Doz. Dr. Angela Hafner-Marx durchgeführt. Die Tiere wurden 3 h nach Versuchsbeginn durch Betäubung mittels Bolzenschuss und anschließendem Blutenzug getötet. Innerhalb von 30 - 40 min nach der Tötung wurden Eutergewebeproben unter antiseptischen Bedingungen entnommen.

Hierzu wurde das Euter vollständig vom Rumpf abgetrennt und anschließend wurden die vier Zitzen an der Zitzenbasis abgesetzt. Die Zitzenzisterne und der Strichkanal wurden der Länge nach eröffnet und die Zitze mit Hilfe steriler Kanülen auf eine Styroporplatte, die mit steriler Aluminiumfolie überzogen war, aufgespannt. Sodann wurden aus der Schleimhaut der Zitzenzisterne (ZZ) zügig 3 Gewebestückchen von ca. 0,5*1*0,3 cm präpariert und entnommen, welche sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurden. Gleichzeitig wurde das Drüsenparenchym für die Probenentnahme vorbereitet. Zunächst wurde dazu die Euterhaut entfernt und darauf folgend das verwendete Messer gründlich desinfiziert. Anschließend wurde aus den beiden Euterhälften jeweils eine, die Drüsenzisterne möglichst mittig anscheidende sagittale

„Scheibe“ von ca. 5 cm Dicke parallel zur Medianen präpariert. Im nächsten Schritt wurden hieraus so schnell wie möglich je 3 bis 4 Gewebeproben von 0,5*1*0,3 cm Größe aus der Drüsenzisterne (DZ) und 1*1*1 cm große Würfelchen aus dem ventralen Euterparenchym (EU) eines jeden Viertels entnommen und unmittelbar danach wiederum in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Um eine Verschleppung von Keimen zu verhindern, wurde für jedes Euterviertel eigenes steriles Präparierbesteck verwendet. Die Probenentnahme erfolgte hierbei immer in derselben Reihenfolge: zunächst am Viertel VL (2 h *p. inoc.*), anschließend HL (3 h *p. inoc.*), sodann am Kontrollviertel VR und schließlich HR (1 h *p. inoc.*).

Nach Beendigung der Gewinnung der Stickstoffproben wurde sofort mit der weiteren Entnahme von Gewebestückchen zur Fixierung in RNAlater[®] fortgefahren. Diese erfolgte in der gleichen Reihenfolge und von distal nach proximal, wobei die Größe der Gewebeproben mit ca. 0,5*0,5*0,2 cm etwas kleiner gewählt wurde, um eine optimale Fixierung der RNA zu gewährleisten. Die Proben wurden in sterile, DNase- und RNase-freie Gefäße mit 4 ml RNAlater[®] überführt und umfassten zahlreiche Lokalisationen und Gewebe des Strichkanals, der Fürstenberg'sche Rosette, der Zitzen- und Drüsenzisterne sowie des Euterparenchyms.

Die in RNAlater[®] verbrachten Proben wurden über Nacht im Kühlschrank bei 4°C gelagert und nach 24 h und Abgießen des RNAlater[®] in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C als Rückstellproben für weitere holistische Analyseansätze aufbewahrt.

Die in flüssigem Stickstoff konservierten Proben wurden nach Rückkehr in die Klinik für Wiederkäuer der LMU München sofort in eine Gefriertruhe überführt und bis zur Aufarbeitung und Analyse bei -80°C tiefgefroren gelagert.

Die Zeit zwischen Tötung und Beendigung der Entnahme der in Stickstoff konservierten Proben betrug im Durchschnitt 15-20 min, die vollständige Probenentnahme war 30-40 min nach dem Tod des Tieres abgeschlossen.

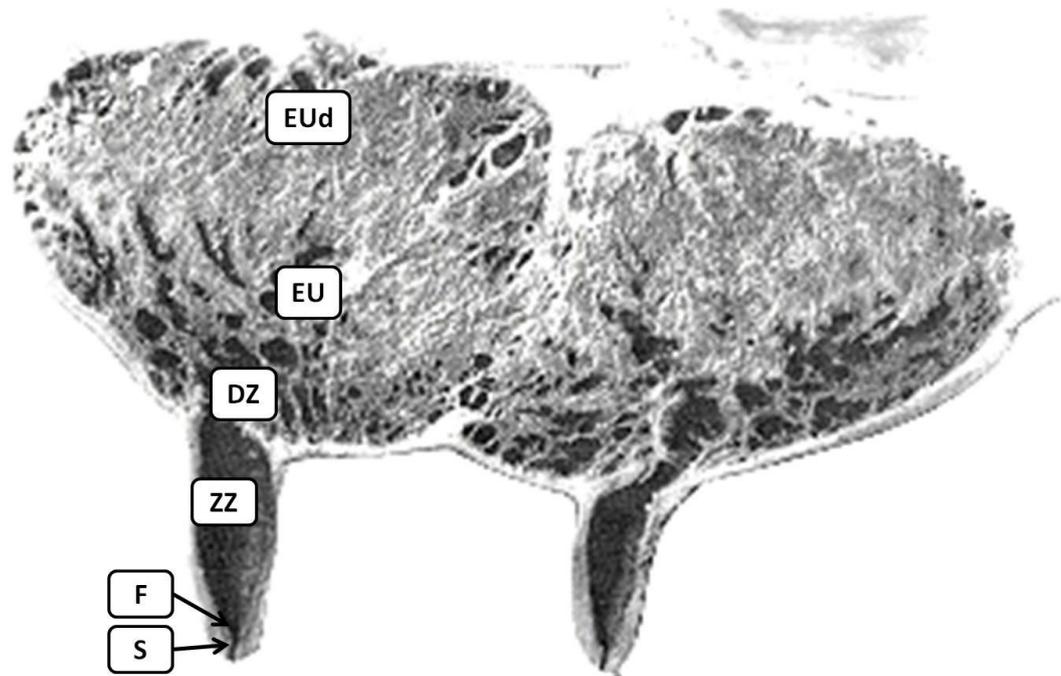


Abbildung 5: Lokalisationen der Gewebeproben

Dargestellt sind die einzelnen Lokalisationen, an denen nach Tötung der Versuchstiere Gewebeproben entnommen wurden. Die schwarzen Kästchen zeigen die Entnahmestellen im Rahmen des Pilotversuchs: S= Strichkanal, F= Fürstenberg'sche Rosette, ZZ=Zitzenzisterne, DZ= Drüsenzisterne, EU= ventrales Euter, EUd= dorsales Euter. In den weiteren Versuchen beschränkte sich die Probennahme für die Untersuchung der Expression ausgewählter Kandidatengene auf die Lokalisationen ZZ, DZ und EU.

3.2.15 Molekularbiologische Untersuchungen

Die Reverse Transkription (RT) mit folgender Polymerase Kettenreaktion (PCR) dient dem Nachweis einer spezifischen mRNA. Mittels quantitativer real-time PCR (qRT-PCR) ist es dabei möglich, einen quantitativen Nachweis spezifischer Transkripte zu erhalten. Diese Methode wurde zur Untersuchung der Expression verschiedener immun-relevanter Kandidatengene nach unterschiedlich langer Pathogen-Inokulation im Rahmen des in dieser Arbeit eingesetzten Tiermodells angewendet. Als Basisexpression wurde die mRNA-Expression des jeweiligen Gens in den unbehandelten Kontrollvierteln zum Ende des Versuchs definiert. Die Aufarbeitung der Gewebeproben und Durchführung der qRT-PCR erfolgte im Labor von Prof. Hans-Martin Seyfert des Leibnitz-Instituts für Nutztierbiologie (FBN) in Dummerstorf. Der Transport der zu untersuchenden Proben erfolgte auf Trockeneis.

Die qRT-PCR wurde wie bei Petzl *et al.* (2008) beschrieben durchgeführt [35]. Zusammengefasst erfolgten die Aufarbeitung und die Analyse nach dem folgenden Protokoll:

mRNA-Extraktion

Die kryokonservierten Proben wurden mit Trizol[®] Reagenz homogenisiert (1 ml Trizol[®] je ~100 mg Gewebe), das Homogenisat für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert sowie der Zelldetritus durch Zentrifugation (12.000*g; 5 min, 4°C) abgetrennt.

Zur mRNA-Aufreinigung wurden anschließend 0,2 Volumenanteile (Vol) Chloroform zugesetzt und die Proben gründlich durchmischt. Zur Phasentrennung wurde die Probe im Anschluss abzentrifugiert (12.000*g; 15 min, 4°C) und die RNA-haltige wässrige Phase in ein frisches Gefäß überführt. Hieraus wurde die RNA anschließend durch Zusatz von 0,5 Vol Isopropanol präzipitiert. Nach 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die RNA abzentrifugiert (12.000*g, 10 min), einmal mit 75%igem Alkohol gewaschen und nach kurzer Trocknung in sterilem, redestilliertem, RNase-freiem Wasser gelöst, um kontaminierendes Material zu entfernen.

Die Reinheit und Konzentration der gewonnenen mRNA wurde im Spektralphotometer mit Hilfe der Extinktion bei 260 nm, 280 nm und 320 nm ermittelt. Über den Quotienten der optischen Dichte bei 260 nm und 280 nm wurde die Reinheit der RNA-Proben beurteilt. Als akzeptabel galten Quotienten von 1,7 bis 2,1. Niedrigere Quotienten wiesen auf eine Verunreinigung mit Proteinen hin.

Die Konzentration (c) in µg/ml wurde anhand der optischen Dichte bei 260 nm (OD₂₆₀) nach folgender Formel berechnet:

$$c [\mu\text{g/ml}] = \text{OD}_{260} * 40$$

c: Konzentration der RNA in µg/ml
OD₂₆₀: optische Dichte bei 260 nm

Formaldehyd-Agarose-Gel-Elektrophorese

Zur Bestimmung der Qualität der gewonnenen RNA wurde eine Formaldehyd-Agarose-Gel-Elektrophorese durchgeführt (siehe Abbildung 6).

Von den RNA-Proben wurden jeweils 5 – 10 µg Gesamt-RNA enthaltende Anteile entnommen. Nach der Zugabe von 5*RNA-Lade-Puffer im Verhältnis 1:4 wurden die Proben bei 65°C für 5 min denaturiert. Bevor die Proben dann für ca. 3 h bei einer Spannung von 5 bis 7 V/cm im elektrischen Feld aufgetrennt wurden, musste das

1,2%ige Formaldehyd-Agarose-Gel für eine halbe Stunde mit 1*Formaldehyd-Lauf-Puffer equilibriert werden. Bei intakter mRNA werden zwei getrennte Banden, die 18S- und die 28S-Bande ribosomaler RNA deutlich sichtbar.

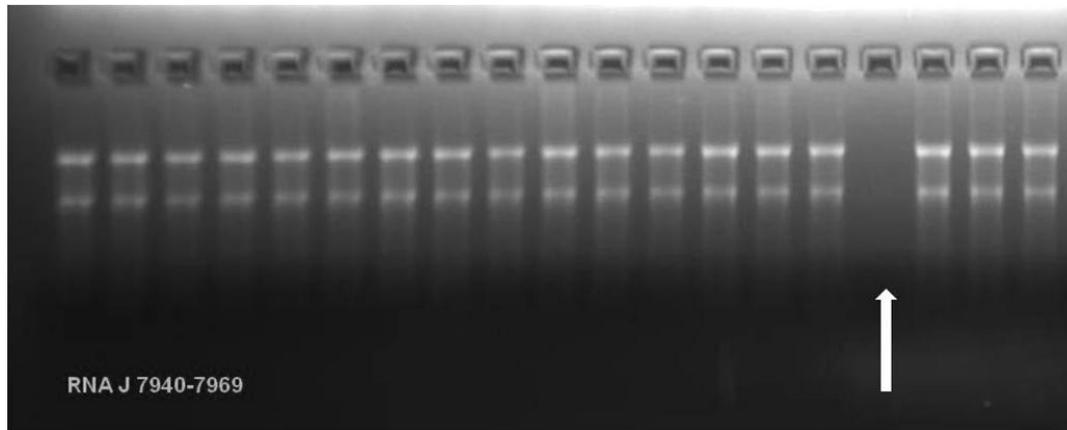


Abbildung 6: Beispiel eines Formaldehyd-Agarose-Gels

Dargestellt ist ein Formaldehyd-Agarose-Gel nach Elektrophorese zur Qualitätsbestimmung der gewonnenen Gesamt-RNA. Der Pfeil markiert eine degradierte Probe.

Reverse Transkription der mRNA in cDNA

Insgesamt 1,5 µg der gewonnenen mRNA wurde mit Hilfe der RT-PCR SuperScript® III Reverse Transkriptase nach dem Protokoll der Firma Invitrogen in cDNA (komplementäre DNA) umgewandelt.

Die Arbeitsschritte wurden soweit nicht anders angegeben auf Eis ausgeführt. Insgesamt 1 µl RNA, aufgenommen in 28 µl Wasser, wurde mit 2 µl Oligo(dT)₂₀ und 1 µl 10 mmol/l dNTP Mix versetzt und gemischt. Im Anschluss wurde die Probe für 5 min bei 70°C inkubiert. Diese Wärmebehandlung dient der Auffaltung von Sekundärstrukturen der RNA. Die Probe wurde für 2 min auf Eis abgekühlt. Es wurden 6 µl 5*RT Puffer, 1 µl RNaseOUT®, 1 µl SuperScript® III RT und 1 µl 0,1 M DTT hinzugefügt und vorsichtig gemischt.

Die Probe wurde bei 50°C im vorgeheizten Thermocycler für 50 min inkubiert. Die Reverse Transkriptase wurde im Anschluss bei 85°C für 5 min inaktiviert. Unter Zugabe von 1 µl RNase H (2 U/µl) folgte ein weiterer Inkubationsschritt bei 37°C für 20 min. Diese Reaktion wurde auf Eis gestoppt. Die gewonnene cDNA wurde entweder bei -20°C vorübergehend gelagert oder sofort weiterverarbeitet.

Aufreinigung der cDNA

Eine anschließende Aufreinigung der cDNA geschah mithilfe des „High Pure PCR Product Purification Kit“ der Firma Roche entsprechend der Anleitung des Herstellers.

Quantifizierung der cDNA mittels Realtime RT-PCR

Die qRT-PCR basiert, wie die konventionelle PCR, auf der Wiederholung von drei Reaktionsschritten: Im ersten Schritt wird die doppelsträngige DNA aufgeschmolzen. Der zweite Schritt beinhaltet die Anlagerung der Primer, und im dritten Schritt erfolgt die Verlängerung des Produkts [116]. Der Ablauf der drei Reaktionsschritte wird als Zyklus bezeichnet. Eine vollständige PCR umfasst 40 bis 50 Zyklen. Bei der RT-PCR wird ein Farbstoff eingesetzt, der an die Produkte bindet und deren Anwesenheit durch Fluoreszenz anzeigt. Der im Detektionssystem SYBR green[®] („Fast Start DNA Master Plus SYBR green“) befindliche Farbstoff SYBR Green fluoresziert nach der Anlagerung an die kleine Windung doppelsträngiger DNA grün. Die Fluoreszenz steht dabei in direktem Verhältnis zur Menge der amplifizierten DNA und der Prozess kann so verfolgt werden.

Während der frühen Zyklen der PCR kommt es lediglich zu einem schwachen Fluoreszenzsignal, das sich nicht von den Hintergrundsignalen unterscheiden lässt. In Abhängigkeit von der initialen Menge an DNA im Reaktionsansatz steigt die Fluoreszenz des PCR-Produkts nach einer bestimmten Zyklenzahl exponentiell an. Der Zyklus, in dem die Fluoreszenz aus dem Hintergrundsignal in eine exponentielle Phase übergeht, wird als Cycle Threshold (C_t) bezeichnet. Der C_t -Wert korreliert direkt mit der ursprünglichen Kopienzahl der Proben. Im weiteren Verlauf geht die exponentielle Phase in eine lineare Phase und letztendlich in eine Plateauphase über [116]. Alle Gene wurden mit dem gleichen Temperaturprogramm gemessen, die Mess-Temperatur wurde entsprechend den Primereigenschaften angepasst (siehe Tabelle 8).

Jede Probe wurde mindestens in Duplikaten gemessen. Die Ansätze zur Denaturierung der DNA wurden im Thermo-Cycler für 10 min auf 95°C erhitzt.

Nun wurde ein Temperaturprogramm gefahren, das sich aus der Oligonukleotid-Primer-Anlagerung (60°C; 10 s), der Elongation (72°C, 20 s, Messung bei ~80°C, 5 s) und der Denaturierungsphase (95°C, 20 s) zusammensetzt. Dieser Zyklus lief weitere 40mal ab. Es folgte die Schmelzkurvenanalyse und eine Kühlphase.

Zur Bestimmung der ursprünglich eingesetzten Kopienzahl wurde die Methode der

absoluten Quantifizierung anhand einer gegebenen Standardkurve durchgeführt, basierend auf einer Verdünnungsreihe ($1 \cdot 10^6$ bis $1 \cdot 10^2$) von Plasmid-DNA (Zählerplasmid). Diese wurde für jedes Gen gesondert erstellt, indem die C_t -Werte gegen den Logarithmus der eingesetzten cDNA-Menge aufgetragen wurden. Mithilfe der Zählerplasmide wurde jeweils eine Standardkurve erstellt, welche die Effizienz der Amplifikation und das Bestimmtheitsmaß R^2 widerspiegelt und zur Berechnung der Kopienzahl diente. Zusätzlich wurden die Amplikons bei SYBR green[®] durch die Analyse der Schmelzkurve identifiziert.

Tabelle 8: Primer-Sequenzen der untersuchten Kandidatengene

Gen	Name	Primersequenz (5´–3´)	Amplifikatgröße (bp)	Mess-temperatur (°C)
TNF	BT_TNFa_r2+f1	CTTCTGCCTGCTGCACTTCG * GAGTTGATGTCTGGCTACAACG *	156	84
CXCL8	BT_IL8_r3+f2	CCTCTTGTTCAATATGACTTCCA GGCCCACTCTCAATAACTCTC	170	81
IL6	BT_IL6_r1+f1	GGAGGAAAAGGACGGATGCT GGTCAGTGTGGCTGGA	227	80
CCL20	BT_CCL20_r1+f3	CAGCAAGTCAGAAGCAAGCAA CCCACCTTCTTTGGATCTGC	179	80
LAP	LAP_sr+sf	AGGCTCCATCACCTGCTCCTT CCTGCAGCATTTTACTTGGGCT	182	83
MX2	BT_MX2_r1+f1	CACCTACCGCAACATTACGC GCTGATGCCAAGTCCATTCC	103	81
CYP1A1	BT_CYP1A1_f1+r1	TCCGTTACCTGCCAACACT CTCGTCCAGCCTCTTGTCTT	170	81
LCN2	BT_LCN2_r1+f1	CCAACTACGAGCTGAAGGAAGAC TGGGAGCTTGGGACAAAAGT	103	79
S100A9	BT_S100A9_r1+f1	CTCAAACAGAAGGCGGGAAA TTGTGTCCAGATCCTCCATGA	225	80

* Ober Zeile: „forward-primer“, untere Zeile: „reverse-primer“

3.2.16 Untersuchung von Wachstum und Adaptation *in vitro*

Im Rahmen dieses Teilprojektes wurden die standardisierten Modelltiere aus dem in dieser Arbeit verwendeten Tiermodell verwendet, um keimfreie, niedrigzellige Milch zu gewinnen. Hierbei galten die in 3.2.1 beschriebenen Auswahlkriterien.

3.2.16.1 Gewinnung von Milch unter antiseptischen Bedingungen

Zur Gewinnung von größeren Mengen (600-800 ml) keimfreier Milch wurde das Euter und die Zitzen zunächst mit einem Eutertuch feucht gereinigt, mit Zellstoff getrocknet und das mit der Hand gewonnene Vorgemelk adspektorisch beurteilt. Einige Strahlen des Viertelanfangsgemelks des jeweiligen Euterviertels wurden in eine Vierviertelgemelksschale gemolken und zur späteren Beurteilung beiseite gestellt. Direkt im Anschluss wurde der reguläre Melkvorgang mittels mechanischem Milchentzug durch die Melkanlage begonnen. Um die Milch unter antiseptischen Bedingungen aus dem Hauptgemelk zu gewinnen, wurden zunächst insgesamt 2,5-3 l auf diesem Weg abgemolken und dann der Melkvorgang durch Abnehmen des Melkzeugs unterbrochen. Anschließend wurde Zitze und v.a. Zitzenkuppe eines Viertels mit 70%igem Ethanol getränktem Zellstoff gründlich desinfiziert und mit der Hand unter Verwendung von Einmalhandschuhen Milch ermolken. Hierbei war besonders darauf zu achten, das sterile Schraubglas, in welches die Milch gemolken wurde horizontal zu halten und die Zitzenkuppe nicht mit den Händen zu berühren, um Kontaminationen zu verhindern. Nach dem gleichen Verfahren wurden nacheinander aus allen vier Vierteln etwa die gleiche Menge Milch (150-200 ml) gewonnen. Diese wurde in ein steriles 1 l-Schraubglas verbracht und das Melkzeug wieder angesetzt, um das Tier vollständig auszumelken. Anschließend wurde die Zellzahl der vier Viertel mittels DeLaval[®] Cell Counter aus dem zu Beginn in die Vierviertelgemelksschale gemolkenen Sekret und aus dem steril gewonnenen Gesamtgemelk bestimmt sowie eine Probe zur Untersuchung der Milchbestandteile und Zellzahl durch den Milchprüfing Bayern e.V. genommen (siehe 3.2.6).

3.2.16.2 Quantifizierung des Wachstums von *S. aureus*₁₀₂₇ und *E. coli*₁₃₀₃ in Milch nach Voranzüchtung in Medium und Milch

Vorkultivierung von *E. coli*₁₃₀₃ und *S. aureus*₁₀₂₇:

Zur Ermittlung des Wachstums von *E. coli*₁₃₀₃ und *S. aureus*₁₀₂₇ in standardisiertem Medium und Milch fand zunächst ein Ausplattieren und Bebrüten der beiden kryokonservierten Testkeime auf Columbia-Schafblut-Agar über 24 h statt. Anschließend wurde eine Vorkultivierung durch Überführung einiger Kolonien des entsprechenden Keimes mittels einer sterilen Öse in 10 ml Hirn-Herz-Bouillon (Brain-Heart-Infusion-Broth, BHI) und Bebrütung bei 37°C über 6 h durchgeführt. Daraufhin wurden 100 µl der inkubierten BHI in einen Kulturkolben mit 150 ml sterilem LB-Medium bzw. antiseptisch gewonnener Milch verbracht, auf dem Vortexer gut durchgemischt und über Nacht auf dem Schwenker im Brutschrank bei 90 Umdrehungen pro Minute über 14 h bei 37°C inkubiert. Um zu bestimmen, welche Keimzahlen *E. coli* und *S. aureus* bis dato erreicht haben, wurden in zwei Verdünnungsreihen die Verdünnungsstufen 10⁻⁶ bis 10⁻⁸ für *E. coli* bzw. 10⁻⁵ bis 10⁻⁷ für *S. aureus* mit Hilfe von sterilen Glasperlen auf Columbia-Schafblut-Agar ausplattiert, 24 h bei 37°C inkubiert und anschließend ausgezählt (siehe 3.2.9). Eine Verdünnungsreihe bis zur gewünschten Verdünnungsstufe erfolgte in 10er Schritten mittels Überführung von jeweils 1 ml in ein Reagenzröhrchen, welches 9 ml sterile, eisgekühlte 0,9%ige NaCl-Lösung enthielt. Um das Wachstum im nachfolgenden Versuch vergleichbar darzustellen wurde im nächsten Schritt eine Überführungsdosis von 1,5*10⁸ CFU festgelegt. Um mit den in der Literatur beschriebenen starken tierindividuellen Unterschieden hinsichtlich des Bakterienwachstums in Vollmilch umgehen zu können wurde durch mehrmaliges Wiederholen dieser Anzüchtung mit Milch desselben standardisierten Versuchstieres die durchschnittliche Bakteriendichte nach 14 h Vorinkubation für *E. coli*₁₃₀₃ und *S. aureus*₁₀₂₇ ermittelt. Aus den Ergebnissen konnte die Überimpfungsdosis von 1,5*10⁸ CFU relativ genau berechnet werden. Im standardisierten LB-Medium war dieser Schritt nicht notwendig, da hier die Wachstumskurven sehr viel reproduzierbarer verliefen.

Vergleichende Anzüchtung von E. coli₁₃₀₃ und S. aureus₁₀₂₇ in Milch nach Vorkultivierung in Medium und Milch:

Aufgrund der Ergebnisse der standardisierten Vorkultivierung wurden zum Erreichen der definierten Überimpfungsdosis von $1,5 \cdot 10^8$ CFU zwischen 50-85 μ l des inkubierten LB-Mediums und 100-160 μ l der inkubierten Vollmilch für *E. coli₁₃₀₃* sowie zwischen 160-175 μ l LB-Medium und 0,8-1 ml Vollmilch für *S. aureus₁₀₂₇* aus den Kulturkolben der Voranzüchtung benötigt. Diese wurden in Kulturkolben mit 150 ml sterilem, auf 30°C vorgewärmtem LB-Medium bzw. antiseptisch gewonnener, ebenfalls auf 30°C vorgewärmter Milch überführt und durch gründliches Schwenken gemischt, um eine Ausgangs-Keimkonzentration von $1 \cdot 10^6$ CFU/ml zu erreichen. Direkt im Anschluss daran wurde zur Überprüfung der initial vorhandenen Keimzahl eine Verdünnungsreihe angefertigt. Die Stufen 10^{-2} bis 10^{-4} wurden mit Hilfe von sterilen Glasperlen in Triplikaten auf Columbia-Schafblut-Agar ausplattiert und nach 24 h Inkubation bei 37°C durch Bildung von Mittelwerten der mittels automatischem Koloniezähler gezählten Kolonien die Keimzahl/ml berechnet. Unmittelbar nach Entnahme des Mediums oder der Milch aus dem Kulturkolben wurde dieser wieder auf den Schwenker im Brutschrank bei 90 Umdrehungen pro Minute gestellt und weiter bei 37°C inkubiert. Im weiteren Verlauf wurde bis zum Zeitpunkt Std. 3 halbstündlich eine Verdünnungsreihe hergestellt, wobei die Kulturkolben jeweils möglichst kurz aus dem Inkubator genommen und unmittelbar nach Entnahme der Proben weiterinkubiert wurden. Bis zum Zeitpunkt Std. 5 erfolgte das Ausplattieren dann stündlich und eine abschließende Bestimmung der Keimkonzentration/ml erfolgte nach Erreichen der Plateauphase nach 9 h Inkubation. Die den Zeitpunkten entsprechenden Verdünnungsstufen wurden ebenfalls in Triplikaten auf Columbia-Schafblut-Agar ausplattiert und nach 24 h Inkubation bei 37°C ausgezählt (siehe 3.2.9).

Um die Vergleichbarkeit der Ansätze mit *E. coli₁₃₀₃* und *S. aureus₁₀₂₇* zu erhalten, war es wichtig, diese parallel und mit derselben antiseptisch gewonnenen Milch eines bestimmten Modelltieres durchzuführen. Deshalb wurden die Proben möglichst zeitgleich aus den Kulturkolben entnommen und die Verdünnungsreihen in mit 9 ml steriler, eisgekühlter 0,9%iger NaCl gefüllten Reagenzröhrchen angefertigt, um einen sofortigen Wachstumsstopp der Bakterien zu bewirken. Das Ausplattieren erfolgte möglichst zügig und zuerst mit der *E. coli₁₃₀₃*-Anzüchtung sowie direkt im Anschluss mit der *S. aureus₁₀₂₇*-Anzüchtung.

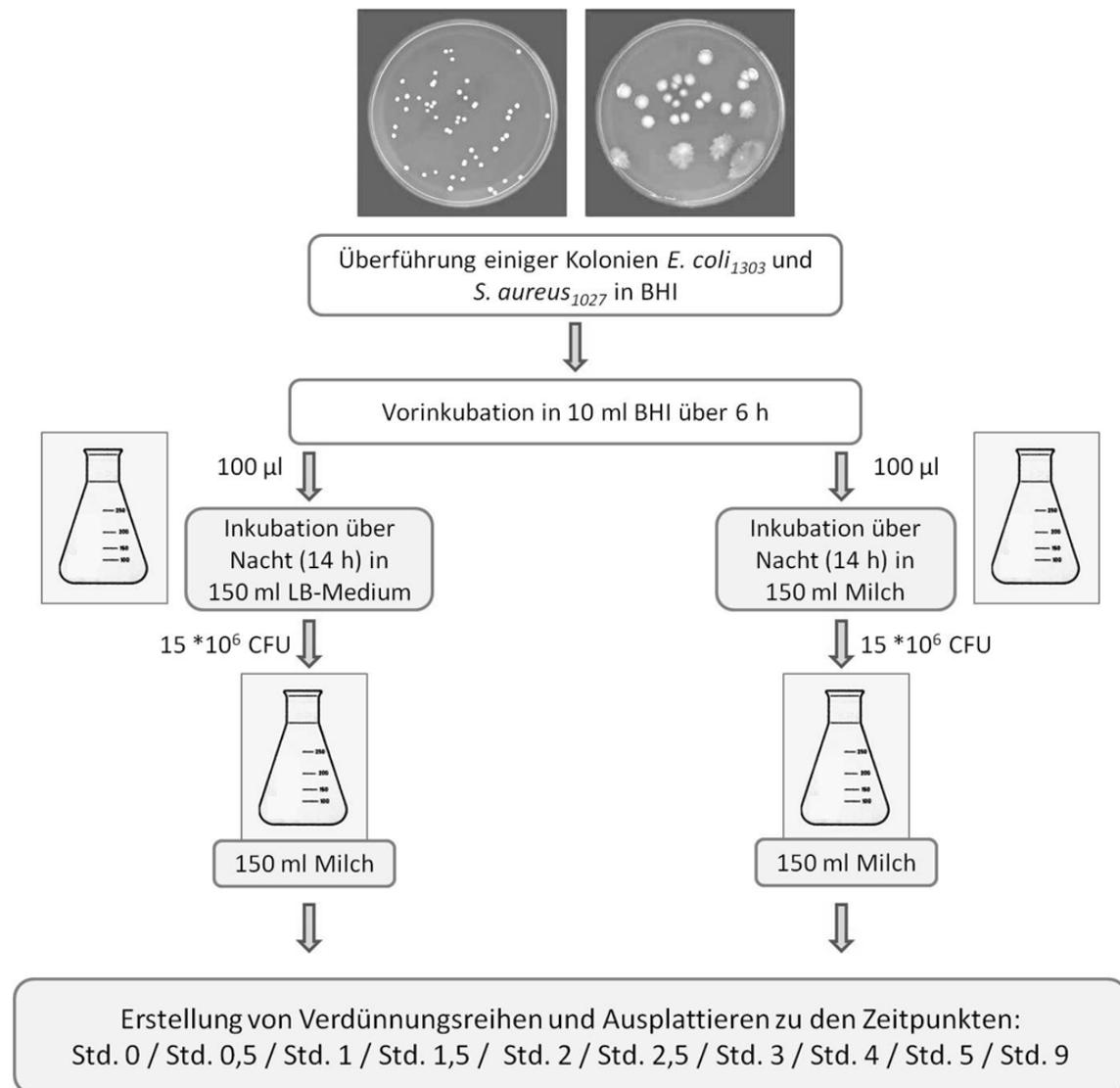


Abbildung 7: Vergleichende Anzüchtung von *E. coli*₁₃₀₃ und *S. aureus*₁₀₂₇ in Milch nach Inkubation in LB-Medium und Milch

Zunächst erfolgte nach Vorinkubation in BHI ein Einstellen der Ausgangskeimkonzentration auf $1 \cdot 10^6$ CFU/ml. Anschließend wurde das Bakterienwachstum durch Ausplattieren zu den angegebenen Zeitpunkten bestimmt. Die beiden zu vergleichenden Ansätze für *E. coli*₁₃₀₃ und *S. aureus*₁₀₂₇ wurden parallel im selben Versuch durchgeführt.

3.2.17 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe der Programme Microsoft Excel™ (Microsoft Inc., USA), Origin (Version 8, OriginLab Inc. USA), SAS (Version 9.2, SAS Inc., USA) und PAST (Version 1.89, Palaeontological Statistics, Norway).

Die Ermittlung von Mittelwerten (MW), Medianen, Standardabweichungen (SD) sowie Minimal- und Maximalwerten erfolgte in Excel. Die Verteilungen der Daten wurden visuell mittels Box-Whisker-Plots und Quantile-Quantile-Plots auf Normalverteilung überprüft. Da die Daten nicht normal verteilt waren, wurden nichtparametrische Tests

eingesetzt. Als statistisches Signifikanzniveau wurde ein Wert von 0,05 festgelegt.

Im Vergleich der beiden Keimgruppen wurden die Unterschiede der gemessenen Parameter zu den einzelnen Zeitpunkten mittels des nichtparametrischen Mann-Whitney-U-Tests analysiert. Dieser Test ist dazu geeignet, zwei unverbundene Stichproben über die Mediane miteinander zu vergleichen [117].

Innerhalb einer Gruppe wurden die Parameter Temperatur, Leukozyten, Zellzahl, Milchinhaltsstoffe, Keimzahl zu den untersuchten Zeitpunkten und Kandidatengenexpression zwischen den untersuchten Zeitpunkten und Lokalisationen mittels nichtparametrischem gepaartem Test (Wilcoxon-Rangsummentest) ausgewertet. Dieser Test überprüft, ob sich der Median einer Stichprobe zu einem untersuchten Zeitpunkt signifikant von einem anderen Zeitpunkt unterscheidet, wobei die Änderungen innerhalb eines Individuums ausgewertet werden. War die Anzahl der Werte kleiner $n = 6$, so wurde eine Monte Carlo-Schätzung oder exakte Signifikanzberechnungen herangezogen. Zum Vergleich der absoluten Keimzahlen in den unterschiedlich lang inokulierten Vierteln wurde der t-Test verwendet.

Die Auswertung von Verläufen und Verlaufsvergleichen zwischen den untersuchten Kandidatengen erfolgte in SAS mittels gemischten Modellen (mixed model, PROC MIXED in SAS) mit festen und zufälligen Effekten. Gemischte Modelle korrigieren für wiederholte Messungen innerhalb eines Tieres. Als zufälliger Effekt ging jeweils das Tier in die Berechnungen ein. Für Untersuchungen innerhalb einer Versuchsgruppe wurde der Faktor Zeit als unabhängige Variable auf seinen Einfluss auf den jeweiligen Parameter analysiert, um den zeitlichen Verlauf abzubilden.

Das Adaptationsverhalten der beiden Pathogene zwischen den einzelnen Zeitpunkten wurde mittels gepaartem Wilcoxon-Test mit exakter Signifikanzberechnung untersucht. Der Verlauf des Adaptationsverhaltens von *E. coli* und *S. aureus* wurde ebenfalls mit gemischten Modellen unter Verwendung der logarithmierten Differenzen ausgewertet.

4 Ergebnisse

Ein Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit war die Etablierung eines streng definierten Kurzzeit-Mastitismodells für das Rind. Es sollte vor allem die sehr frühe Phase einer akuten klinischen (*E. coli*) sowie einer subklinischen/chronischen (*S. aureus*) Mastitis simuliert werden.

4.1 Methodische Vorarbeiten

4.1.1 Methodische Vorarbeiten zur Etablierung eines Kurzzeit-Mastitis-Infektionsmodells

Im Vorfeld wurde anhand eines Pilotversuchs die Genexpression im Euter nach intramammärer Inokulation einer Dosis von $5 \cdot 10^6$ CFU *E. coli*₁₃₀₃ untersucht. Das verwendete Versuchstier entsprach den Auswahlkriterien des standardisierten Tiermodells (siehe 3.2.1), und die Pathogenexposition erfolgte über einen Zeitraum von 4 h. Zum Versuchsende konnte bereits eine Erhöhung des SCC auf über $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml in den beiden inokulierten Vierteln sowie ein Anstieg der rektal gemessenen inneren Körpertemperatur auf 39,9°C festgestellt werden. Für den Hauptversuch im Rahmen des vorliegenden Dissertationsprojektes wurde deshalb die Versuchsdauer auf 3 h verkürzt, denn klinische Veränderungen sollten innerhalb des angestrebten Versuchszeitraumes ausbleiben.

Nach der Tötung des Tieres 4 h *p. inoc.* wurden aus mehreren Lokalisationen des Euters Gewebeproben gewonnen. Anschließend wurde die mRNA aus diesen Proben isoliert und eine Transkriptomanalyse mittels boviner Affymetrix® GeneChips durchgeführt und die entsprechenden 6 Lokalisationen (siehe Tabelle 9) des inokulierten und nicht inokulierten Viertels der rechten Euterseite miteinander verglichen.

Bei der Auswertung wurde deutlich, dass in fast allen untersuchten Lokalisationen nach Inokulation Genexpressionsänderungen auftraten. Es waren jedoch keine Veränderungen im Bereich des Strichkanals feststellbar. Die höchste Anzahl differentiell exprimierter Gene (DEG) war im Bereich der Drüsenzisterne zu verzeichnen (siehe Tabelle 9).

Tabelle 9: Anzahl differentiell exprimierter Gene in ausgesuchten Lokalisationen des Euters 4 h nach intramammärer Inokulation mit $5 \cdot 10^6$ CFU *E. coli*₁₃₀₃

	DEG heraufreguliert (> 4-fach)	DEG herabreguliert (< 3-fach)	Summe DEG
Euter dorsal (EUD)	1	0	1
Euter ventral (EU)	225	7	232
Drüsenzisterne (DZ)	408	304	712
Zitzenzisterne (ZZ)	289	61	350
Fürstenberg'sche Rosette (F)	93	102	195
Strichkanal (S)	0	0	0

Dargestellt ist die Anzahl differentiell exprimierter Gene in verschiedenen Lokalisationen der bovinen Milchdrüse 4 h nach intramammärer Inokulation mit $5 \cdot 10^6$ CFU *E. coli*₁₃₀₃. Hochregulierte Gene erfuhren eine Expressionsänderung um mehr als das 4-fache, herabregulierte Gene wurden in ihrer Expression um mindestens das 3-fache reduziert.

Exemplarisch konnte für IL6, TNF, CCL20 und CXCL8 eine lokalisationsabhängige Heraufregulation gezeigt werden. Hierbei war auffallend, dass TNF am stärksten im Bereich des ventralen Euterparenchyms (EU) hochreguliert wurde, während z.B. CCL20 in den distalen Kompartimenten Zitzenzisterne (ZZ) und Drüsenzisterne (DZ) stärker als proximal reguliert wurde (siehe Tabelle 10). Diese Daten belegen, dass der Ansatz, frühe Wirt-Pathogen-Interaktionen kompartimentabhängig und in den ersten 4 h nach Keiminokulation zu untersuchen, berechtigt war und dieses Modell somit leicht modifiziert für weitere Versuchsreihen geeignet ist.

Tabelle 10: Expressionssteigerung (fold induction) ausgesuchter Gene in Zitze und Euter 4 h nach intramammärer Inokulation mit $5 \cdot 10^6$ CFU *E. coli*₁₃₀₃

	Lokalisation		
	ZZ	DZ	EU
IL6	271	25	276
TNF	10	8	31
CCL20	261	140	36
CXCL8	157	19	154

Dargestellt ist die Expressionssteigerung (Vielfaches der Expression gegenüber den Kontrollvierteln; fold induction) in den drei Lokalisationen: Zitzenzisterne (ZZ), Drüsenzisterne (DZ) und ventrales Euterparenchym (EU).

4.2 Vergleichende Untersuchungen zu frühen Wirt-Pathogen-Interaktionen im Rahmen des Kurzzeit-Mastitis-Infektionsmodells *in vivo*

4.2.1 Charakterisierung der Modelltiere

Die unter 3.2.1 genannten Voraussetzungen des Tiermodells wurden von allen 12 Versuchstieren erfüllt.

Sowohl im Herkunftsbetrieb als auch in der Klinik für Wiederkäuer der LMU München konnten bei der kompletten Allgemeinuntersuchung keine pathologischen Abweichungen festgestellt werden. Die innere Körpertemperatur und die Anzahl im Blut zirkulierender Leukozyten befanden sich zu allen untersuchten Zeitpunkten im Referenzbereich (siehe Tabelle 11).

Vor dem Versuch wurde die tägliche Milchleistung jeweils morgens und abends zu den Melkzeiten dokumentiert. Die durchschnittliche tägliche Milchleistung errechnete sich durch Bildung von Mittelwerten aus den Leistungen der dem Versuch vorrausgehenden 7 Tage. Sie lag bei sämtlichen verwendeten Erstkalbinnen innerhalb der vorgegebenen Grenzen von 15-30 l.

Auch die durch den Milchprüfing Bayern e.V. bestimmten Milchinhaltsstoffe befanden sich innerhalb der physiologischen Grenzen (siehe Tabelle 11).

Die beiden Versuchsgruppen *Ec 3h* und *Sa 3h*, denen die Tiere zufällig zugeordnet wurden, zeigten keine statistisch signifikanten Unterschiede in den genannten Parametern (siehe Tabelle 11).

Tabelle 11: Ausgangslage der Modelltiere vor Versuchsbeginn

	<i>Ec 3h</i> (n = 6)		<i>Sa 3h</i> (n = 6)		Referenzbereich
	MW	± SD	MW	±SD	
Allg. Parameter					
Temperatur (°C)	38,4	± 0,3	38,5	± 0,3	37,5-39,2 [115]
Leukozyten (G/l)	7,0	± 1,6	7,6	± 1,0	4-10 [118]
Tägl. Milchleistung (l)	26,4	± 3,3	28,4	± 4,1	15-30 *
Milchparameter					
Fett (%)	3,8	± 1,0	3,2	± 1,1	Ø 3,8 [114]
Eiweiß (%)	3,4	± 0,4	3,3	± 0,2	2,9-3,4 [114]
Laktat (%)	4,9	± 0,2	5,0	± 0,1	4,7-5,0 [114]
Harnstoff (mg/ml)	216,0	± 38,4	277,0	± 70,4	200-400 [119]
pH	6,6	± 0,1	6,6	± 0,1	6,6-6,7 [114]
Zellzahl/µl	20,0	± 18,0	34,0	± 19,3	0-50 *

Dargestellt sind die Mittelwerte (MW) ± Standardabweichung (SD) der Ausgangsparameter zum Zeitpunkt Std. -3 innerhalb der beiden Versuchsgruppen sowie zugehörige Referenzwerte. Die mit * gekennzeichneten Referenzbereiche stellen Kriterien im Rahmen des Tiermodells dar. Zum Zeitpunkt Std. 0 wurden die Tiere mit $5 \cdot 10^6$ CFU *E. coli* (***Ec 3h***) oder *S. aureus* (***Sa 3h***) inokuliert. Alle gemessenen Werte befanden sich innerhalb der physiologischen Referenzbereiche.

4.2.2 Systemische und lokale klinische Veränderungen nach intramammärer Inokulation von *E. coli*₁₃₀₃ und *S. aureus*₁₀₂₇

Insgesamt konnten im Verlauf des dreistündigen *in vivo*-Versuchs keinerlei systemische oder lokale klinische Veränderungen bei den Modelltieren festgestellt werden.

4.2.2.1 Allgemeiner klinischer Score und Euterscore

Zur Beurteilung des Schweregrades der klinischen Ausprägung einer experimentellen Euterentzündung in Abhängigkeit vom eingesetzten Pathogen fand unmittelbar vor Versuchsbeginn (Std. 0) sowie zum Ende des Versuchs (Std. 3) eine Bewertung des Allgemeinbefindens und des Euters mit Hilfe der klinischen Scoresysteme für Allgemeingesundheit und Eutergesundheit statt (siehe 3.2.7 und 3.2.8).

Keines der untersuchten Tiere zeigte zu den beiden Beobachtungszeitpunkten pathologische Abweichungen und alle Ergebnisse befanden sich innerhalb des vorgegebenen physiologischen Bereichs. Alle verwendeten Modelltiere der Gruppen ***Ec 3h***

und *Sa 3h* wiesen sowohl zur Std. 0 als auch zur Std. 3 einen Gesamtscore von 0 Punkten auf und wurden so als klinisch gesund eingestuft (Einzelergebnisse nicht dargestellt).

4.2.2.2 Innere Körpertemperatur

Bei allen Tieren des Modellversuchs wurde die rektal gemessene innere Körpertemperatur während des Versuchs stündlich erfasst.

Es konnte in beiden Gruppen im Verlauf des Versuchs keine statistisch signifikante Erhöhung der inneren Körpertemperatur festgestellt werden. Wie in Abbildung 8 zu sehen, war die Dynamik der Temperatur bei den 12 Färsen sehr gleichförmig. Die Modelltiere überschritten zu keinem der untersuchten Zeitpunkte die Fiebergrenze von 39,2°C.

In der Gruppe *Ec 3h* sank die Temperatur zwischen Std. 1 und 2 innerhalb des physiologischen Normbereichs leicht ab, was zu einem signifikanten Unterschied im Vergleich der beiden Zeitpunkte führte ($p < 0,05$, siehe Abbildung 8). Des Weiteren konnte jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Zeitpunkten innerhalb der Versuchsgruppen, zwischen den beiden Versuchsgruppen und im Temperaturverlauf zwischen den Gruppen festgestellt werden.

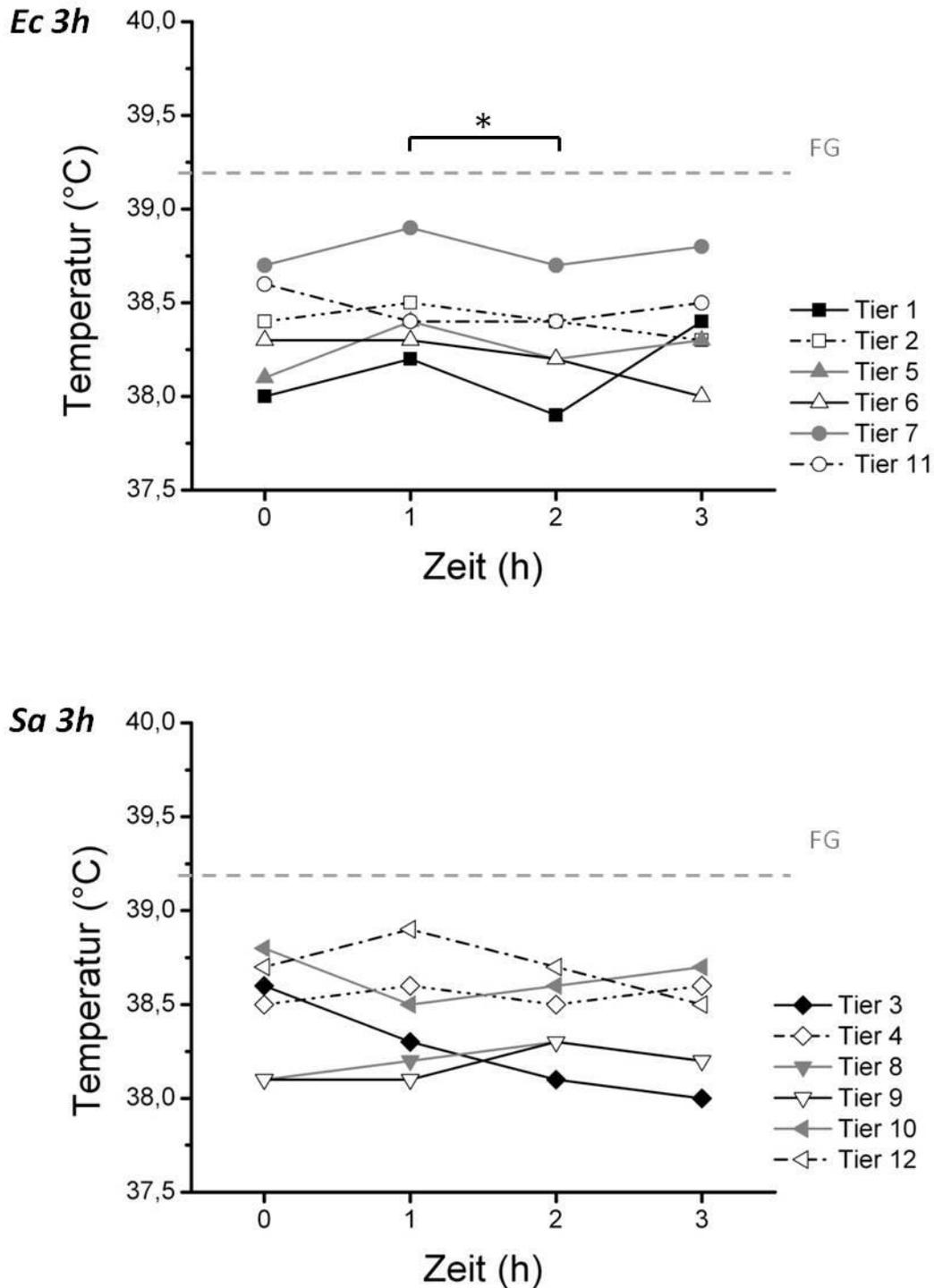


Abbildung 8: Dynamik der inneren Körpertemperatur innerhalb der ersten 3 h nach intramammärer Inokulation mit *E. coli*₁₃₀₃ oder *S. aureus*₁₀₂₇

Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der rektal gemessenen Körpertemperatur der einzelnen Versuchstiere. *Ec 3h* entspricht der mit $5 \cdot 10^6$ CFU *E. coli*₁₃₀₃ und *Sa 3h* der mit $5 \cdot 10^6$ CFU *S. aureus*₁₀₂₇ inokulierten Versuchsgruppe. Die gemessenen Werte beider Gruppen überstiegen die durch die horizontale gestrichelte Linie gekennzeichnete Fiebergrenze (FG) zu keinem der Beobachtungszeitpunkte.

* signifikanter Unterschied zwischen zwei Zeitpunkten ($p < 0,05$).

4.2.2.3 Blutbild

Zur Beantwortung der Frage, ob durch experimentelle Inokulation mit *E. coli*₁₃₀₃ oder *S. aureus*₁₀₂₇ innerhalb des Versuchszeitraums bereits systemische Effekte auftreten, wurde bei allen Modelltieren der Gehalt an zirkulierenden Leukozyten im venösen Blut vor Versuchsbeginn (Std. 0) und zum Versuchsende (Std. 3) bestimmt.

Die Ausgangswerte der Tiere befanden sich zum Versuchsbeginn, aber auch zum Versuchsende im physiologischen Referenzbereich von 4-10 G/l (siehe Tabelle 12). Innerhalb der Gruppen *Ec 3h* und *Sa 3h* konnte zwischen den beiden untersuchten Zeitpunkten keine signifikante Veränderung der Leukozytenzahl festgestellt werden (siehe Tabelle 12).

Zwischen den beiden Versuchsgruppen lag ebenfalls, sowohl zum Zeitpunkt Std. 0 als auch zum Zeitpunkt Std. 3, kein statistisch signifikanter Unterschied vor (siehe Tabelle 12).

Tabelle 12: Leukozytenzahl im Blut zu Versuchsbeginn und Versuchsende

	Std. 0		Std. 3	
	MW (G/l) ± SD	Min./Max.	MW (G/l) ± SD	Min./Max.
<i>Ec 3h</i> (n = 6)	7,2 ± 1,59	5,7 / 9,3	7,7 ± 1,54	5,6 / 9,5
<i>Sa 3h</i> (n = 6)	7,7 ± 1,00	6,7 / 9,3	7,9 ± 6,31	7,0 / 8,7

Die Darstellung zeigt die Leukozytenzahl im Blut unmittelbar vor (Std. 0) und 3 h nach (Std. 3) der ersten intramammären Inokulation der Modellkeime. *Ec 3h* entspricht der mit je $5 \cdot 10^6$ CFU *E. coli*₁₃₀₃ und *Sa 3h* der mit je $5 \cdot 10^6$ CFU *S. aureus*₁₀₂₇ intramammär inokulierten Versuchsgruppe. Angegeben sind jeweils Mittelwerte (MW) ± Standardabweichung (SD) und die jeweiligen Minimal- und Maximalwerte (Min./Max.).

4.2.2.4 Grobsinnliche Eigenschaften der Milch

Die grobsinnlichen Eigenschaften der Milch wurden zu allen Zeitpunkten, an denen eine Milchprobenentnahme stattfand (Std. -3, Std. 0, Std. 1, Std. 1,5, Std. 2, Std. 2,5, Std. 3), untersucht. Zur Std. -3 wurde das Viertelanfangsgemelk zur Beurteilung verwendet, zu späteren Zeitpunkten entsprach das entnommene Sekret aus versuchstechnischen Gründen einem Residualgemelk, da das Versuchstier zur Std. -3 regulär gemolken wurde und zur Std. 0 nochmals unter Gabe von 20 IE Oxytozin leergemolken wurde (siehe 3.2.6 und 3.2.9). Zu allen untersuchten Zeitpunkten konnte jedoch keine

grosbsinnliche Veränderung des Milchsekrets festgestellt werden. Die Milch war stets als makroskopisch unauffällig zu bewerten.

4.2.3 Somatische Zellzahl in der Milch (SCC)

Der SCC wurde vor und während des Versuchs auf Viertelebene bestimmt und dokumentiert (siehe 3.2.6 und 3.2.10). Zur Std. -3, Std. 0 und Std. 3 erfolgte die Bestimmung durch Fossomatic[®] und DeLaval[®] Cell Counter (DCC) aus dem mittels Vierviertelmelkmaschine gewonnenen Gemelk. Während des Versuchs (Std. 1, Std. 1,5, Std. 2, Std. 2,5) wurde der SCC in einem Volumen von 2 ml nur mittels DCC bestimmt, da aus den zu Versuchsbeginn leergemolkenen Eutervierteln nur sehr geringe Mengen an Milch (Endgemelk) gewonnen werden konnten.

Vor Beginn des Versuchs (Std. -3) lag die Ausgangszellzahl der Viertelgemelke, den Auswahlkriterien des Tiermodells entsprechend, bei allen Probanden unter $5 \cdot 10^4$ Zellen/ml Milch und betrug im Mittel $2,5 \cdot 10^4 \pm 1,9 \cdot 10^4$ Zellen/ml (MW \pm SD).

Die in der Folge gewonnenen Milchproben wurden hinsichtlich Veränderungen nur zum gleichen Untersuchungszeitpunkt zwischen Eutervierteln innerhalb einer Versuchsgruppe und zwischen den beiden Versuchsgruppen **Ec 3h** und **Sa 3h** verglichen. Auf einen Vergleich zwischen den einzelnen Zeitpunkten der Sekretgewinnung wurde verzichtet, da der Zellgehalt der Milch per se in den Zeiträumen zwischen den regulären Melkzeiten starken Veränderungen unterliegt.

Die experimentelle Inokulation mit *E. coli* und *S. aureus* hatte keinen Einfluss auf den Verlauf des Zellzahlgehalts. Zwischen den beiden Gruppen **Ec 3h** und **Sa 3h** konnte zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied detektiert werden. Alle inokulierten Viertel aber auch das Kontrollviertel zeigten zum selben Untersuchungszeitpunkt vergleichbare SCC-Werte (siehe Tabelle 13 und Tabelle 14).

Tabelle 13: Somatische Zellzahl in der Milch (SCC) vor und nach intramammärer Inokulation von $5 \cdot 10^6$ CFU *E. coli*₁₃₀₃

Euterviertel		Versuchszeitpunkt (Std.)						
		-3	0*	1	1,5	2	2,5	3*
Tier 1	VR	3,9	5,0	5,2	n.u.	5,0	n.u.	5,2
	HR	3,8	4,9	5,2	n.u.	5,1	n.u.	5,0
	VL	3,6	5,5	5,5	n.u.	5,5	5,5	5,4
	HL	3,7	5,1	5,2	5,1	5,1	5,0	5,3
Tier 2	VR	4,3	5,2	6,9	n.u.	6,9	n.u.	6,5
	HR	4,9	5,6	6,8	n.u.	6,8	n.u.	6,7
	VL	4,1	5,1	6,8	n.u.	6,9	6,7	6,7
	HL	4,8	5,4	6,9	6,9	6,9	6,8	6,7
Tier 5	VR	3,7	4,3	4,8	n.u.	4,9	n.u.	5,0
	HR	4,0	4,5	4,9	n.u.	4,7	n.u.	5,0
	VL	3,9	4,5	4,9	n.u.	4,8	4,8	5,0
	HL	3,9	4,8	5,2	5,2	5,1	5,1	5,5
Tier 6	VR	4,5	5,5	5,7	n.u.	5,7	n.u.	6,1
	HR	4,7	5,6	5,8	n.u.	5,9	n.u.	6,2
	VL	4,5	5,3	5,7	n.u.	5,6	5,5	5,9
	HL	4,7	5,3	5,4	5,3	5,2	5,2	5,9
Tier 7	VR	4,0	4,7	5,0	n.u.	5,0	n.u.	5,8
	HR	4,3	4,7	5,1	n.u.	5,1	n.u.	5,8
	VL	3,9	4,6	5,0	n.u.	5,1	5,1	5,0
	HL	4,3	4,9	5,3	5,3	5,3	5,4	5,1
Tier 11	VR	4,1	4,7	5,2	n.u.	5,1	n.u.	5,0
	HR	4,3	4,9	5,1	n.u.	5,0	n.u.	5,1
	VL	4,0	4,9	5,2	n.u.	5,1	5,1	5,2
	HL	4,3	4,9	5,1	5,0	5,1	4,9	5,1

Dargestellt sind log₁₀-transformierte Werte des SCC/ml Milch innerhalb der Versuchsgruppe *Ec 3h*. Zum Zeitpunkt Std. -3 wurden die Werte im Gesamtgemelk zur regulären Melkzeit gemessen. Bei Std. 0 erfolgte die intramammäre Inokulation von $5 \cdot 10^6$ CFU *E. coli*₁₃₀₃ in 2 ml NaCl. Zu den mit * gekennzeichneten Zeitpunkten wurde das verbliebene Gemelk jeweils unter Gabe von 20 IE Oxytozin mittels Vierviertelmelkmaschine gewonnen. Zu den übrigen Zeitpunkten erfolgte die Messung des SCC jeweils aus den ersten 2 ml per Hand ermolkener Milch eines jeden Viertels. Die grau hinterlegten Felder spiegeln die jeweilige Inokulationsdauer wieder. Euterviertel: VR = vorne rechts, HR = hinten rechts, VL = vorne links, HL = hinten links.

n.u. = nicht untersucht

Tabelle 14: Somatische Zellzahl in der Milch (SCC) vor und nach intramammärer Inokulation von $5 \cdot 10^6$ CFU *S. aureus*₁₀₂₇

Euterviertel		Versuchszeitpunkt (Std.)						
		-3	0*	1	1,5	2	2,5	3*
Tier 3	VR	4,4	5,1	5,9	n.u.	5,9	n.u.	5,7
	HR	4,7	5,3	5,9	n.u.	5,9	n.u.	5,9
	VL	4,6	5,0	5,9	n.u.	5,8	5,9	5,7
	HL	4,7	5,1	6,0	5,9	5,9	5,9	5,8
Tier 4	VR	4,3	4,9	5,4	n.u.	5,33	n.u.	5,36
	HR	4,7	4,3	6,0	n.u.	6,0	n.u.	5,7
	VL	4,2	4,9	5,3	n.u.	5,3	5,2	5,4
	HL	4,0	4,8	5,6	5,6	5,6	5,6	5,6
Tier 8	VR	4,5	4,9	5,3	n.u.	5,19	n.u.	5,39
	HR	4,5	5,0	5,5	n.u.	5,4	n.u.	5,4
	VL	4,2	4,8	5,5	n.u.	5,4	5,4	5,5
	HL	4,6	5,1	5,7	5,7	5,8	5,7	5,7
Tier 9	VR	4,2	4,8	5,1	n.u.	5,0	n.u.	4,91
	HR	4,4	4,9	5,2	n.u.	5,0	n.u.	5,0
	VL	4,2	4,8	5,2	n.u.	5,0	5,0	4,8
	HL	4,2	4,9	5,2	5,2	5,2	5,0	4,9
Tier 10	VR	3,9	4,6	4,9	n.u.	4,9	n.u.	4,73
	HR	3,9	4,5	4,9	n.u.	4,9	n.u.	4,8
	VL	3,9	4,6	5,1	n.u.	5,1	5,0	5,0
	HL	3,9	4,6	5,0	5,0	5,0	5,0	4,9
Tier 12	VR	4,7	6,3	6,8	n.u.	6,9	n.u.	6,9
	HR	4,8	6,5	6,9	n.u.	6,9	n.u.	6,8
	VL	4,7	6,4	6,7	n.u.	6,9	6,9	6,9
	HL	4,8	6,3	6,8	6,9	6,9	6,7	6,8

Dargestellt sind log₁₀-transformierte Werte des SCC/ml Milch innerhalb der Versuchsgruppe *Sa 3h*. Zum Zeitpunkt Std. -3 wurden die Werte im Gesamtgemelk zur regulären Melkzeit gemessen. Bei Std. 0 erfolgte die intramammäre Inokulation von $5 \cdot 10^6$ CFU *E. coli*₁₃₀₃ in 2 ml NaCl. Zu den mit * gekennzeichneten Zeitpunkten wurde das verbliebene Gemelk jeweils unter Gabe von 20 IE Oxytozin mittels Vierviertelmelkmaschine gewonnen. Zu den übrigen Zeitpunkten erfolgte die Messung des SCC jeweils aus den ersten 2 ml per Hand ermolkenener Milch eines jeden Viertels. Die grau hinterlegten Felder spiegeln die jeweilige Inokulationsdauer wieder. Euterviertel: VR = vorne rechts, HR = hinten rechts, VL = vorne links, HL = hinten links.

n.u. = nicht untersucht

4.2.4 Weitere Milchhaltsstoffe

Zur quantitativen Bestimmung der Milchhaltsstoffe Fett (%), Eiweiß (%), Laktose (%) und Harnstoff (mg/ml) sowie des pH-Werts der Milch wurden am Versuchstag zum Morgenmelken (Std. -3), zu Versuchsbeginn (Std. 0) und Versuchsende (Std. 3) Milchproben entnommen (siehe 3.2.6). Wie unter 4.2.3 vermerkt, ist auch hier zu beachten, dass es sich nur zur Std. -3 um Gesamtgemelk, zur Std. 0 und Std. 3 dagegen um Endgemelk nach Gabe von Oxytozin handelte. Somit waren die Proben verschiedener Zeitpunkte bezüglich der Zusammensetzung der Milch nicht miteinander vergleichbar. Die Daten wurden aus diesem Grund nur zum gleichen Untersuchungszeitpunkt zwischen den beiden Versuchsgruppen *Ec 3h* und *Sa 3h* verglichen. Hierbei konnte zu keinem der untersuchten Zeitpunkte ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen *Ec 3h* und *Sa 3h* festgestellt werden. Eine Ausnahme bildete der Parameter Fett, welcher in der Gruppe *Ec 3h* gemessen zum Zeitpunkt Std. 0 signifikant erhöht war ($p < 0,05$; siehe Tabelle 15).

Tabelle 15: Milchinhaltsstoffe vor und nach intramammärer Inokulation von $5 \cdot 10^6$ CFU *E. coli*₁₃₀₃ oder *S. aureus*₁₀₂₇

	Std. -3	Std. 0	Std. 3
<i>Ec 3h</i>	n = 6	n = 4	n = 5
	MW ± SD	MW ± SD	MW ± SD
Fett (%)	3,8 ± 1,1	8,7 ± 1,5	5,0 ± 1,0
Protein (%)	3,4 ± 0,4	3,1 ± 0,5	3,7 ± 0,5
Laktose (%)	4,9 ± 0,2	4,7 ± 0,1	4,3 ± 0,5
Harnstoff (mg/ml)	216 ± 38	252 ± 64	219 ± 43
pH	6,6 ± 0,1	6,5 ± 0,1	6,5 ± 0,1
<i>Sa 3h</i>	n = 6	n = 6	n = 6
	MW ± SD	MW ± SD	MW ± SD
Fett (%)	3,0 ± 0,9	7,2 ± 1,3	4,4 ± 0,6
Protein (%)	3,3 ± 0,2	3,1 ± 0,2	3,4 ± 0,3
Laktose (%)	5,0 ± 0,1	4,7 ± 0,2	4,6 ± 0,2
Harnstoff (mg/ml)	270 ± 75	306 ± 70	287 ± 71
pH	6,6 ± 0,04	6,5 ± 0,1	6,6 ± 0,1

Dargestellt sind Mittelwerte (MW) ± Standardabweichung (SD) aus den Daten aller Viertel der beiden Versuchsgruppen *Ec 3h* und *Sa 3h* zu den Untersuchungszeitpunkten des Morgenmelkens (Std. -3), zum Versuchsbeginn (Std. 0) und -ende (Std. 3). Die fett gedruckten Werte zeigen statistisch signifikante Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen auf.

Der Vergleich zwischen den einzelnen Eutervierteln innerhalb einer Versuchsgruppe wurde nur zum Zeitpunkt Std. 3 durchgeführt, um den Einfluß der unterschiedlich langen Inokulation mit *E. coli* oder *S. aureus* in den jeweiligen Eutervierteln zu untersuchen.

Dabei konnten für die Gruppe *Ec 3h* keine statistisch signifikanten Unterschiede der untersuchten Milchinhaltsstoffe zwischen den 1 h, 2 h oder 3 h exponierten Eutervierteln sowie den nicht exponierten Kontrollvierteln festgestellt werden.

Bei der Versuchsgruppe *Sa 3h* dagegen konnten signifikant höhere durchschnittliche Milchfett- und Harnstoffgehalte im Viertel HR (1 h nach Inokulation) sowie signifikant erhöhte durchschnittliche Milcheiweißgehalte der Viertel HL (3 h nach Inokulation) und HR (1 h nach Inokulation), verglichen mit den Kontrollvierteln aufgezeigt werden ($p < 0,05$; siehe Tabelle 16).

Tabelle 16: Milchinhaltsstoffe nach unterschiedlich langer intramammärer Inokulation von $5 \cdot 10^6$ CFU *E. coli*₁₃₀₃ oder *S. aureus*₁₀₂₇

Inhaltsstoff	Viertel	Infektionsdauer (h)	<i>Ec 3h</i> (n = 5)		<i>Sa 3h</i> (n = 6)	
			Median	IQR	Median	IQR
Fett (%)	VR	Kontrolle	4,64	4,33 - 5,06	4,25	3,91 - 4,76
	HR	1	5,07	4,00 - 5,25	4,50	4,26 - 4,75
	VL	2	4,53	4,22 - 5,06	4,40	3,75 - 4,63
	HL	3	5,19	4,28 - 6,10	4,51	4,27 - 4,84
Protein (%)	VR	Kontrolle	3,69	3,65 - 3,78	3,48	3,17 - 3,74
	HR	1	3,79	3,75 - 3,80	3,49	3,27 - 3,77
	VL	2	3,58	3,47 - 3,77	3,53	3,30 - 3,68
	HL	3	3,69	3,06 - 3,74	3,70	3,18 - 3,78
Laktose (%)	VR	Kontrolle	4,65	4,25 - 4,68	4,63	4,29 - 4,77
	HR	1	4,61	4,18 - 4,62	4,59	4,28 - 4,71
	VL	2	4,58	4,38 - 4,70	4,62	4,34 - 4,83
	HL	3	4,49	4,32 - 4,63	4,60	4,17 - 4,77
Harnstoff (mg/ml)	VR	Kontrolle	198	195 - 232	251	239 - 338
	HR	1	229	189 - 230	241	213 - 299
	VL	2	212	199 - 231	262	213 - 299
	HL	3	202	196 - 263	244	238 - 357
pH	VR	Kontrolle	6,6	6,52 - 6,65	6,6	6,54 - 6,67
	HR	1	6,6	6,47 - 6,64	6,6	6,55 - 6,66
	VL	2	6,6	6,53 - 6,62	6,6	6,54 - 6,69
	HL	3	6,6	6,37 - ,63	6,6	6,53 - 6,70

Gezeigt sind die Mediane und Interquartilsabstände (IQR) der Milchinhaltsstoffe innerhalb der beiden Versuchsgruppen *Ec 3h* und *Sa 3h* zum Versuchsende (Std. 3). Die Proben wurden nach Ausmelken mit Oxytozin aus den Zylindern der Vierviertelmelkmaschine gewonnen. VR repräsentiert dabei die Kontrollviertel, HR, VL und HL die unterschiedlich lange inokulierten Viertel. Die fett gedruckten Werte zeigen statistisch signifikante Unterschiede zu den Kontrollvierteln auf ($p < 0,05$).

4.2.5 Bakteriologische Untersuchung der Milch

Vor experimenteller Inokulation von *E. coli* und *S. aureus* war die Milch aller Versuchstiere in sämtlichen durchgeführten bakteriologischen Untersuchungen frei von bakteriellem Wachstum. Nach Inokulation hingegen waren *E. coli* und *S. aureus* zu allen untersuchten Zeitpunkten und in großer Zahl im Eutersekret inokulierter Viertel nachweisbar. Es wurden zu keinem Zeitpunkt andere bakterielle Spezies nachgewiesen.

Die während des Versuchs in den 3- und 2-stündig inokulierten Vierteln (HL und VL) ermittelten Keimzahlen in der Milch sind für die Versuchsgruppen **Ec 3h** und **Sa 3h** in Abbildung 9 dargestellt. Die ermittelten Werte fielen recht heterogen aus, jedoch zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Keimzahlen innerhalb der Gruppe **Ec 3h**. *E. coli*₁₃₀₃ zeigte bereits 2 h nach Inokulation eine signifikante Zunahme ($p=0,046$). Dies konnte jedoch nur in den Vierteln HL beobachtet werden, wo *E. coli* über 3 h anwesend war. Ein scheinbarer Abfall der Anzahl CFU/ml zum Ende des Versuchs beruhte darauf, dass die Milchproben zu diesem Zeitpunkt unter Gabe von Oxytozin gewonnen wurden und es zu einem Verdünnungseffekt kam.

In der Gruppe **Sa 3h** dagegen fand nur ein geringer, nicht signifikanter oder kein Anstieg der Anzahl CFU/ml statt. Der oxytozinbedingte Verdünnungseffekt zum Versuchsende (Zeitpunkt Std. 3) konnte in der Tendenz ebenfalls bei mit *S. aureus* inokulierten Tieren beobachtet werden.

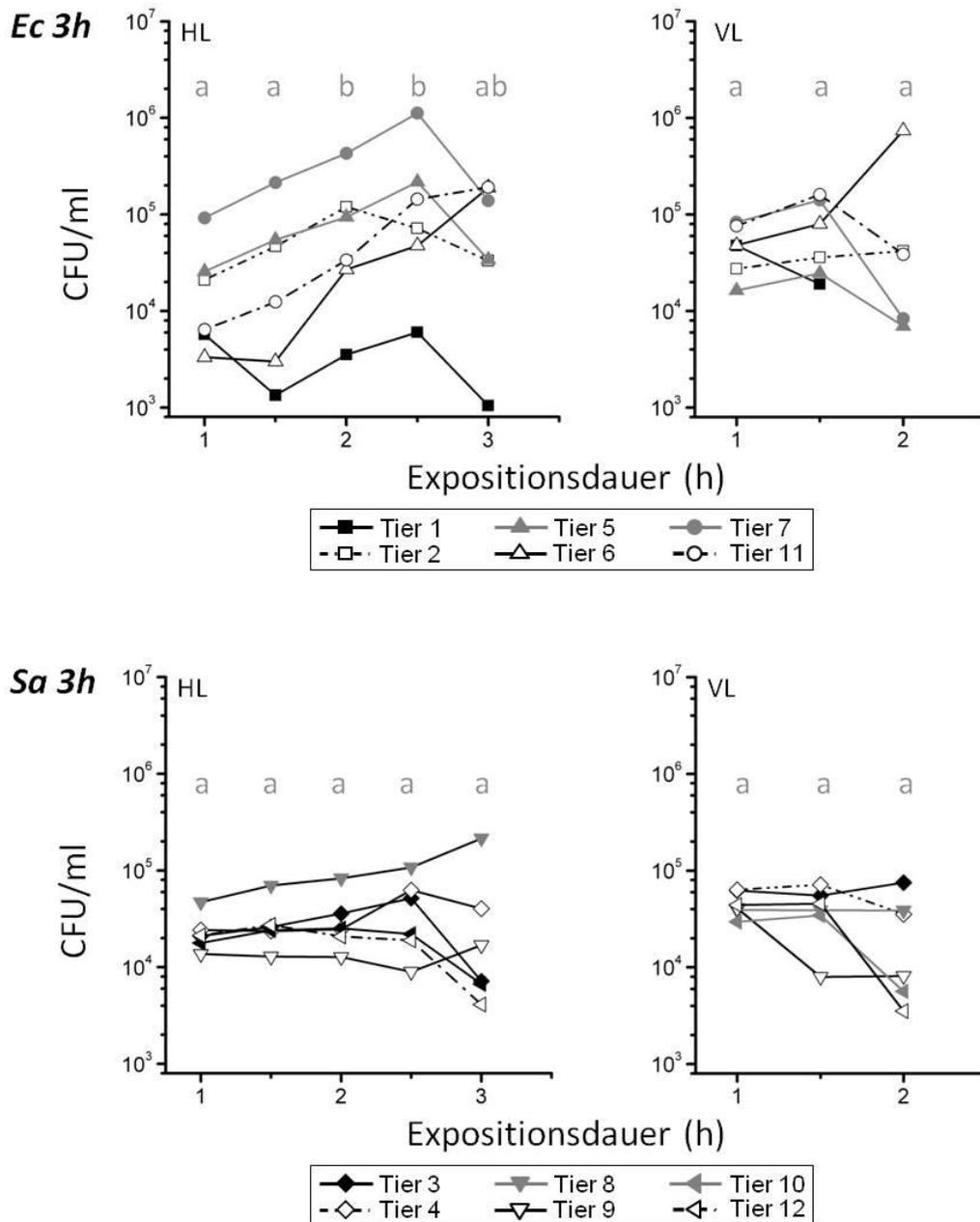


Abbildung 9: Milchkeimzahl nach intramammärer Inokulation von $5 \cdot 10^6$ CFU *E. coli*₁₃₀₃ oder *S. aureus*₁₀₂₇

Dargestellt ist die Anzahl CFU in während des Versuchs gewonnener Milch der Euterviertel HL (hinten links) und VL (vorne links). Das Viertel HL unterlag 3-stündiger, das Viertel VL 2-stündiger Erregerexposition. Bei der Probenentnahme zum Zeitpunkt Std. 3 wurde die Milch nach Oxytozingabe gewonnen. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den untersuchten Zeitpunkten innerhalb einer Gruppe sind durch verschiedene Buchstaben gekennzeichnet ($p < 0,05$).

Zum Ende des Versuchs wurde nach dem Ausmelken die Anzahl an CFU/ml aus jedem der unterschiedlich lang inokulierten Euterviertel ermittelt. Anschließend wurde die absolute Anzahl im Gemelk vorhandener Bakterien mit der Menge ermolkener Milch der entsprechenden Viertel zum Zeitpunkt Std. 3 errechnet (siehe Abbildung 10). Auch hier konnte innerhalb der Gruppe *Ec 3h* eine deutliche Vermehrung von *E. coli*₁₃₀₃ in Abhängigkeit von der Inokulationsdauer bei allen drei untersuchten Tieren (n = 3) festgestellt werden. Es fand eine Vermehrung der Inokulationsdosis von $5 \cdot 10^6$ CFU durchschnittlich um etwa das 30-fache im 3 h inokulierten Viertel HL und um rund das 3-fache im 2 h inokulierten Viertel VL statt.

Dagegen zeigte sich innerhalb der Gruppe *Sa 3h* (n = 4) nur eine geringe durchschnittliche Vermehrung der inokulierten Keime, welche statistisch nicht zu sichern war. Zwischen den unterschiedlich lang inokulierten Vierteln ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied. Nach Hochrechnung der CFU/ml zum Versuchsende mit der aus dem jeweiligen Viertel gewonnenen Milchmenge konnte für *S. aureus*₁₀₂₇ nach 3-stündiger Inokulation nur eine Vermehrung um durchschnittlich das 1,8-fache gemessen werden (siehe Abbildung 10).

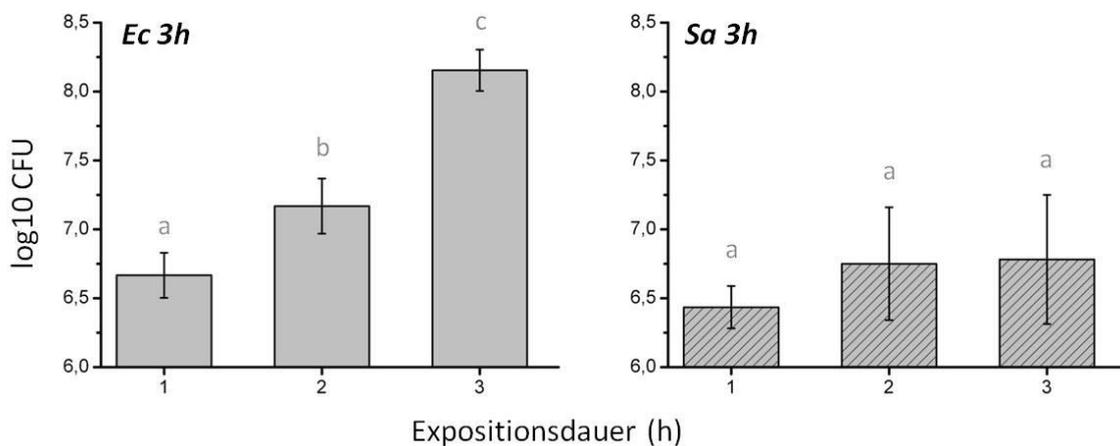


Abbildung 10: Absolute Milchkeimzahl 1 h, 2 h und 3 h nach intramammärer Inokulation von $5 \cdot 10^6$ CFU *E. coli*₁₃₀₃ (n = 3) oder *S. aureus*₁₀₂₇ (n = 4)

Dargestellt ist die logarithmierte Anzahl reisolierter Bakterien in CFU nach dem Ausmelken zum Versuchsende. 1-stündige Expositionsdauer entspricht den Eutervierteln hinten rechts (HR), 2-stündige den Vierteln vorne links (VL) und 3-stündige den Vierteln hinten links (HL). Statistisch signifikante Unterschiede in der Versuchsgruppe *Ec 3h* sind durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet ($p < 0,05$).

4.2.6 Pathologisch-anatomische Veränderungen

Nach der Tötung der Tiere zum Zeitpunkt Std. 3 wurde das Euter im Rahmen der Gewebeprobenentnahme auf pathologische Veränderungen hin untersucht. In der Gruppe **Sa 3h** konnten bei keinem der Tiere abweichende Befunde festgestellt werden. Lediglich bei Tier 2 und Tier 5 der Gruppe **Ec 3h** konnte eine sehr geringgradige vermehrte Exsudation und subkutane Ödematisierung in distalen Kompartimenten (Drüsenzisterne, ventrales Euterparenchym) der über 3 h mit *E. coli*₁₃₀₃ exponierten Viertel beobachtet werden.

Des Weiteren wurde der Geschlechtsapparat der Versuchstiere untersucht und der Zyklusstand beurteilt. Bei allen Modelltieren der beiden Gruppen konnten deutliche Anzeichen für eine bestehende Brunst detektiert werden. Auf den Ovarien konnte stets mindestens ein sprungreifer Tertiärfollikel gefunden werden und die Schleimhaut des Uterus war stark ödematisiert. Der Gelbkörper befand sich jeweils in Rückbildung.

4.2.7 mRNA-Expression entzündungsrelevanter Kandidatengene im Eutergewebe nach Exposition mit *E. coli*₁₃₀₃ und *S. aureus*₁₀₂₇

Insgesamt gesehen unterlag der Großteil der im Rahmen dieser Studie untersuchten Kandidatengene im Eutergewebe einer deutlichen Regulation innerhalb der ersten 3 h nach Inokulation der Pathogene *E. coli* und *S. aureus*. Hierzu zählten Vertreter der Zytokine (IL6, TNF), Chemokine (CXCL8, CCL20) und antimikrobiellen Peptide (S100A9, LAP). Dagegen konnten für die Gene LCN2, MX2 und CYP1A1 nur sehr geringe Änderungen ihrer mRNA-Expression verzeichnet werden.

Zusammenfassend kann hervorgehoben werden, dass die Gruppe *Ec 3h* eine insgesamt homogenere, stärkere und teilweise frühere Hochregulation der untersuchten Gene zeigte, als die Gruppe *Sa 3h*. Weiterhin glichen sich die Kompartimente Zitzenzisterne (ZZ) und Drüsenzisterne (DZ) bei der Gruppe *Ec 3h* in Verlauf und Höhe der Expression regulierter Gene, außer bei den Genen LAP, LCN2 und MX2 (siehe Abbildung 11 bis Abbildung 19). In der Versuchsgruppe *Sa 3h* dagegen gab es diese lokale Übereinstimmung nur bei IL6 und CYP1A1 (siehe Abbildung 12 und Abbildung 19).

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der überwiegende Anteil der untersuchten Gene nur in den distalen Kompartimenten ZZ und DZ reguliert wurde. Im ventralen Euterparenchym (EU) konnte innerhalb der Versuchsgruppe *Ec 3h* nur für die Gene IL6, TNF, CXCL8 und S100A9 eine schwache Regulation aufgezeigt werden. In der Gruppe *Sa 3h* dagegen fand im ventralen Euter lediglich eine statistisch signifikante Herabregulation von CYP1A1 statt ($p < 0,05$).

Als Basisexpression wurde die mRNA-Expression des jeweiligen Gens in den unbehandelten Kontrollvierteln zum Ende des Versuchs definiert. Tabelle 17 zeigt zusammenfassend die mRNA-Expressionssteigerungen und -minderungen der untersuchten Kandidatengene verglichen mit der Basisexpression in den nicht inokulierten Kontrollvierteln.

Im Folgenden werden die Ergebnisse der einzelnen untersuchten Gene ausführlich dargestellt und verglichen. Hierbei erfolgte der Vergleich zwischen Eutervierteln mit unterschiedlich langer Erregerexposition, zwischen den Lokalisationen ZZ, DZ und EU sowie zwischen den beiden Versuchsgruppen *Ec 3h* und *Sa 3h*.

Tabelle 17: Regulation ausgewählter Kandidatengene nach intramammärer Inokulation mit *E. coli*₁₃₀₃ oder *S. aureus*₁₀₂₇

Gen	Lokalisation	<i>Ec 3h</i> (n = 6)		<i>Sa 3h</i> (n = 6)	
		Vielfaches der Basisexpression		Vielfaches der Basisexpression	
		MW	± SEM	MW	± SEM
IL6	ZZ	148	± 72	1,4	± 0,2
	DZ	293	± 182	16	± 14
	EU	1,8	± 0,8	1,9	± 0,7
TNF	ZZ	47	± 17	1,7	± 0,2
	DZ	41	± 12	6,9	± 3,5
	EU	5,1	± 2,0	1,6	± 0,5
CXCL8	ZZ	190	± 78	2,5	± 0,7
	DZ	175	± 79	10	± 7,5
	EU	3,6	± 1,2	1,7	± 0,6
CCL20	ZZ	628	± 186	12	± 4,4
	DZ	475	± 283	59	± 48
	EU	6,7	± 4,6	4,2	± 2,2
S100A9	ZZ	67	± 8,5	2,0	± 0,8
	DZ	49	± 22	8,5	± 6,1
	EU	1,1	± 0,2	1,0	± 0,2
LAP	ZZ	9,5	± 3,2	4,0	± 2,7
	DZ	12	± 4,7	4,5	± 1,9
	EU	1,1	± 0,2	2,2	± 1,0
LCN2	ZZ	1,5	± 0,4	0,8	± 0,1
	DZ	1,5	± 0,7	4,1	± 2,4
	EU	0,9	± 0,1	1,3	± 0,2
MX2	ZZ	3,8	± 0,4	1,6	± 0,6
	DZ	4,3	± 1,7	3,2	± 1,4
	EU	1,6	± 0,4	1,2	± 0,2
CYP1A1	ZZ	0,9	± 0,3	1,0	± 0,2
	DZ	0,7	± 0,1	0,8	± 0,0
	EU	1,3	± 0,2	0,6	± 0,2

Dargestellt sind Gruppen-Mittelwerte (MW) ± SEM (Standardfehler) der Änderung der mRNA-Kopienzahl/75ng mRNA (fold induction) aus den Lokalisationen Zitenzisterne (ZZ), Drüsenzisterne (DZ) und ventrales Euterparenchym (EU) 3 h nach intramammärer Inokulation von $5 \cdot 10^6$ CFU *E. coli*₁₃₀₃ (**Ec 3h**) oder *S. aureus*₁₀₂₇ (**Sa 3h**) in den Eutervierteln HL. Die mRNA-Expressionsänderung bezieht sich auf die durchschnittliche Basisexpression der unbehandelten Kontrollviertel (VR) einer Gruppe.

4.2.7.1 Regulation der mRNA-Expression ausgewählter Zytokine

In der Gruppe *Ec 3h* kam es in der ZZ und DZ bei IL6 und TNF zu einer bedeutend stärkeren Reaktion, als in der Gruppe *Sa 3h* (vergleiche Abbildung 11 und Abbildung 12). Dennoch zeigten die beiden Zytokine auch in der Gruppe *Sa 3h* eine frühe und deutliche Heraufregulation ihrer mRNA-Expression.

IL6:

Während in der Gruppe *Ec 3h* eine Hochregulation von IL6 um durchschnittlich das 140-fache (ZZ) und 300-fache (DZ) der Basisexpression in den Kontrollvierteln stattfand, erhöhte sich die Kopienzahl von IL6 in der Gruppe *Sa 3h* nur um den Faktor 3 (ZZ) und den Faktor 10 (DZ) (siehe Tabelle 17). Für die Versuchsgruppe *Ec 3h* war nach 2 h und 3 h Erregeranwesenheit in der ZZ und nach 1 h, 2 h und 3 h in der DZ eine signifikant höhere mRNA-Expression von IL6 gegenüber der Versuchsgruppe *Sa 3h* festzustellen ($p < 0,05$). Die Kontrollviertel vorne rechts, die der Ermittlung von Basisexpressionswerten dienten, zeigten zwischen den beiden Gruppen jedoch keinen statistisch signifikanten Unterschied hinsichtlich der Expression von IL6.

Wie in Abbildung 11 dargestellt, konnte in der Gruppe *Ec 3h* bereits nach 1-stündiger Erregerinokulation eine signifikante Hochregulation in der Lokalisation ZZ festgestellt werden ($p = 0,028$). Der stärkste Anstieg erfolgte bei allen 6 Tieren im Bereich von ZZ und DZ jedoch zwischen 1 und 2 h Erregerexposition. Bei 3 Tieren wurde IL6 nach 3-stündigem Erregerkontakt wieder herabreguliert.

In der Versuchsgruppe *Sa 3h* wurde IL6 in der ZZ bei 2 Tieren schon 1 h nach der Inokulation deutlich hochreguliert. Ein statistisch signifikanter Unterschied zu den Kontrollvierteln ergab sich in dieser Lokalisation allerdings erst nach 2-stündiger Exposition mit *S. aureus*. In der DZ war dagegen bereits nach 1-stündiger Erregerpräsenz eine signifikante mRNA-Expressionssteigerung zu verzeichnen (siehe Abbildung 12).

Im ventralen Euterparenchym zeigte sich eine signifikante Herabregulation von IL6 in der Gruppe *Ec 3h* zwischen 1 und 2 h nach Inokulation. Ansonsten war in diesem Kompartiment keine Regulation von IL6 zu verzeichnen. Die beiden Versuchsgruppen *Ec 3h* und *Sa 3h* unterschieden sich hier bezüglich der Expression des Zytokins nicht voneinander.

Die drei Lokalisationen ZZ, DZ und EU zeigten innerhalb der beiden Versuchsgruppen

eine einheitliche Basisexpression für IL6. Dies wurde anhand der Kontrollviertel (VR) verglichen.

Nach Inokulation unterschied sich die kompartimentabhängige mRNA-Expression zwischen ZZ und EU sowie DZ und EU in beiden Gruppen fast zu allen untersuchten Zeitpunkten statistisch signifikant (siehe Anhang, Tabelle 19 und Tabelle 20).

TNF:

Für TNF konnte in der Gruppe ***Ec 3h*** in ZZ und DZ eine gesteigerte mRNA-Expression um maximal rund das 30-fache verzeichnet werden. In der Gruppe ***Sa 3h*** erhöhte sie sich nur um das 4- bis 5-fache (siehe Tabelle 17). Im Vergleich der beiden Erreger konnte eine signifikant höhere durchschnittliche Kopienzahl 1 h und 3 h nach Inokulation von *E. coli*₁₃₀₃ in den beiden distalen Kompartimenten (ZZ, DZ) festgestellt werden ($p < 0,05$). Die Basisexpressionen in ZZ, DZ und EU der Kontrollviertel dagegen wiesen keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Versuchsgruppen ***Ec 3h*** und ***Sa 3h*** auf.

Bereits nach einstündiger Inokulation konnte in der Gruppe ***Ec 3h*** der stärkste Anstieg der mRNA-Expression von TNF in der ZZ und DZ dokumentiert werden (siehe Abbildung 11). Ein Abfall nach 2-stündiger Erregerexposition war nur in der DZ statistisch zu sichern ($p < 0,05$).

Auch in der Versuchsgruppe ***Sa 3h*** konnten statistisch signifikante Unterschiede zur TNF-Expression der Kontrollviertel in der ZZ bereits nach 1-stündiger Erregerpräsenz festgestellt werden ($p = 0,028$; siehe Abbildung 12). In der Lokalisation DZ war die Hochregulation erst nach 3-stündiger Erregerexposition statistisch erkennbar.

Die Expressionsänderungen im EU waren in der Gruppe ***Ec 3h*** schwach ausgeprägt und nur zwischen 1- und 3-stündiger Erregerexposition statistisch signifikant ($p < 0,05$; siehe Abbildung 11). Zwischen den beiden Versuchsgruppen ***Ec 3h*** und ***Sa 3h*** gab es im ventralen Euterparenchym keinen signifikanten Unterschied.

Die Basisexpressionen von TNF unterschieden sich in den Kontrollvierteln der Versuchsgruppe ***Ec 3h*** nicht signifikant zwischen ZZ und DZ sowie zwischen DZ und EU. Dagegen konnte in der ZZ eine statistisch signifikant höhere Basisexpression als im EU detektiert werden ($p = 0,028$). Innerhalb der Versuchsgruppe ***Sa 3h*** wurde TNF in der Lokalisation ZZ der Kontrollviertel signifikant höher konstitutiv exprimiert als in

DZ und EU ($p=0,028$; siehe Anhang, Tabelle 19 und Tabelle 20).

Nach Erregerinokulation unterschied sich die kompartimentabhängige Expression von TNF zwischen ZZ und EU sowie DZ und EU in beiden Gruppen fast zu allen untersuchten Zeitpunkten signifikant ($p<0,05$; siehe Anhang, Tabelle 19 und Tabelle 20).

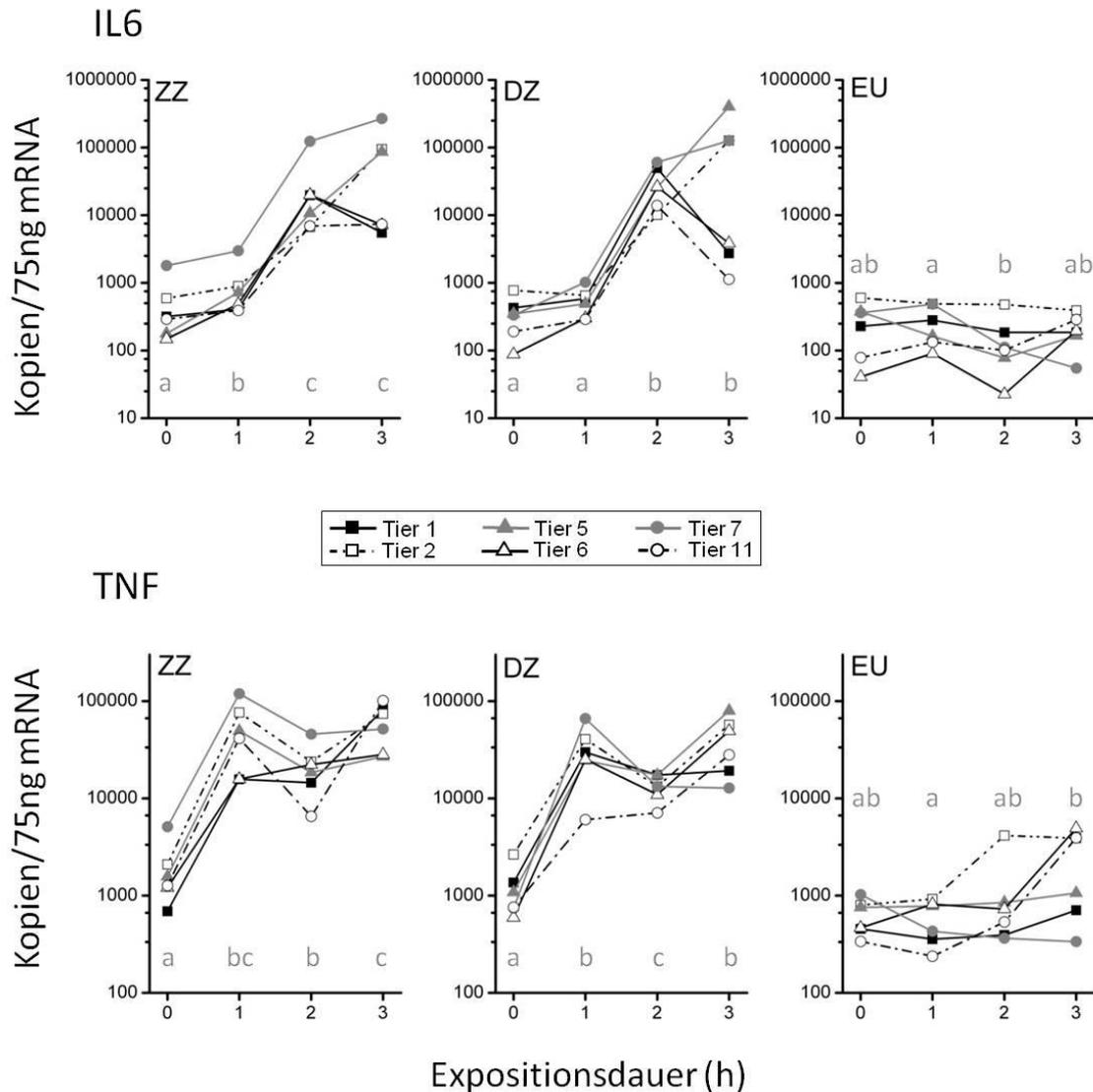


Abbildung 11: mRNA-Expression von IL6 und TNF nach intramammärer Inokulation mit *E. coli*₁₃₀₃

Dargestellt sind die gemessenen Kopien/75 ng mRNA in vier Eutervierteln 1 h (HR), 2 h (VL) und 3 h (HL) nach Inokulation von $5 \cdot 10^6$ CFU *E. coli*₁₃₀₃. Ein Euterviertel blieb unbehandelt (0 h; VR). Lokalisationen: Zitzenzisterne (ZZ), Drüsenzisterne (DZ), ventrales Euterparenchym (EU). Statistisch signifikante Unterschiede ($p=0,028$) innerhalb einer Lokalisation zwischen den Zeitpunkten relativ zur Inokulation sind mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet. Werte knapp unter der statistischen Signifikanzgrenze ($p=0,047$) wurden für TNF in der DZ zwischen den Zeitpunkten 1 h/2 h und 2 h/3 h sowie in EU zwischen den Zeitpunkten 1 h/3 h gemessen.

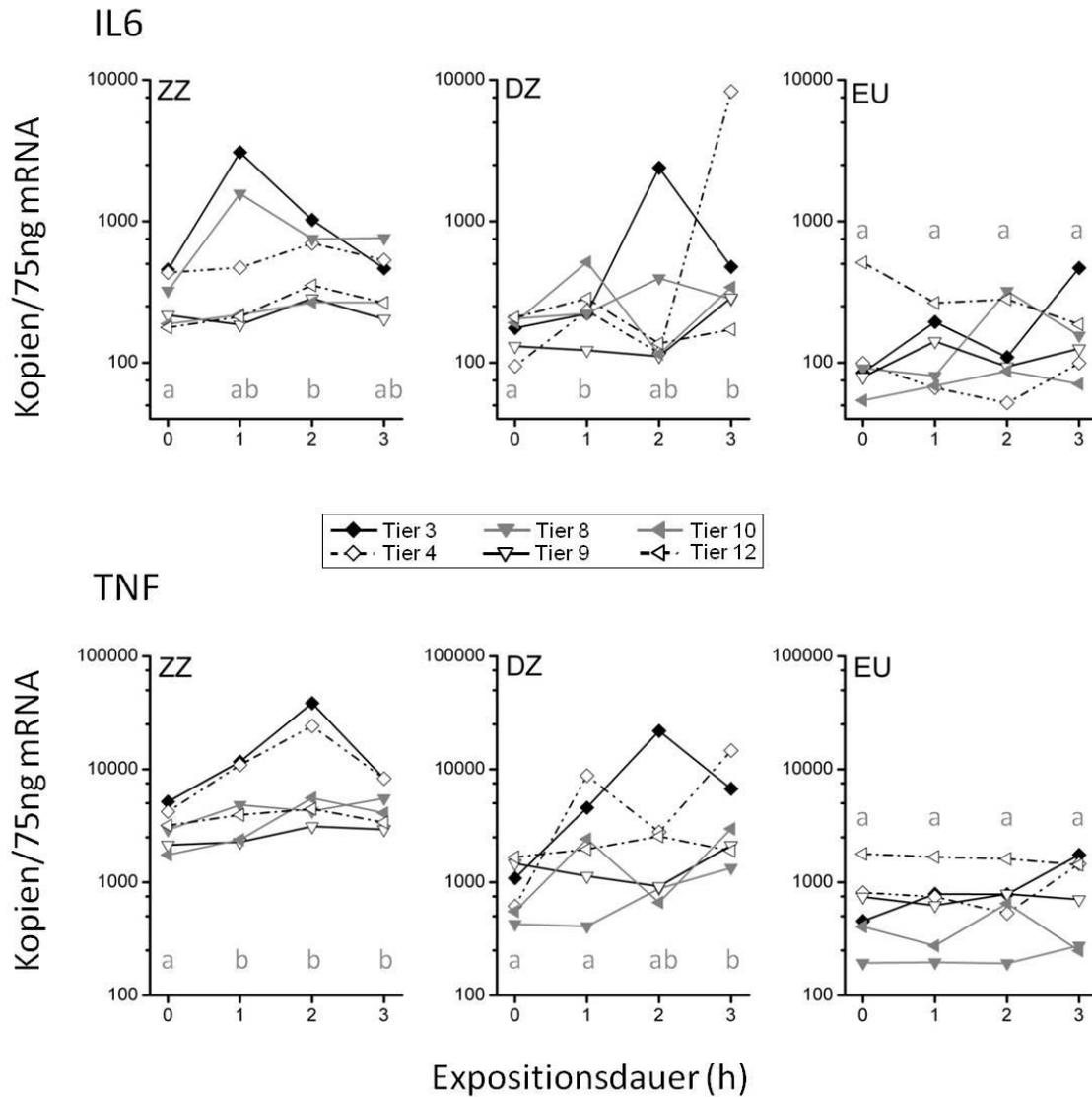


Abbildung 12: mRNA-Expression von IL6 und TNF nach intramammärer Inokulation mit *S. aureus*₁₀₂₇

Dargestellt sind die gemessenen Kopien/75 ng mRNA in vier Eutervierteln 1 h (HR), 2 h (VL) und 3 h (HL) nach Inokulation von $5 \cdot 10^6$ CFU *S. aureus*₁₀₂₇. Ein Euterviertel blieb unbehandelt (0 h; VR). Lokalisationen: Zitenzisterne (ZZ), Drüsenzisterne (DZ), ventrales Euterparenchym (EU). Statistisch signifikante Unterschiede ($p=0,028$) innerhalb einer Lokalisation zwischen den Zeitpunkten relativ zur Inokulation sind mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet. Werte knapp unter der statistischen Signifikanzgrenze ($p=0,046$) wurden für IL6 in der DZ zwischen den Zeitpunkten 0 h/1 h und 0 h/3 h sowie für TNF in der DZ zwischen den Zeitpunkten 1 h/3 h gemessen.

4.2.7.2 Regulation der mRNA-Expression ausgewählter Chemokine

CXCL8 und CCL20 reagierten schnell und deutlich mit einer mRNA-Expressionserhöhung auf die intramammäre Inokulation von *E. coli*₁₃₀₃ und *S. aureus*₁₀₂₇. Im Vergleich zur Gruppe **Sa 3h** antwortete das Gewebe von ZZ und DZ auf die experimentelle Infektion mit *E. coli*₁₃₀₃ um ein Vielfaches stärker.

CXCL8 (Interleukin-8):

Die mRNA-Expression des Chemokins CXCL8 wurde in der ZZ und DZ bereits 1 h nach Inokulation bei allen Tieren der Gruppe **Ec 3h** signifikant und stark hochreguliert ($p=0,028$; siehe Abbildung 13). Nach 3-stündiger Erregerexposition konnte eine maximale Steigerung der Expression um den Faktor 140 (ZZ) sowie um den Faktor 160 (DZ) gemessen werden. Dagegen fand bei den mit *S. aureus* inokulierten Tieren für CXCL8 nur eine 5-fache (ZZ) bzw. 7-fache (DZ) Erhöhung der Expression statt (siehe Tabelle 17). Die Unterschiede in den beiden Lokalisationen zwischen Gruppe **Ec 3h** und **Sa 3h** waren hochsignifikant ($p=0,005$). Außerdem konnten für **Ec 3h** in der DZ signifikant höhere Basisexpressionen in den nicht inokulierten Vierteln, als in der Gruppe **Sa 3h** gemessen werden ($p=0,02$). Im Vergleich zu einer Gruppe unbehandelter „Goldstandardtiere“ (GS) [120], die denselben Modellkriterien entsprachen, war die Basisexpression bei **Ec 3h** und **Sa 3h** in der Lokalisation EU signifikant erhöht ($p<0,05$; siehe Tabelle 18).

Innerhalb der Gruppe **Sa 3h** konnte für CXCL8 ebenfalls schon 1 h nach Inokulation von *S. aureus*₁₀₂₇ eine schwach signifikante Expressionssteigerung in der ZZ gemessen werden ($p<0,05$). In der DZ war diese erst nach 3-stündiger Exposition statistisch signifikant ($p<0,05$). Eine signifikante Herabregulation war nach 3 h Erregerpräsenz in der ZZ zu verzeichnen. Alle Tiere der Gruppe **Sa 3h** reagierten in diesem Zeitraum mit einer Erniedrigung der Kopienzahl, wobei Tier 3 diesen Abfall in der ZZ und DZ besonders deutlich zeigte ($p<0,05$; siehe Abbildung 14).

Das ventrale Euterparenchym in den beiden Versuchsgruppen zeigte in den ersten 3 h der Erregerexposition kaum eine Regulation von CXCL8. Eine signifikante mRNA-Expressionssteigerung konnte nur zwischen 2- und 3-stündiger Erregeranwesenheit für die Gruppe **Ec 3h** gemessen werden ($p<0,05$; siehe Abbildung 13). Die Tiere 2, 6 und 11 zeigten in diesem Zeitraum einen deutlichen Anstieg der mRNA-Expression. Innerhalb der Gruppe **Sa 3h** dagegen fand in dieser Lokalisation keine statistisch

signifikante Expressionsänderung statt. Allein Tier 3 reagierte in diesem Kompartiment nach 3 h Erregerpräsenz mit einem Anstieg der Kopienzahl. Zwischen den beiden Versuchsgruppen konnte im Eutergewebe für die Expression von CXCL8 kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden.

In der Gruppe *Ec 3h* konnte in ZZ und DZ zu den einzelnen Zeitpunkten invariant eine signifikant höhere mRNA-Expressionssteigerung als im EU gemessen werden ($p=0,028$). Die Basisexpression in den nicht inokulierten Kontrollvierteln zeigte eine Übereinstimmung zwischen ZZ und DZ, unterschied sich aber signifikant zwischen DZ und EU, wobei sie im EU signifikant niedrigere Werte aufwies ($p=0,046$; siehe Anhang, Tabelle 19). Bei *Sa 3h* hingegen unterschied sich die Basisexpression in den nicht inokulierten Vierteln zwischen ZZ und DZ, wobei die Expression in der ZZ signifikant höher lag ($p=0,028$; siehe Anhang, Tabelle 19 und Tabelle 20).

Tabelle 18: Basisexpression von CXCL8 und CCL20 im ventralen Euterparenchym (EU) unbehandelter Euterviertel der Versuchsgruppen *Ec 3h* und *Sa 3h* im Vergleich zu unbehandelten „Goldstandardtieren“ (GS)

	GS (n = 24)	<i>Ec 3h</i> (n = 6)	<i>Sa 3h</i> (n = 6)
	MW \pm SD	MW \pm SD	MW \pm SD
CXCL8	50,6 ^a \pm 43,6	330,8 ^b \pm 199,1	234,8 ^b \pm 212,8
CCL20	72,0 ^a \pm 30,5	348,9 ^b \pm 262,2	44,6 ^a \pm 36,2

Gezeigt sind mRNA-Expressionswerte unbehandelter „Goldstandardtiere“ (GS) [120] sowie Basisexpressionswerte unbehandelter Kontrollviertel innerhalb der Versuchsgruppen *Ec 3h* und *Sa 3h* in der Lokalisation EU. Statistisch signifikante Unterschiede im Vergleich der Gruppen ($p<0,05$) sind für das jeweilige Gen durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet.

CCL20:

Von allen analysierten Kandidatengen unterlag CCL20 der stärksten Regulation in beiden Versuchsgruppen. Es wurde nach Exposition mit *E. coli*₁₃₀₃ 300-fach (ZZ) bzw. 200-fach (DZ) hochreguliert. Dagegen konnte in Gruppe *Sa 3h* nur eine etwa 20-fache (ZZ) bzw. 80-fache (DZ) Expressionssteigerung detektiert werden (siehe Tabelle 17). In allen untersuchten Lokalisationen wies die Gruppe *Ec 3h* zu sämtlichen Zeitpunkten *p. inoc.*, außer nach 3-stündiger Erregerexposition statistisch signifikant höhere Werte ($p<0,05$) auf als die Gruppe *Sa 3h*. Die Basisexpressionen in den nicht inokulierten Vierteln waren innerhalb der Gruppe *Ec 3h* im Vergleich zur Gruppe *Sa 3h*

in DZ und EU signifikant erhöht ($p < 0,05$). Wie in Tabelle 18 gezeigt, konnte innerhalb der Versuchsgruppe **Ec 3h** in der Lokalisation EU eine signifikant erhöhte Basisexpression im Vergleich mit den „Goldstandardtieren“ [120] beobachtet werden ($p < 0,05$).

Die stärkste Regulation innerhalb Gruppe **Ec 3h** erfolgte invariant bereits 1 h nach Inokulation in der ZZ und DZ (siehe Abbildung 13).

Auch nach Inokulation von *S. aureus*₁₀₂₇ wurde CCL20 schon nach 1-stündiger Erregerexposition in ZZ und DZ statistisch signifikant hochreguliert ($p = 0,028$; siehe Abbildung 14).

Im ventralen Euterparenchym konnten innerhalb der ersten 3 h nach experimenteller Infektion für beide Versuchsgruppen keine signifikanten Veränderungen in der CCL20-Expression nachgewiesen werden (siehe Abbildung 13 und Abbildung 14).

In der Gruppe **Ec 3h** konnte in der ZZ und DZ *p. inoc.* durchwegs eine signifikant höhere mRNA-Expression als im EU gemessen werden ($p = 0,028$). Innerhalb der Versuchsgruppe **Sa 3h** konnte dies für die ZZ und DZ ebenfalls bestätigt werden. Die Basisexpression in den Kontrollvierteln zeigte bei ZZ, DZ und EU in der Gruppe **Ec 3h** vergleichbar hohe Werte während sie sich in der Gruppe **Sa 3h** zwischen den Lokalisationen signifikant unterschied ($p < 0,05$; siehe Anhang, Tabelle 19 und Tabelle 20).

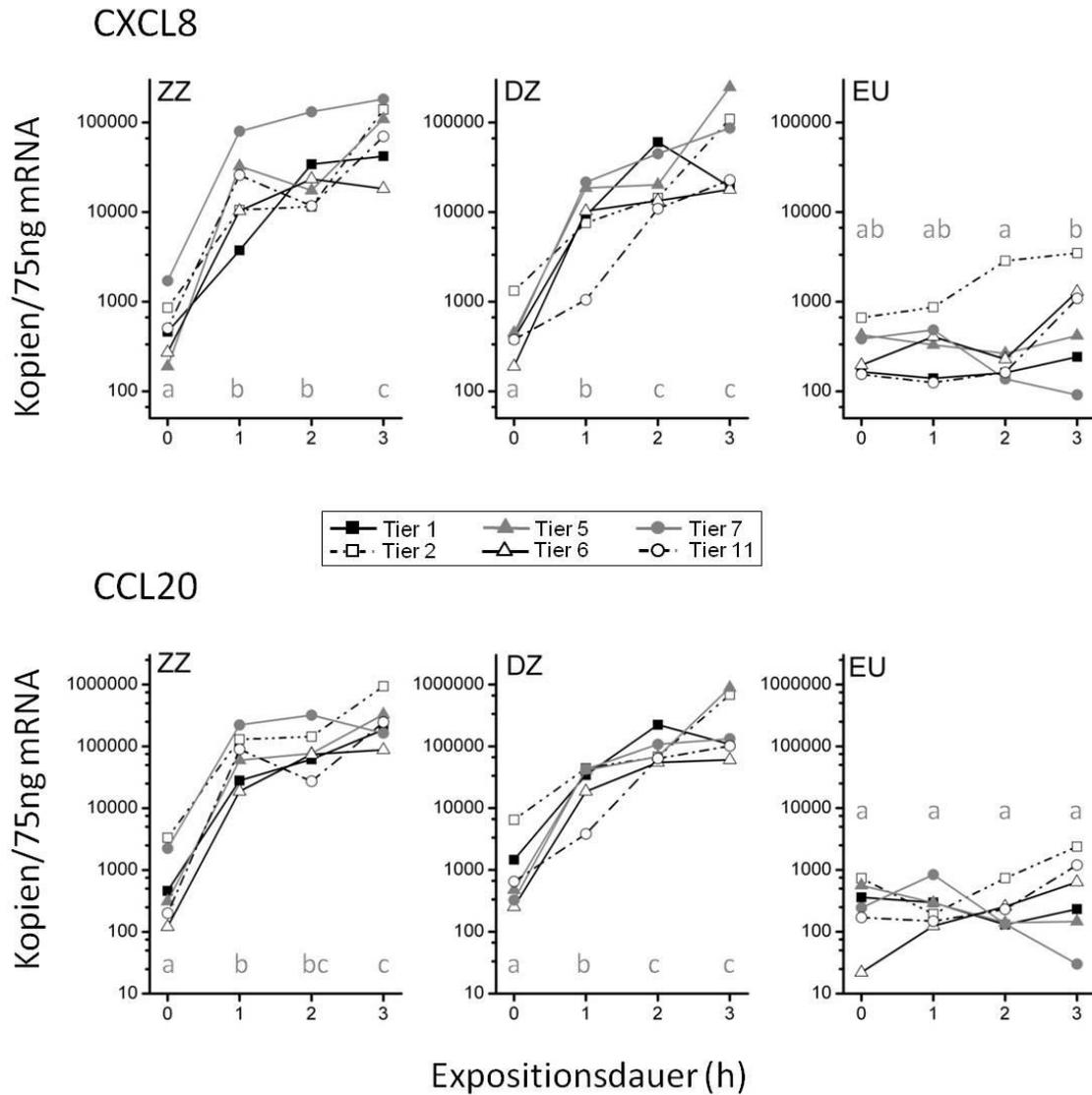


Abbildung 13: mRNA-Expression von CXCL8 und CCL20 nach intramammärer Inokulation mit *E. coli*₁₃₀₃

Dargestellt sind die gemessenen Kopien/75 ng mRNA in vier Eutervierteln 1 h (HR), 2 h (VL) und 3 h (HL) nach Inokulation von $5 \cdot 10^6$ CFU *E. coli*₁₃₀₃. Ein Euterviertel blieb unbehandelt (0 h; VR). Lokalisationen: Zitzenzisterne (ZZ), Drüsenzisterne (DZ), ventrales Euterparenchym (EU). Statistisch signifikante Unterschiede ($p=0,028$) innerhalb einer Lokalisation zwischen den Zeitpunkten relativ zur Inokulation sind mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet. Werte knapp unter der statistischen Signifikanzgrenze ($p=0,046$) wurden für CXCL8 in der ZZ und im EU zwischen den Zeitpunkten 2 h/3 h sowie für CCL20 in der ZZ zwischen 1 h/3 h gemessen.

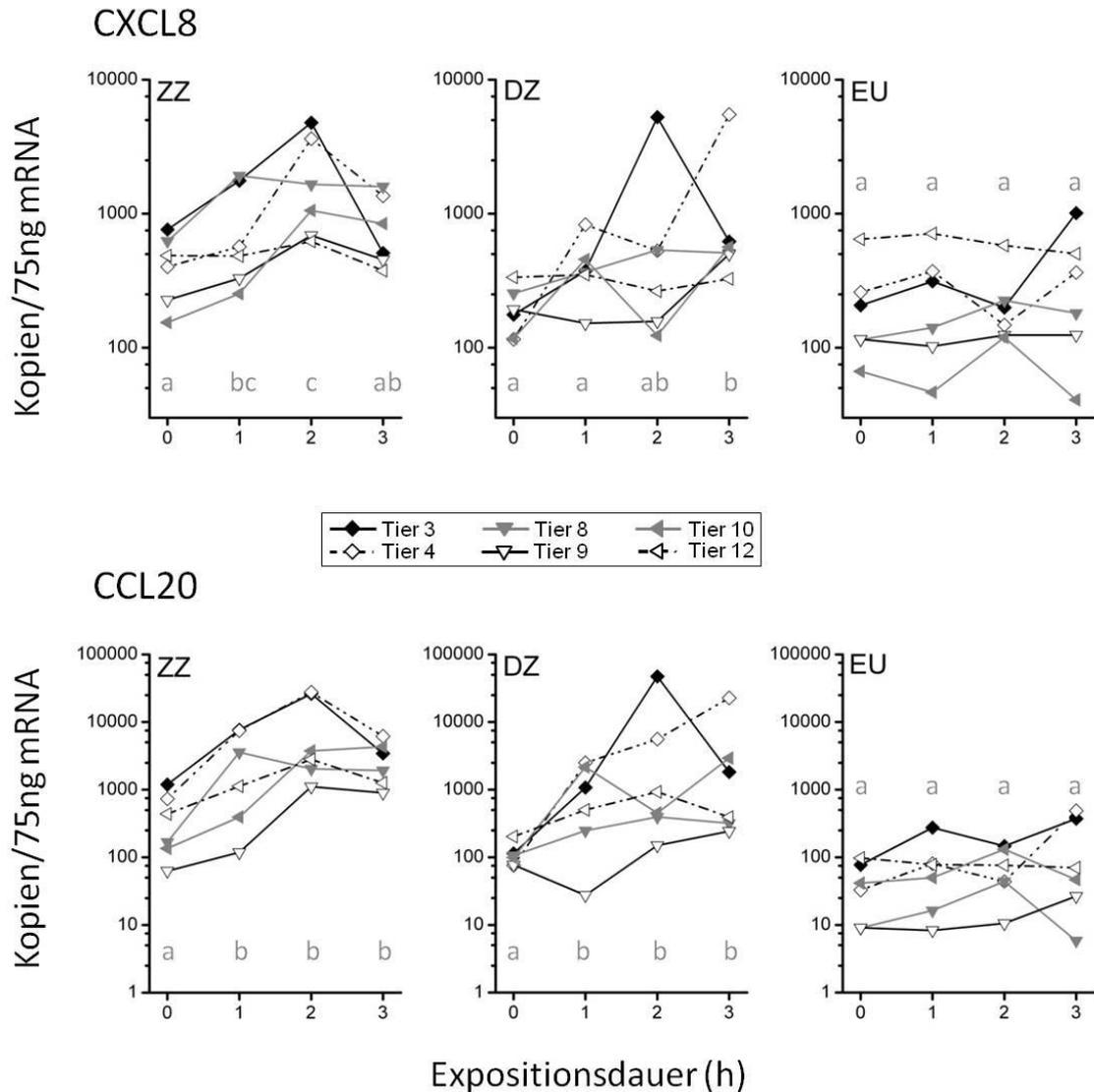


Abbildung 14: mRNA-Expression von CXCL8 und CCL20 nach intramammärer Inokulation mit *S. aureus*₁₀₂₇

Dargestellt sind die gemessenen Kopien/75 ng mRNA in vier Eutervierteln 1 h (HR), 2 h (VL) und 3 h (HL) nach Inokulation von $5 \cdot 10^6$ CFU *S.aureus*₁₀₂₇. Ein Euterviertel blieb unbehandelt (0 h; VR). Lokalisationen: Zitzenzisterne (ZZ), Drüsenzisterne (DZ), ventrales Euterparenchym (EU). Statistisch signifikante Unterschiede ($p=0,028$) innerhalb einer Lokalisation zwischen den Zeitpunkten relativ zur Inokulation sind mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet. Werte knapp unter der statistischen Signifikanzgrenze ($p=0,046$) wurden für CXCL8 in ZZ zwischen den Zeitpunkten 0 h/1 h und in der DZ zwischen 0 h/3 h und 1 h/3 h sowie für CCL20 in der DZ zwischen den Zeitpunkten 0 h/1 h gemessen.

4.2.7.3 Regulation von S100A9

Die mRNA-Expression von S100A9 wurde nach Pathogen-Inokulation schnell heraufreguliert. Allerdings fiel diese mRNA-Expressionssteigerung weniger stark aus, als bei den hier untersuchten Zytokinen und Chemokinen. In der Gruppe *Ec 3h* war eine 65-fache (ZZ) bzw. 50-fache (DZ) Hochregulation zu verzeichnen, während die Werte in der Gruppe *Sa 3h* um das 4-fache (ZZ) und 6-fache (DZ) anstiegen (siehe Tabelle 17). Nur zu den Zeitpunkten 2 h und 3 h nach Inokulation konnten in ZZ und DZ der Gruppe *Ec 3h* signifikant höhere Werte ($p < 0,05$) gemessen werden als in der Gruppe *Sa 3h*. Zwischen den Basisexpressionen der Kontrollviertel beider Versuchsgruppen konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

In der Gruppe *Ec 3h* konnte eine signifikante Hochregulation von S100A9 in der ZZ und DZ bereits nach 1-stündiger Erregerexposition aufgezeigt werden ($p < 0,05$). Mit andauernder Erregerpräsenz stiegen die Werte jedoch noch weiter an (siehe Abbildung 15). Insgesamt reagierten sämtliche Tiere in den beiden distalen Kompartimenten (ZZ, DZ) sehr ähnlich, mit Ausnahme von 3 Tieren, bei denen S100A9 3 h *p. inoc.* in der Lokalisation DZ wieder herabreguliert wurde. Der stärkste Anstieg der mRNA-Expression konnte sowohl in der ZZ als auch in der DZ zwischen 1- und 2-stündiger Erregerexposition beobachtet werden.

In der Gruppe *Sa 3h* war insgesamt nur eine schwache, heterogene, jedoch statistisch signifikante Heraufregulation in der DZ nach 3-stündiger Inokulation zu verzeichnen ($p = 0,028$; siehe Abbildung 15).

In der Gruppe *Ec 3h* konnte im EU nur zwischen 1- und 2-stündiger Exposition eine signifikante Herabregulation verzeichnet werden ($p = 0,04$; siehe Abbildung 15). Insgesamt jedoch wurde S100A9 in dieser Lokalisation sowohl nach Kontakt mit *E. coli*₁₃₀₃, als auch mit *S. aureus*₁₀₂₇ nicht nennenswert reguliert.

Sowohl die Basisexpressionen in den Kontrollvierteln als auch die Werte aller verglichenen Zeitpunkte in ZZ und DZ bei beiden Versuchsgruppen waren statistisch signifikant höher als in der Lokalisation EU (siehe Anhang, Tabelle 19 und Tabelle 20).

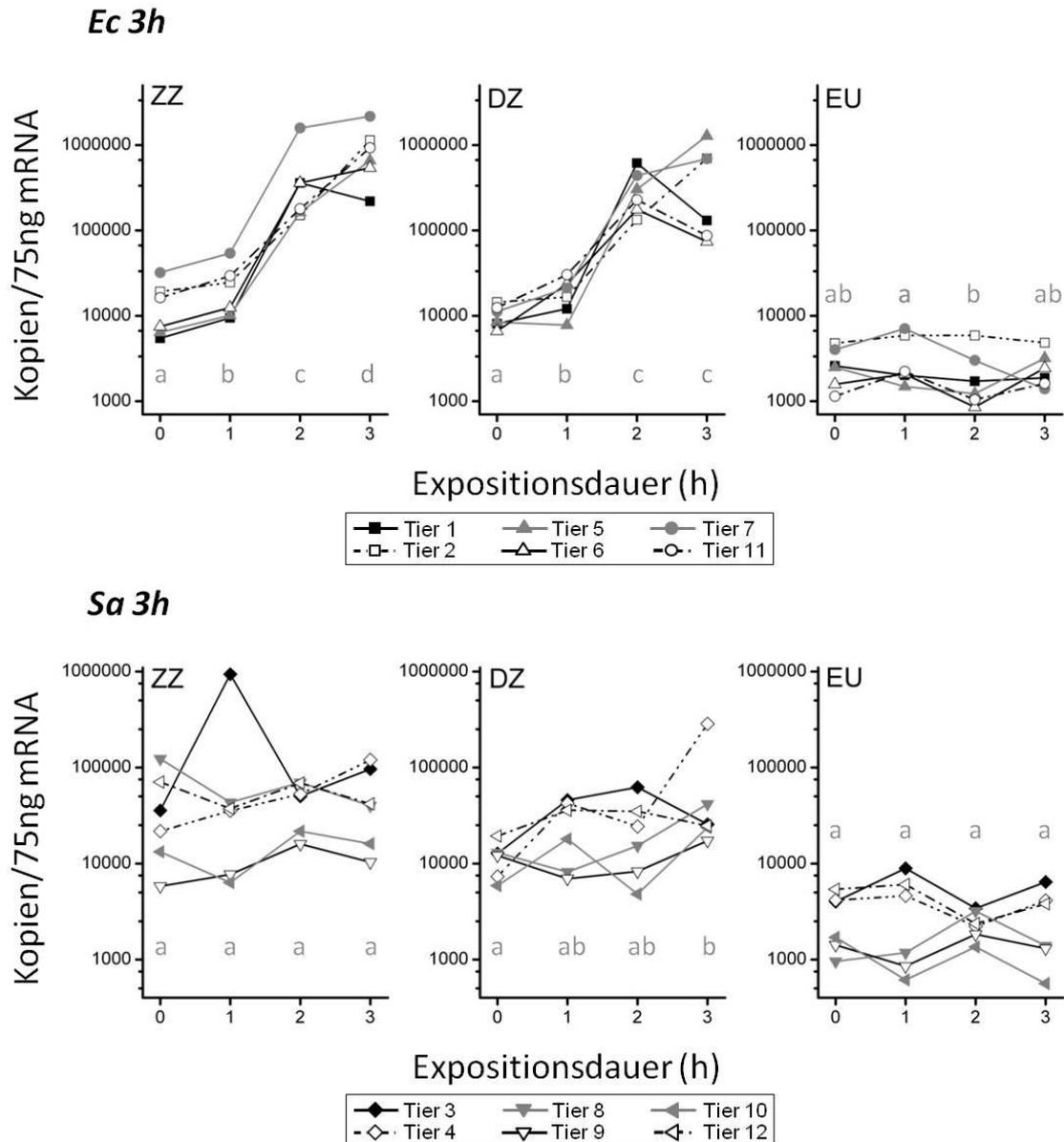


Abbildung 15: mRNA-Expression von S100A9 nach intramammärer Inokulation mit *E. coli*₁₃₀₃ oder *S. aureus*₁₀₂₇

Dargestellt sind die gemessenen Kopien/75 ng mRNA in vier Eutervierteln 1 h (HR), 2 h (VL) und 3 h (HL) nach Inokulation von $5 \cdot 10^6$ CFU *E. coli*₁₃₀₃ und *S. aureus*₁₀₂₇. Je ein Euterviertel blieb unbehandelt (0 h; VR). Lokalisationen: Zitzenzisterne (ZZ), Drüsenzisterne (DZ), ventrales Euterparenchym (EU). Statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,028$) innerhalb einer Lokalisation zwischen den Zeitpunkten relativ zur Inokulation sind mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet. Werte knapp unter der statistischen Signifikanzgrenze ($p < 0,05$) wurden innerhalb der Gruppe **Ec 3h** in der Lokalisation ZZ zwischen den Zeitpunkten 2 h/3 h, in DZ zwischen 0 h/1 h sowie im EU zwischen 1 h/2 h Erregerpräsenz gemessen.

4.2.7.4 Regulation von LAP

Die mRNA des Defensins LAP wurde nur in der ZZ und DZ innerhalb der Gruppe *Ec 3h* reguliert. Dort zeigte sich eine 5-fache Hochregulation nach 3-stündiger Erregerexposition (siehe Tabelle 17). Die Basisexpression in den nicht inokulierten Kontrollvierteln unterschied sich zwischen den beiden Versuchsgruppen nicht signifikant.

Die Heraufregulation von LAP in der Versuchsgruppe *Ec 3h* war erst nach 2-stündiger Erregeranwesenheit signifikant (ZZ und DZ; $p=0,028$). Im ventralen Euterparenchym konnte keine Expressionsänderung verzeichnet werden (siehe Abbildung 16).

Innerhalb der ersten 3 h nach Inokulation mit *S. aureus*₁₀₂₇ wurde LAP im Gruppenmittel nicht signifikant reguliert (siehe Abbildung 16). Nur Tier 3 zeigte eine Hochregulation von LAP in allen drei untersuchten Kompartimenten.

Besonders in der Lokalisation EU wurde für LAP eine tierindividuell unterschiedlich hohe Expression gemessen. Eine der Inokulation folgende Regulation fand allerdings in beiden Gruppen nicht statt (siehe Abbildung 16).

Distal zeigte LAP höhere Werte als proximal. Dies zeigte sich vor allem in der Basisexpression der Lokalisationen ZZ, DZ und EU, die sich allesamt statistisch voneinander unterschieden. Außerdem waren statistisch signifikante Unterschiede zwischen den drei Lokalisationen zu fast allen untersuchten Zeitpunkten *p. inoc.* zu verzeichnen (siehe Anhang, Tabelle 19 und Tabelle 20).

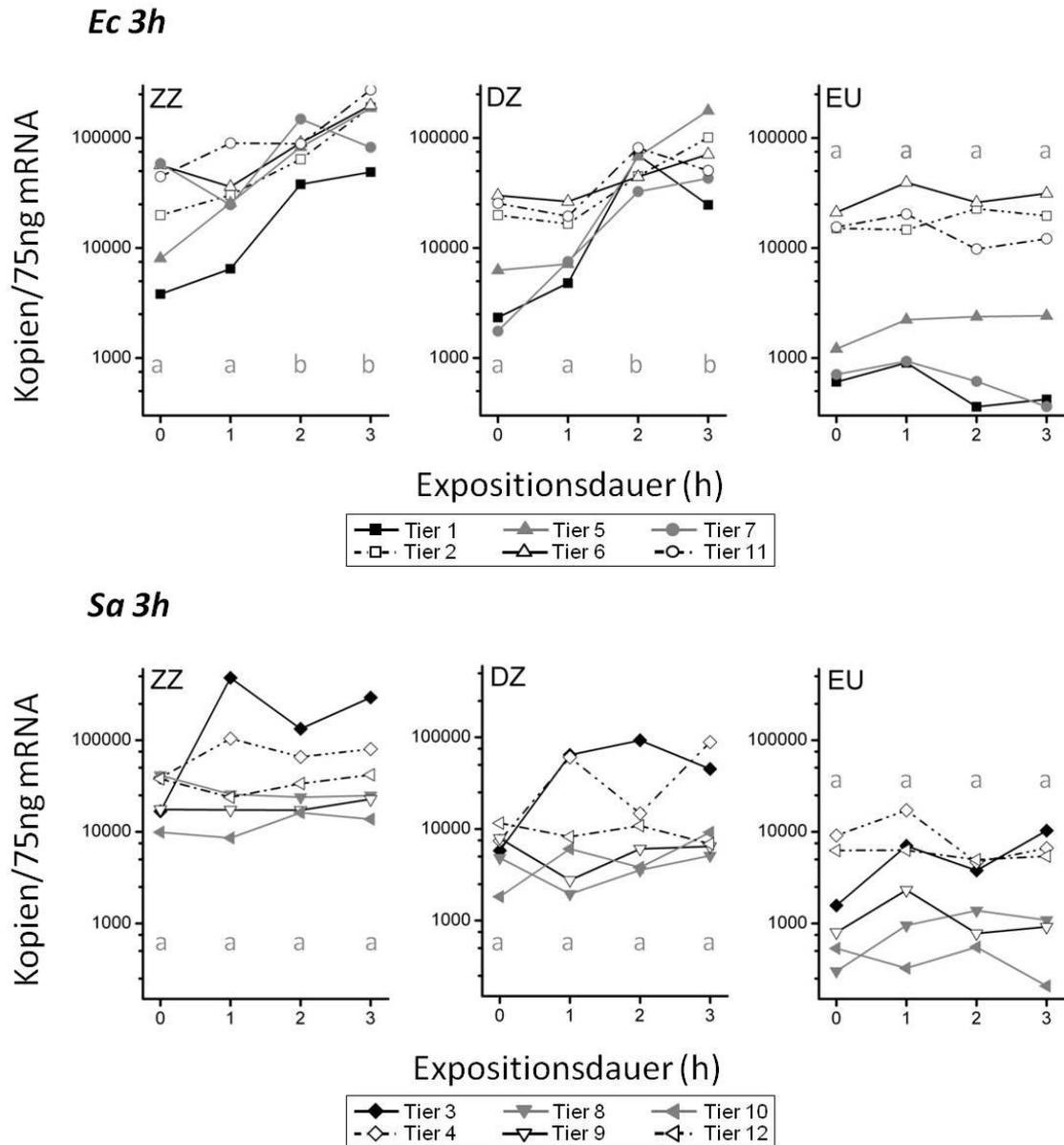


Abbildung 16: Genexpression von LAP nach intramammärer Inokulation mit *E. coli*₁₃₀₃ oder *S. aureus*₁₀₂₇

Dargestellt sind die gemessenen Kopien/75 ng mRNA in vier Eutervierteln 1 h (HR), 2 h (VL) und 3 h (HL) nach Inokulation von $5 \cdot 10^6$ CFU *E. coli*₁₃₀₃ und *S. aureus*₁₀₂₇. Je ein Euterviertel blieb unbehandelt (0 h; VR). Lokalisationen: Zitzenzisterne (ZZ), Drüsenzisterne (DZ), ventrales Euterparenchym (EU). Statistisch signifikante Unterschiede ($p=0,028$) innerhalb einer Lokalisation zwischen den Zeitpunkten relativ zur Inokulation sind mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet. Werte knapp unter der statistischen Signifikanzgrenze ($p=0,046$) wurden innerhalb der Gruppe **Ec 3h** in ZZ zwischen den Zeitpunkten 1 h/2 h gemessen.

4.2.7.5 Expression weiterer Kandidatengene

Die untersuchte mRNA-Expression von LCN2, MX2 und CYP1A1 unterlag in den ersten 3 h nach Erregerinokulation nur einer geringgradigen oder keiner Regulation.

Lipocalin-2 (LCN2):

LCN2 wurde nach Inokulation von *E. coli*₁₃₀₃ und *S. aureus*₁₀₂₇ nur geringgradig reguliert (siehe Tabelle 17). Im Vergleich der beiden Versuchsgruppen zeigte sich, dass die mRNA-Expression von LCN2 in der ZZ nach 2-stündiger Erregerexposition innerhalb der Gruppe **Sa 3h** signifikant höher war als in der Gruppe **Ec 3h** ($p=0,045$). Jedoch unterschied sich in diesem Kompartiment ebenfalls die Basisexpression zwischen beiden Gruppen ($p=0,045$).

Innerhalb der Gruppe **Ec 3h** konnte in keiner der untersuchten Lokalisationen im Vergleich der Zeitpunkte eine Expressionsänderung festgestellt werden. Dagegen konnte nach Inokulation von *S. aureus*₁₀₂₇ für LCN2 eine schwach signifikante Herabregulation zwischen 0 h und 3 h Erregerexposition in der ZZ festgestellt werden ($p<0,05$; siehe Abbildung 17).

Grundsätzlich konnte gezeigt werden, dass LCN2 in ZZ und DZ gruppenübergreifend höher exprimiert wurde als im EU. In der Lokalisation EU streuten die Messwerte ähnlich wie bei LAP stark zwischen den Einzeltieren, verhielten sich allerdings sehr homogen auf tierindividueller Expressionsebene (siehe Abbildung 17).

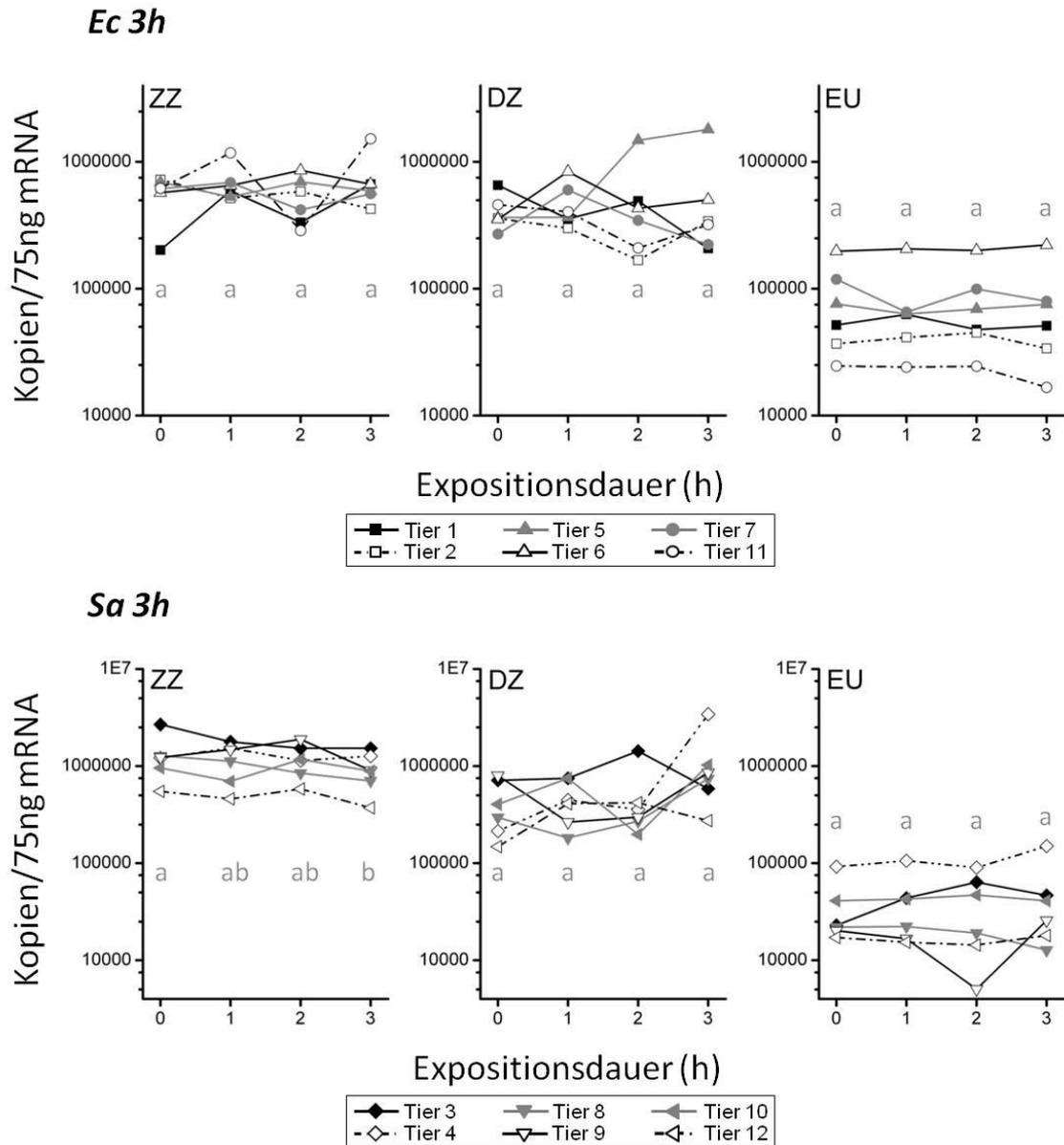


Abbildung 17: Genexpression von LCN2 nach intramammärer Inokulation mit *E. coli*₁₃₀₃ oder *S. aureus*₁₀₂₇

Dargestellt sind die gemessenen Kopien/75 ng mRNA in vier Eutervierteln 1 h (HR), 2 h (VL) und 3 h (HL) nach Inokulation von $5 \cdot 10^6$ CFU *E. coli*₁₃₀₃ und *S. aureus*₁₀₂₇. Je ein Euterviertel blieb unbehandelt (0 h; VR). Lokalisationen: Zitzenzisterne (ZZ), Drüsenzisterne (DZ), ventrales Euterparenchym (EU). Statistisch signifikante Unterschiede ($p=0,028$) innerhalb einer Lokalisation zwischen den Zeitpunkten relativ zur Inokulation sind mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet.

MX2:

MX2 erfuhr im Rahmen der Inokulation von *E. coli* und *S. aureus* ebenfalls kaum nennenswerte regulatorische Veränderungen (siehe Tabelle 17). Es konnte weder in der Grundexpression der nicht inokulierten Viertel, noch zu den einzelnen Zeitpunkten signifikante Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen ausgemacht werden.

Wie in Abbildung 18 dargestellt, konnte in der Gruppe **Ec 3h** lediglich in der Lokalisation ZZ eine signifikante Heraufregulation 3 h *p. inoc.* festgestellt werden ($p=0,028$).

Innerhalb der Versuchsgruppe **Sa 3h** konnten regulatorische Veränderungen nur in der DZ zwischen 0 h und 3 h Erregeranwesenheit in Form einer Hochregulation nachgewiesen werden. Es fiel auf, dass die mRNA-Expressionswerte besonders in der ZZ stark streuten (siehe Abbildung 18).

Die Lokalisationen ZZ und DZ zeigten in beiden Versuchsgruppen signifikant höhere Expressionswerte für MX2 als das EU (siehe Anhang, Tabelle 19 und Tabelle 20).

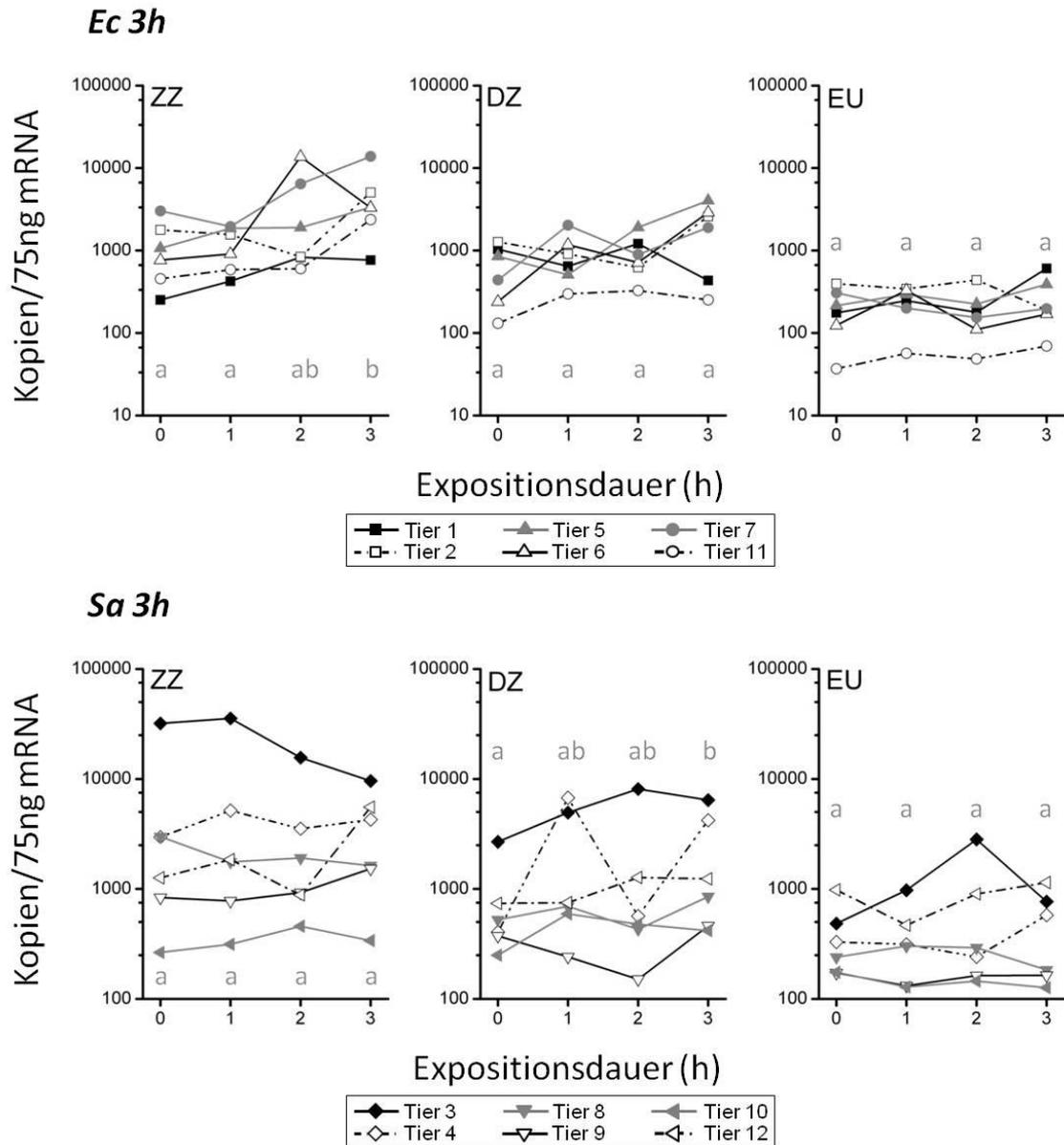


Abbildung 18: Genexpression von MX2 nach intramammärer Inokulation mit *E. coli*₁₃₀₃ oder *S. aureus*₁₀₂₇

Dargestellt sind die gemessenen Kopien/75 ng mRNA in vier Eutervierteln 1 h (HL), 2 h (VL) und 3 h (HL) nach Inokulation von $5 \cdot 10^6$ CFU *E. coli*₁₃₀₃ und *S. aureus*₁₀₂₇. Je ein Euterviertel blieb unbehandelt (0 h; VR). Lokalisationen: Zitzenzisterne (ZZ), Drüsenzisterne (DZ), ventrales Euterparenchym (EU). Statistisch signifikante Unterschiede ($p=0,028$) innerhalb einer Lokalisation zwischen den Zeitpunkten relativ zur Inokulation sind mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet.

CYP1A1:

Auch für CYP1A1 fand weder bei der mit *E. coli*₁₃₀₃ noch bei den mit *S. aureus*₁₀₂₇ inokulierten Versuchstieren eine deutliche Regulation der mRNA-Expression in den untersuchten Lokalisationen des Euters statt (siehe Abbildung 19). Die Basisexpressionen befanden sich auf vergleichbarem Niveau. Auch im Vergleich der untersuchten Zeitpunkte konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen festgestellt werden.

Außer in der ZZ zwischen 0 h und 2 h ließ sich innerhalb der Gruppe **Ec 3h** keine statistisch signifikante Induktion der mRNA-Expression nachweisen (siehe Abbildung 19).

Dagegen konnte in der Gruppe **Sa 3h** beobachtet werden, dass CYP1A1 in allen drei untersuchten Lokalisationen zeitabhängig mehr oder weniger deutlich herabreguliert wurde (siehe Abbildung 19).

Zwischen den drei Lokalisation ZZ, DZ und EU ließen sich zwischen beiden Versuchsgruppen signifikante Unterschiede aufzeigen. Die Basisexpressionen in den Kontrollvierteln waren in der Gruppe **Ec 3h** in der Lokalisation ZZ schwach signifikant niedriger als in der DZ ($p < 0,05$). Innerhalb der Versuchsgruppe **Sa 3h** war die Basisexpression in der ZZ der Kontrollviertel am niedrigsten und unterschied sich statistisch signifikant von der in DZ und EU ($p = 0,028$; siehe Tabelle 19 und Tabelle 20).

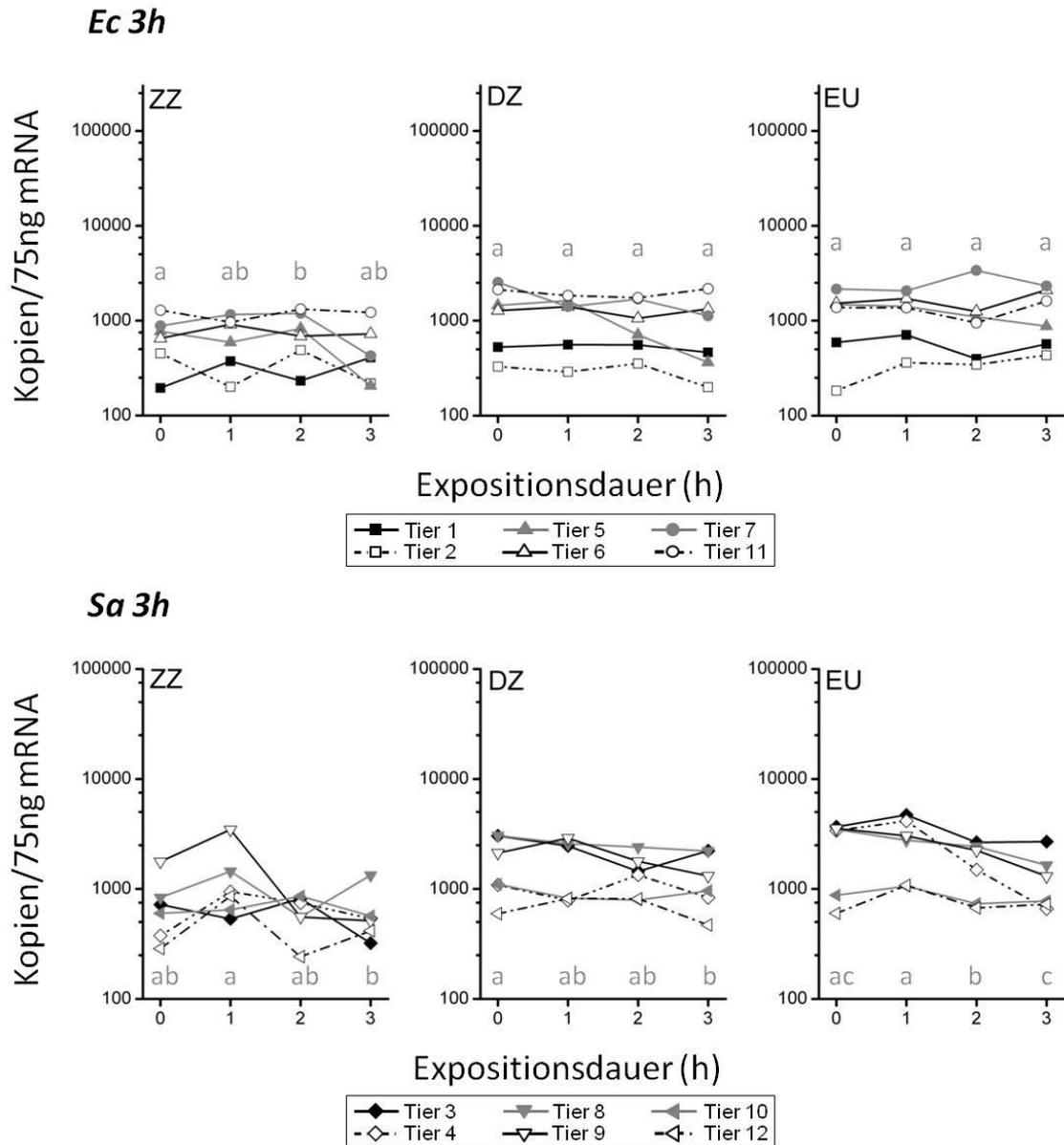


Abbildung 19: Genexpression von CYP1A1 nach intramammärer Inokulation mit *E. coli*₁₃₀₃ oder *S. aureus*₁₀₂₇

Dargestellt sind die gemessenen Kopien/75 ng mRNA in vier Eutervierteln 1 h (HR), 2 h (VL) und 3 h (HL) nach Inokulation von $5 \cdot 10^6$ CFU *E. coli*₁₃₀₃ und *S. aureus*₁₀₂₇. Je ein Euterviertel blieb unbehandelt (0 h; VR). Lokalisationen: Zitzenzisterne (ZZ), Drüsenzisterne (DZ), ventrales Euterparenchym (EU). Statistisch signifikante Unterschiede ($p=0,028$) innerhalb einer Lokalisation zwischen den Zeitpunkten relativ zur Inokulation sind mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet. Werte knapp unter der statistischen Signifikanzgrenze ($p=0,046$) wurden innerhalb der Gruppe *Sa 3h* in der Lokalisation EU zwischen den Zeitpunkten 0 h/2 h gemessen.

4.3 Untersuchungen zum Wachstums- und Adaptationsverhalten von *E. coli*₁₃₀₃ und *S. aureus*₁₀₂₇ *in vitro*

Da sich das Bakterienwachstum im Verlauf der Kurzzeit-Infektionsversuche nur schwer ermitteln ließ (siehe 4.2.5), wurden im Rahmen des Dissertationsprojektes *in vitro*-Versuche zu Wachstum und Adaptation von *E. coli*₁₃₀₃ und *S. aureus*₁₀₂₇ durchgeführt. In diesen Experimenten wurde versuchsvorbereitend das Wachstum in standardisiertem Medium und antiseptisch gewonnener Vollmilch (siehe 4.3.1) untersucht. Anschließend beschäftigten wir uns mit der Frage, ob *E. coli*₁₃₀₃ und *S. aureus*₁₀₂₇ durch Vorinkubation in Vollmilch gesunder Kühe einen Vorteil gegenüber in konventionellem Nährmedium kultivierten Erregern erfahren. Diese Fragestellung wurde anhand der Wachstumsgeschwindigkeit untersucht (siehe Abbildung 20).

4.3.1 Wachstum von *E. coli*₁₃₀₃ und *S. aureus*₁₀₂₇ in LB-Medium und Milch

Nach der 14-stündigen Inkubationsphase in LB-Medium konnte für *E. coli*₁₃₀₃ eine deutlich stärkere Vermehrung, als bei *S. aureus*₁₀₂₇ aufgezeigt werden. So waren für *E. coli* im Schnitt $3,1 \cdot 10^9 \pm 6 \cdot 10^8$ CFU/ml LB-Medium (MW \pm SD) nachweisbar. Bei gleich langer Inkubation von *S. aureus*₁₀₂₇ wurden hingegen lediglich $1,4 \cdot 10^9 \pm 7,5 \cdot 10^8$ CFU/ml (MW \pm SD) gezählt. Das Wachstum in LB-Medium verlief bei Vergleich der verschiedenen Versuchsansätze (n = 6) insgesamt sehr homogen.

Vergleichend hierzu wurde die Vermehrung in Vollmilch dargestellt. Die Zellzahl im Viertelanfangsgemelk lag bei allen Tieren, die zur Gewinnung von Milch herangezogen wurden, unter $1 \cdot 10^5$ Zellen/ml. Alle weiteren untersuchten Milchinhaltsstoffe (Fett, Protein, Laktose, Harnstoff, pH-Wert) befanden sich innerhalb der in Tabelle 11 genannten Referenzbereiche. Nach 14-stündiger Inkubation von *S. aureus*₁₀₂₇ in antiseptisch gewonnener Vollmilch (n = 23) konnte ein deutlich heterogeneres Wachstum als in LB-Medium aufgezeigt werden und es traten starke tierindividuelle Schwankungen auf. Die Zahl der ermittelten CFU/ml variierte hier zwischen den beprobten Tieren um über den Faktor 13. Innerhalb der Ansätze eines Tieres dagegen konnten meist einheitliche Werte für *S. aureus*₁₀₂₇ vorgefunden werden. Es ergab sich ein Mittelwert von $5,3 \cdot 10^8 \pm 8,9 \cdot 10^8$ CFU/ml (MW \pm SD) zum Ende der 14-stündigen Inkubation. *E. coli*₁₃₀₃ wuchs erneut sowohl innerhalb eines Tieres, als auch tierübergreifend vergleichsweise homogen. Nach 14 h Inkubation erreichte *E. coli* Zahlen von durchschnittlich $1,2 \cdot 10^9 \pm 2,5 \cdot 10^8$ CFU/ml (MW \pm SD). Es konnte ein statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich zu den erreichten Keimzahlen der *S. aureus*-

Anzüchtung in Vollmilch nachgewiesen werden ($p < 0,05$). Hinzukommend wies *E. coli* auch ein statistisch signifikant besseres Wachstum in LB-Medium verglichen mit Milch auf ($p < 0,05$).

Im Anschluß an diese Versuche sollte geprüft werden, ob die Vorinkubation in Milch dazu führte, dass sich *E. coli* oder *S. aureus* bei erneutem Überführen in Milch schneller vermehrten als nach Vorinkubation in LB-Medium. Zur Einstellung der anschließend notwendigen Überführungsdosis von $150 \cdot 10^6$ CFU waren für *E. coli* 50-85 μ l des LB-Mediums (Ansatz Medium-Milch) sowie 100-160 μ l der inkubierten Milch (Ansatz Milch-Milch) erforderlich. In den Ansätzen mit *S. aureus* wurden 160-175 μ l aus dem LB-Medium (Ansatz Medium-Milch) und 0,8-1 ml aus der Milch (Ansatz Milch-Milch) entnommen, im Folgenden weiter inkubiert und das Wachstum analysiert. Die Ausgangskonzentration belief sich bei *E. coli* durchschnittlich auf $7,34 \cdot 10^5$ CFU/ml im Ansatz Medium-Milch und $7,18 \cdot 10^5$ CFU/ml im Ansatz Milch-Milch. Bei *S. aureus* gestaltete sich die Einstellung der Keimzahlen durch die größeren individuellen Schwankungen schwieriger, wodurch die Ausgangskonzentrationen stärker streuten und im Ansatz Medium-Milch im Mittel $1,43 \cdot 10^6$ CFU/ml und im Ansatz Milch-Milch $8,15 \cdot 10^5$ CFU/ml betragen (siehe Abbildung 20)

4.3.2 Adaptation von *E. coli*₁₃₀₃ und *S. aureus*₁₀₂₇ an das Nährmedium

Um zu prüfen, ob die Vorinkubation (siehe 4.3.1) einen Einfluss auf die Geschwindigkeit des Wachstum *in vivo* hat und ob sich die in Milch vorkultivierten Keime erfolgreich an dieses Umgebungmilieu anpassen konnten, wurden die 2 Versuchsansätze für beide Pathogene parallel im selben Experiment und mit Vollmilch desselben Modelltieres durchgeführt.

Wie in Abbildung 20 dargestellt, verlief das Wachstum für *E. coli* sehr gleichförmig, unabhängig von der Art der Vorinkubation. Die Latenzphase dauerte über einen Zeitraum zwischen 1 und 1,5 h Inkubationsdauer an. Daraufhin begann sich *E. coli* in beiden Ansätzen logarithmisch zu vermehren. Es konnte kein signifikanter Unterschied im Keimwachstumsverlauf zwischen den Ansätzen Medium-Milch und Milch-Milch festgestellt werden.

Die Ergebnisse der parallel durchgeführten Ansätze mit *S. aureus*₁₀₂₇ sind in Abbildung 20 gezeigt. Die Ausgangskonzentrationen wichen hier stärker voneinander ab; jedoch verlief die Wachstumskurve bei beiden Ansätzen sehr gleichförmig. Die

Anpassungsphase nahm auch hier in beiden Ansätzen 1 bis 1,5 h in Anspruch. Die anschließende Keimvermehrung erfolgte im Vergleich zu *E. coli* langsamer, was sich in der flacher verlaufenden Wachstumskurve widerspiegelt (siehe Abbildung 20). Auch für *S. aureus*₁₀₂₇ konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Ansätzen aufgezeigt werden, die sich auf die unterschiedliche Vorinkubation in Milch oder Medium hätte zurückführen lassen.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass *E. coli*₁₃₀₃ ein schnelleres Wachstum zeigte als *S. aureus*₁₀₂₇. Ab 4-stündiger Inkubationsdauer konnte im Ansatz Medium-Milch eine statistisch signifikant höhere Vermehrung für *E. coli* nachgewiesen werden ($p=0,02$), im Ansatz Milch-Milch war dies schon ab 2,5-stündiger Inkubation möglich ($p=0,04$).

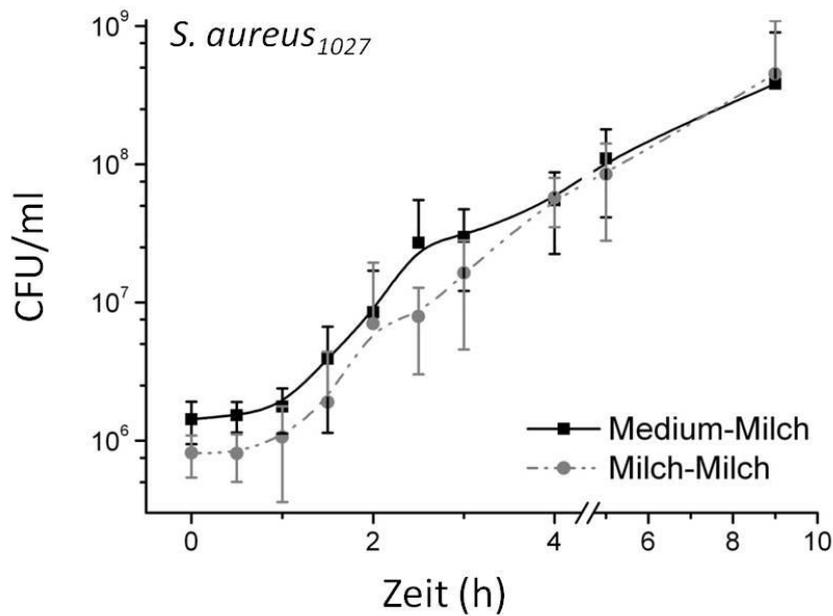
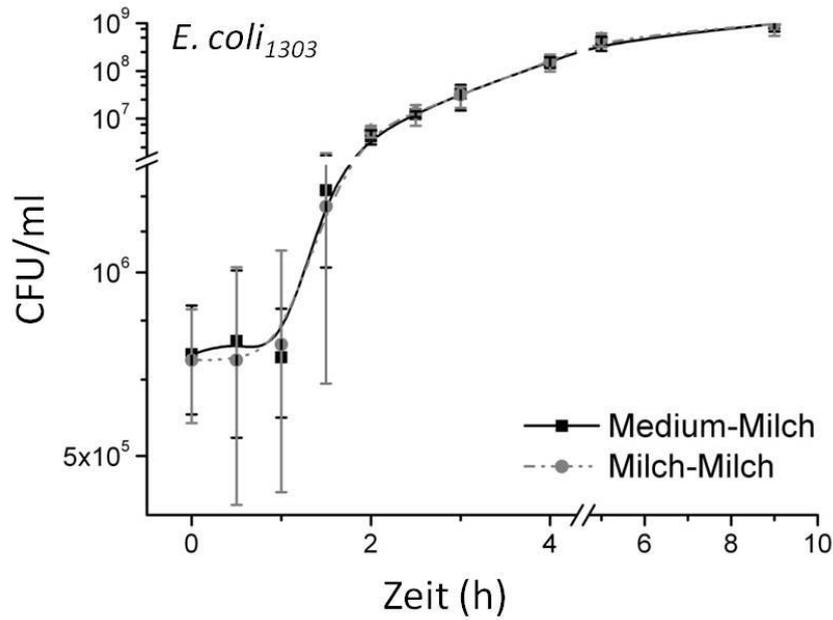


Abbildung 20: Wachstum von *E. coli*₁₃₀₃ und *S. aureus*₁₀₂₇ nach Vorinkubation in LB-Medium oder Milch (je n = 5)

Dargestellt ist die Anzahl der ermittelten CFU *E. coli*₁₃₀₃ und *S. aureus*₁₀₂₇ (MW ± SD). Nach Vorinkubation über 14 h in LB-Medium (Medium-Milch) oder keimfreier Milch (Milch-Milch) wurden $150 \cdot 10^6$ CFU in 150 ml antiseptisch gewonnene Milch überführt und anschließend das Wachstum zu den angegebenen Zeitpunkten bestimmt.

5 Diskussion

5.1 Etablierung eines Kurzzeit-Mastitis-Modells *in vivo*

Die Mastitis des Rindes stellt eine der verlustreichsten Einzeltierkrankungen in der Milchwirtschaft dar. *E. coli* und *S. aureus* zählen zu den häufigsten Mastitis-Erregern und führen meist zu gegensätzlichen Krankheitsbildern. Die im vorliegenden Dissertationsprojekt verwendeten Modellpathogene rufen bekanntermaßen akute klinische Mastitiden (*E. coli*₁₃₀₃) oder chronische/subklinische Mastitiden (*S. aureus*₁₀₂₇) hervor [2, 6, 51]. Zur Erforschung pathogenspezifischer initialer Wirtsreaktionen wurde ein experimentelles Kurzzeit-Mastitis-Infektionsmodell *in vivo* etabliert. Ziel des Projektes war es, die ersten Ereignisse nach Erregerkontakt auf Transkriptomebene anhand der Expression ausgewählter Kandidatengene aufzudecken. Dabei sollte ein Zeitraum abgegriffen werden, in dem die Erreger zwar bereits erkannt wurden, aber noch keine Effekte im Sinne klinischer Symptome in Erscheinung traten.

In den letzten Jahren gewann die Erforschung der frühen Phase einer Infektion mit Mastitiserregern zunehmend an Bedeutung. Hierbei konnte gezeigt werden, dass in Mastitis-Infektionsmodellen mit *E. coli* der Höhepunkt der akuten klinischen Symptomatik 24 h nach intramammärer Inokulation bereits überschritten wurde, wohingegen nach Inokulation mit *S. aureus* 24 h *p. inoc.* zum Teil noch keine klinischen Veränderungen, insbesondere eine Erhöhung der Milchzellzahl dokumentiert werden konnten [121]. Um einerseits initiale Reaktionen seitens des Wirtes zu beschleunigen sowie zeitlich besser zu vereinheitlichen und andererseits die speziespezifische Vermehrungsphase der Pathogene im Euter zu umgehen [122], sollte ein Tiermodell etabliert werden, in dem der Wirt über einen relativ kurzen Zeitraum mit einer hohen Pathogendosis konfrontiert werden sollte. Dies wurde vorbereitend in einem Pilotversuch mit einer Inokulationsdosis von $5 \cdot 10^6$ CFU *E. coli*₁₃₀₃ getestet. Im Rahmen des durchgeführten Pilotversuchs konnte bereits 4 h *p. inoc.* eine Erhöhung der Körpertemperatur und der Zellzahl sowie eine starke Modulation der Genexpression in den inokulierten Vierteln dokumentiert werden (siehe 4.1.1). Deshalb wurde die Versuchsdauer im Hauptversuch auf 3 h angepasst.

Im Vergleich zur Zellkultur mit Milchdrüsenepithelzellen (MEC) lassen sich immunologische Vorgänge in verschiedenen Lokalisationen des Euters besser im Tiermodell darstellen; nicht zuletzt, weil nach einer Infektion mit Mastitiserregern komplexe und tierindividuell unterschiedliche Vorgänge in Gang gesetzt werden, die

sich nur schwer *in vitro* simulieren lassen [123]. Außerdem spielen bei initialen Abwehrvorgängen im Euter nicht nur MEC des milchbildenden Parenchyms eine wichtige Rolle. So wird unterschiedlichen Zelltypen in der Fürstenberg'sche Rosette sowie der Zitzen- und Drüsenzisterne eine wichtige Wächterfunktion zugesprochen [14]. Innerhalb der letzten Jahrzehnte wurden für zahlreiche Fragestellungen Mastitis-Infektionsmodelle beim Rind eingesetzt [13, 14, 35]. Diese sind im Gegensatz zu spontan erkrankten Tieren besser kontrollier- und interpretierbar. Um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse sicherzustellen, ist allerdings eine hohe Standardisierung der verwendeten Modelltiere mit Hilfe streng definierter Modellgrenzen unerlässlich. In der Vergangenheit wurden diese Anforderungen an Mastitis-Modelle sehr unterschiedlich definiert. Nur in wenigen Studien erfolgte eine Vorselektion anhand klinischer Parameter sowie lokaler und systemischer immunologischer Parameter, wie Laktationszeitpunkt, Anzahl bisheriger Laktationen und Zellzahl in der Milch (SCC) sowie wiederholt bakteriologisch negativer Befunde [9]. Erklärtes Ziel innerhalb der kooperierenden Forschungsgruppe sowie des vorliegenden Dissertationsprojektes war es somit, die Ausgangslage der Tiere innerhalb streng definierter Modellgrenzen festzusetzen. Deswegen wurden nur euter- und allgemein-gesunde Tiere gleichen Alters und Laktationsstadiums eingesetzt, welche im Sexualzyklus synchronisiert waren (siehe 3.2.1).

Besonderes Augenmerk wurde darüber hinaus auf die somatische Zellzahl in der Milch gelegt, welche ein wichtiger Parameter der Eutergesundheit ist [124]. Da Entzündungsreaktionen bei natürlicher und experimentell hervorgerufener Mastitis durch erhöhte PMN-Gehalte beeinflusst werden [125, 126], wurde die Zellzahl in den vorliegenden Versuchen auf $< 5 \cdot 10^4$ Zellen/ml Milch auf Viertelebene festgesetzt. Da die Anzahl der PMN im Euter und somit die Milchzellzahl mit steigender Laktationszahl zunimmt und sich mit fortschreitender Laktationsdauer die Zellen aller Milchzellpopulationen erhöhen [127, 128], wurden nur Erstkalbinnen in der Mitte der Laktation für die Versuche verwendet. Dies gewährleistete auch eine zuverlässigere Sicherheit, dass die Tiere bis dato noch nie an einer Mastitis erkrankt waren.

Petzl (2005) und Pfister (2009) konnten zeigen, dass der Zyklusstand der Kuh einen Einfluss auf den Milchzellgehalt hat und Östrogene die Reaktionslage boviner Makrophagen verändern können [121, 129]. Somit ist eine Beeinflussung immunologischer Vorgänge durch Sexualsteroiden naheliegend. Um die Ergebnisreproduzierbarkeit und -vergleichbarkeit noch weiter zu optimieren, wurde der Zyklus der

Versuchstiere hormontherapeutisch synchronisiert. Die Tiere befanden sich zum Versuchsbeginn in Brunst. Der Zeitraum des Östrus ist mit 18 h Dauer gut eingrenzbare und am zuverlässigsten innerhalb des physiologischen Sexualzyklus festzumachen.

Im Versuchsverlauf wurden allgemeine und lokale klinische Parameter untersucht und dokumentiert. Hierzu zählten die Bewertung des Allgemeinbefindens und der Euter-gesundheit, die Dokumentation der rektal gemessenen Körpertemperatur, der Leukozytengehalte im Blut und grobsinnlich zu erhebende Parameter der Milch. Diese Parameter eignen sich in Mastitis-Infektionsmodellen gut dazu, systemische und lokale Effekte der vorangegangenen intramammären Inokulation von Pathogenen aufzuzeigen. In vorhergehenden Studien konnten durch Inokulation einer Infektionsdosis von 500 CFU *E. coli* nach 12-15 h eine deutliche Veränderung aller genannten klinischen Parameter gemessen werden [114, 129]. Bei *S. aureus* dagegen findet die lokale Reaktion verzögert und abgeschwächt statt; eine systemische Reaktion bleibt zumeist aus [130].

Im Rahmen der hier durchgeführten Versuche konnten wie erwartet bei keinem der Versuchstiere Hinweise auf eine systemische Reaktion des Organismus innerhalb der ersten 3 h nach Inokulation der Pathogene gefunden werden. Die rektal gemessene Körpertemperatur und die Leukozytengehalte im Blut befanden sich sowohl zu Versuchsbeginn als auch zum Ende der Versuche im physiologischen Referenzbereich (siehe 4.2.2.2 und 4.2.2.3). Des Weiteren konnten am Euter selbst palpatorisch und adspektorisch zu sämtlichen Untersuchungszeitpunkten keine Auffälligkeiten beobachtet werden. Die gewonnene Milch wurde stets als grobsinnlich unauffällig bewertet (siehe 4.2.2.1 und 4.2.2.4).

Neben den klinischen Parametern wurde der SCC sowie verschiedene Milchinhaltstoffe und die Keimzahl im Versuchsverlauf untersucht. Dies gestaltete sich allerdings schwierig, denn durch die Beprobung unterschiedlicher Gemelksfraktionen war die Vergleichbarkeit der einzelnen Proben untereinander oft nicht gegeben. So ist seit langem bekannt, dass sich der Gehalt an Milchinhaltstoffen im End- und Residualgemelk deutlich von dem im Hauptgemelk unterscheidet. Der SCC steigt im Residualgemelk stark an. Bei der Zelldifferenzierung kann dann ein erhöhter Gehalt an PMN detektiert werden [131, 132]. Diese Erkenntnisse decken sich mit den Ergebnissen des vorliegenden Dissertationsprojektes. Bei der zum Zeitpunkt Std. 0 gewonnenen Milch handelte es sich bereits um Endgemelk, weil die Färsen bereits zum Zeitpunkt Std. -3 gemolken wurden. Diese Proben wiesen erwartungsgemäß einen

erhöhten Zellgehalt auf (siehe 4.2.3). Der Anstieg der Zellzahl zwischen den Zeitpunkten Std. -3 und Std. 0 fand in allen vier Vierteln gleichförmig und unabhängig vom Zeitpunkt der Inokulation der Pathogene statt. Nach diesem ersten Anstieg bewegten sich die Werte aller Probanden bis zum Versuchsende (Zeitpunkt Std. 3) auf vergleichbarem Niveau. Dies schließt eine Zellzahlerhöhung aufgrund der Pathogen-Inokulation aus.

Auch die ermittelten Gehalte an Fett, Eiweiß und Laktose in der Milch unterlagen den Gemelks-abhängigen Veränderungen. Wie in der Literatur beschrieben [131, 132] steigt der Fettgehalt im Endgemelk deutlich an, wohingegen die Konzentration an Protein und Laktose absinkt. Dies traf auch im Rahmen der Versuche der vorliegenden Arbeit im zur Std. 0 gewonnenen Endgemelk zu. Zum Ende der Versuche (Std. 3) konnten signifikante, aber nicht sehr deutliche Unterschiede im Gehalt der Milchinhaltsstoffe Fett, Eiweiß und Harnstoff Bakterien-inokulierter Viertel verglichen mit den Kontrollvierteln aufgezeigt werden (siehe 4.2.4). Diese konnten nur bei der Gruppe *Sa 3h* (n = 6) nachgewiesen werden, da die Anzahl gewonnener Milchproben in der Gruppe *Ec 3h* (n = 5) zu gering war, um signifikante Unterschiede zu ergeben. Es fanden sich jedoch keine Hinweise darauf, dass die beobachteten Veränderungen der Milchinhaltsstoffe zwischen den Eutervierteln der Gruppe *Sa 3h* in einem Zusammenhang mit der unterschiedlich langen Erregerpräsenz standen. Die biologische Relevanz der Unterschiede ist somit als fraglich zu bewerten.

Die Keimzahl in den während des Versuchs gewonnenen Milchproben stieg bei *E. coli* stärker als bei *S. aureus* und variierte zwischen den Zeitpunkten und Tieren stark (siehe 4.2.5). Das Wachstum konnte mittels der *ex vivo* gewonnenen Proben deshalb nur bedingt analysiert werden. Verantwortlich hierfür war das sich zunehmend verändernde Gesamtvolumen der Milch, welches jedoch während des 3-stündigen Versuchs nicht quantifiziert werden konnte. So konnte lediglich die Anzahl CFU/ml im jeweiligen Viertelanfangsgemelk bestimmt werden. Außerdem ist bekanntlich die Zahl der PMN im Residualgemelk relativ erhöht [131], wodurch von einer höheren Phagozytoserate auszugehen ist. Zudem kann *S. aureus* am Epithel adhären und sogar intrazellulär in Makrophagen und Epithelzellen überleben, was die Zahl der reisolierbaren Keime beeinflussen könnte [33, 34, 131]. In der vorliegenden Arbeit war es zwar möglich, die inokulierten Keime zu allen untersuchten Zeitpunkten *p. inoc.* in großer Zahl nachzuweisen. Man muss aber davon ausgehen, dass die Tiere nach dem Ausmelken sehr variabel Milch nachbilden und somit die inokulierten Pathogene in

unterschiedlichen Volumina verteilt waren. Weiterhin kamen hier sicher auch tierindividuelle Unterschiede in den Eigenschaften der Milch als Wachstumsmedium zum Tragen, die aus der Literatur bekannt sind [58]. Diese Annahme wurde vor allem auch durch die im Rahmen dieser Arbeit beobachteten Unterschiede beim bakteriellen Wachstum *in vitro* bestätigt (siehe 4.3.1). In diesen Experimenten streuten die ermittelten Werte zwar stark, zeigten aber dennoch für *E. coli* ein deutlich effizienteres Wachstum im Gegensatz zu *S. aureus*. Die zum Versuchsende ermittelten Keimzahlen in den unterschiedlich lang Bakterien-inokulierten Vierteln bestätigten diese Ergebnisse. *E. coli* vermehrte sich innerhalb der ersten 3 h nach Inokulation um durchschnittlich das 30-fache, während *S. aureus* nur eine geringe oder bei manchen Tieren auch keine Erhöhung der Keimzahl zeigte (siehe 4.2.5).

Fazit: Trotz strenger Auswahl der Modelltiere nach den Kriterien des standardisierten Tiermodells konnten tierindividuelle Unterschiede in Leukozytenzahl, Milchzusammensetzung und bakteriellem Wachstum zu Beginn und im Versuchsverlauf nicht vermieden werden. Eine Vorselektion der Tiere über die Werte bestimmter Milch-inhaltsstoffe und PMN-Zahlen in der Milch wäre denkbar. Außerdem könnte über genetische Selektion mittels Verwendung verwandter oder klonierter Tiere der natürlichen Varianz entgegengewirkt werden. Allerdings wäre die Bereitstellung geeigneter Modelltiere dann auch mit erheblich erhöhtem organisatorischem und finanziellem Aufwand verbunden, als es im vorliegenden Projekt der Fall war.

5.2 Expression immunrelevanter Kandidatengene nach experimenteller Infektion mit *E. coli* und *S. aureus*

Die Entwicklung der Entzündungserscheinungen bei einer Mastitis ist ein komplexer Prozess von Interaktionen zwischen Wirt und Pathogen. Zu den ersten messbaren Ereignissen auf Wirtsseite nach dem Eindringen von Mastitiserregern in das Euter sind Veränderungen in der Abundanz von mRNA-Transkripten für Gene endogener Mediatoren zu zählen. Ziel des vorliegenden Dissertationsprojektes war es, zunächst im Rahmen eines Pilotversuchs und mittels der dabei gewonnenen Gewebeproben, immunrelevante Gene der sehr frühen Wirt-Pathogen-Interaktion zu identifizieren. Mit Hilfe boviner Affymetrix-Microarray Chips konnte eine Vielzahl von regulierten Genen gefunden werden, darunter auch Gene, die in den untersuchten Lokalisationen unterschiedlich starke Änderungen der Expressionsraten erfuhren (siehe 4.1.1). In bisherigen Zellkulturmodellen sowie den wenigen Tier-Experimenten, die jeweils auf Kandidatengenanalysen basierten, konnte ebenfalls eine Fülle von differentiell

exprimierten Genen (DEG) identifiziert werden, die durch Stimulation mit *E. coli* und *S. aureus* reguliert werden [10, 12, 13]. In Anlehnung an diese Ergebnisse wurden die in den eigenen Hauptversuchen mittels qRT-PCR zu untersuchenden und quantifizierenden Kandidatengene ausgewählt.

Durch sequentielle Inokulation von drei der vier Viertel eines Versuchstieres konnte eine Zeitkinetik extrapoliert werden, welche einen Infektionsverlauf widerspiegeln sollte. Bruckmaier et al. (2005) versuchten den zeitlichen Verlauf einer Exposition des Euters mit LPS mittels wiederholter Entnahme von Biopaten aus dem Eutergewebe darzustellen [133]. Die durch die Biopatentnahme entstandenen Verletzungen würden jedoch die Ergebnisse durch massive Freisetzung von Entzündungsmediatoren verfälschen. Des Weiteren wäre die exakte Beprobung unterschiedlicher Lokalisationen der Milchdrüse durch Biopate nicht möglich gewesen, weshalb bewußt auf die Methode der Biopatentnahme verzichtet wurde.

Als Basisexpression wurde die mRNA-Expression des jeweiligen Gens in den unbehandelten Kontrollvierteln zum Ende des Versuchs definiert. Auch in vorhergehenden Studien wurde dies so gehandhabt [13, 14, 35], da so die Kontrolle im genetisch identischen Wirtsorganismus unter den gleichen Bedingungen vorbereitet werden kann. Da die einzelnen Euterviertel als selbständige physiologische Einheiten angesehen werden und eine Beeinflussung benachbarter Viertel im Sinne eines systemischen Effektes bislang erst nach 24-stündiger Erregerexposition im Euter nachgewiesen werden konnte [13, 35], stellte diese experimentelle Anordnung die Methode der Wahl dar.

5.2.1 *E. coli* induziert eine stärkere Wirtsimmunantwort als *S. aureus*

Es ist bekannt, dass *E. coli* eine weitaus stärkere Modulation der Genexpression in der infizierten Milchdrüse hervorruft als *S. aureus* [10, 134, 135]. Sowohl im Zellkulturmodell, als auch im Tiermodell konnten nach gleich langer Erregerexposition mit *E. coli* eine etwa 5 - 10mal größere Anzahl regulierter Gene detektiert werden, als mit *S. aureus* [10, 35, 114]. Allerdings wird beschrieben, dass die Erkennung beider Pathogene durch das lokale Immunsystem des Wirts sehr rasch und vergleichbar schnell geschieht, die Milchdrüsenepithelzellen nach Kontakt zu *E. coli* aber mit einer größeren Anzahl regulierter Gene reagieren. Eine pathogenspezifische Antwort scheint bereits in der ersten Stunde nach Erregerkontakt in die Wege geleitet zu werden, denn *E. coli* induziert zu diesem frühen Zeitpunkt bereits 10mal mehr Gene als *S. aureus* [10].

Möglicherweise sind eine wirtsseitig effizientere Erregererkennung gramnegativer Keime [12] oder aber auch erregerseitige Evasionsstrategien von *S. aureus* hierfür verantwortlich. Dies könnte eine Erklärung dafür sein, dass *S. aureus* eher chronische und koliforme Keime akute, transiente Infektionen verursachen [73, 130].

Im Rahmen der hier durchgeführten Versuche konnte zum ersten mal im Tiermodell die Regulation ausgewählter Gene nach 1- bis 3-stündiger Erregerexposition gezeigt werden. Zu beobachten waren um ein Vielfaches stärkere und teilweise schnellere Veränderungen in der Expression der ausgewählten Kandidatengene nach Inokulation von *E. coli* im Vergleich zu *S. aureus*. Dies wurde besonders bei der Betrachtung der untersuchten Chemokine und Zytokine deutlich: IL6, TNF, CXCL8 und CCL20, welche bekanntlich an der initialen Immunantwort auf bakterielle Infektionen beteiligt sind [12, 73, 136], wurden durch Inokulation von *E. coli* und *S. aureus* teilweise bereits nach 1-stündiger Erregeranwesenheit signifikant hochreguliert (siehe 4.2.7.1 und 4.2.7.2). Die beiden Chemokine CXCL8 und CCL20 erfuhren dabei die stärkste Regulation: Während *S. aureus* eine Hochregulation von CXCL8 um maximal den Faktor 7 und von CCL20 um den Faktor 80 bewirkte, konnte nach experimenteller Infektion mit *E. coli* eine Expressionssteigerung um über das 160-fache für CXCL8 und das 300-fache für CCL20 in den beiden distalen Euterkompartimenten (ZZ, DZ) gemessen werden.

Es ist bekannt, dass die proinflammatorischen Zytokine IL6 und TNF durch beide eingesetzten Pathogene hochreguliert werden [10, 130, 134]. Im Zellkulturmodell und auch nach intramammärer Inokulation geschieht dies bei *S. aureus* aber stark verzögert und abgeschwächt, wohingegen *E. coli* eine prompte und vergleichsweise starke mRNA-Expressionssteigerung bewirkt [10, 130, 134]. Dies konnte für *E. coli* in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden: IL6 und TNF wurden schon nach 1-stündiger Erregerpräsenz signifikant durch Exposition mit *E. coli* hochreguliert. Allerdings konnte ein ähnliches Muster auch für die mit *S. aureus* inokulierte Versuchsgruppe (**Sa 3h**) dokumentiert werden. Die Expressionsänderung erreichte mit einer Steigerung um maximal das 10-fache für IL6 und das 5-fache für TNF jedoch nicht annähernd die gleiche Intensität wie in der Gruppe **Ec 3h** (siehe 4.2.7.1). In dieser Versuchsgruppe erfuhr IL6 eine Hochregulation um durchschnittlich den Faktor 300 und TNF um den Faktor 30. Bemerkenswerterweise zeigte TNF nach 1-stündiger Exposition mit *E. coli* einen prompten Anstieg der mRNA-Abundanzen bei allen Tieren und eine gleichförmige Herabregulation zwischen 1- und 2-stündiger Erregerpräsenz. Dieser Effekt konnte im Zellkulturmodell nach Stimulation mit einer hohen Dosis *E. coli* sowohl für

TNF als auch für CXCL8 dargestellt werden [104]. Die Anzahl der mRNA-Transkripte scheint sich im zeitlichen Verlauf bei einer allgemeinen Heraufregulation bestimmter Gene wellenförmig zu verhalten.

Für S100A9 und LAP konnte eine deutliche Regulation nur nach Inokulation mit *E. coli* festgestellt werden (siehe 4.2.7.3 und 4.2.7.4). Diese antimikrobiellen und chemotaktisch wirkenden Proteine sind den Zytokinen IL6 und TNF zeitlich nachgeschaltet und werden *in vitro* durch Stimulation mit *E. coli* schnell und stark in ihrer Expression verstärkt, während sie durch *S. aureus* erst bedeutend später reguliert werden [10, 73]. Die Ergebnisse decken sich mit denen der vorliegenden Arbeit: S100A9 wurde nach experimenteller Infektion mit *E. coli* bereits nach 1-stündiger, LAP nach 2-stündiger Erregerexposition signifikant hochreguliert. Dagegen fiel die Reaktion auf die Inokulation mit *S. aureus* sehr schwach aus. Hier konnte im Beobachtungszeitraum allenfalls erst nach 3-stündiger Erregerpräsenz eine signifikant erhöhte Expression von S100A9 gemessen werden. Das β -Defensin LAP wurde in mit *S. aureus* inokulierten Eutervierteln nicht reguliert. Dieser Sachverhalt könnte zur Folge haben, dass *S. aureus* in der frühen Phase der Interaktion mit dem Wirt nicht durch antibakterielle Effektormoleküle eliminiert wird, woraus letztendlich eine persistente Infektion resultiert [10].

LCN2, welches die Eisenaufnahme der Bakterien verhindert, sowie die GTPase MX2 und das Phase-I-Enzym CYP1A1 wurden dagegen durch beide Mastitispathogene nicht nennenswert reguliert (siehe 4.2.7.5). Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen aus Versuchen im Zellkulturmodell mit pbMEC, bei denen eine signifikante mRNA-Expressionssteigerung von CYP1A1 durch *S. aureus* und *E. coli* bereits nach 1-stündiger Erregerpräsenz verzeichnet werden konnte [10]. MX2 wird Zellkultur-Studien zufolge erst ab 6 – 24 h nach der Inokulation reguliert [10, 84]. Möglicherweise war in unserem Tiermodell die Versuchsdauer also zu kurz, um eine Regulation von MX2 zu erfassen. Obwohl Genini et al. (2011) von einer Hochregulation von LCN2 nach experimenteller Infektion mit *E. coli* und einer Herabregulation bei Inokulation von *S. aureus* berichten [135], konnte dies im Rahmen der durchgeführten Versuche nicht bestätigt werden.

Insgesamt konnten in der vorliegenden Arbeit mehr Gene identifiziert werden, die durch *S. aureus* eine Expressionssteigerung erfuhren, als dies in Zellkulturmodellen und den wenigen Tiermodellen der Fall war. Verantwortlich hierfür könnte die vergleichsweise hohe Inokulationsdosis von $5 \cdot 10^6$ CFU/ml sein, welche die Wirtsantwort im Gegensatz

zu anderen Modellen mit geringerer Dosis beschleunigte und verstärkte [51]. Die bei mit *S. aureus* inokulierten Tieren beobachtete interindividuelle Heterogenität der Regulation einzelner Gene konnte bereits in vorhergehenden sequentiellen Infektionsmodellen festgestellt werden und erschwerte Rückschlüsse auf die Kinetik dieser Gene [10, 35]. Eine klare statistisch signifikante Heraufregulation konnte jedoch für die Gruppe der untersuchten Zytokine (IL6, TNF) und Chemokine (CCL20, CXCL8) gezeigt werden (siehe 4.2.7.1 und 4.2.7.2). Die gemessenen Expressionsänderungen in der Versuchsgruppe *Ec 3h* in den distalen Euterkompartimenten (ZZ, DZ) verliefen sehr homogen. Zumeist reagierten alle sechs Tiere der Gruppe mit einem identischen Verlaufsmuster. In beiden Versuchsgruppen konnten außerdem für einzelne Gene im ventralen Euterparenchym tierindividuell unterschiedlich hohe Expressionsebenen mit starker Streuung der ermittelten Werte zu den entsprechenden Zeitpunkten aufgezeigt werden. Dies war allerdings nur in dieser Lokalisation und für die Gene LAP und LCN2 in beiden Versuchsgruppen (siehe 4.2.7.4 und 4.2.7.5) sowie in der Gruppe *Sa 3h* für TNF und CXCL8 (siehe 4.2.7.1 und 4.2.7.2) zu beobachten. Das lässt vermuten, dass die genannten Gene im Parenchym tierindividuell unterschiedlich hoch konstitutiv exprimiert werden.

Da es sich in der vorliegenden Arbeit um ein sequentielles Mastitismodell handelt, ist zu überlegen, ob sich die infizierten Viertel gegenseitig beeinflussten. Aufgrund der Tatsache, dass die einzelnen Euterviertel als selbständige physiologische Einheiten angesehen werden können und eine Beeinflussung benachbarter Viertel im Sinne eines systemischen Effektes erst nach 24-stündiger Infektion nachweisbar ist [13, 35], war davon auszugehen, dass die Ergebnisse des vorliegenden Projektes nicht durch die sequentielle Inokulation beeinflusst wurden. Bei vergleichender Betrachtung der Expressionsprofile in den Kontrollvierteln der beiden Versuchsgruppen stellte sich heraus, dass die Basisexpressionen der nicht inokulierten Kontrollviertel von CXCL8 (DZ) und CCL20 (DZ, EU) in der Versuchsgruppe *Ec 3h* signifikant erhöht waren (siehe 4.2.7.2). Dies deutet darauf hin, dass die Inokulation eines benachbarten Viertels mit *E. coli* bereits Auswirkungen auf die Expression von Chemokinen im Kontrollviertel hatte, auch wenn diese mRNA-Expressionsänderung noch vergleichsweise gering ausfiel. Daraufhin wurden die Basisexpressionen beider Gruppen nochmals mit den Werten von „Goldstandardtieren“, die denselben Auswahlkriterien entsprachen verglichen [120]. Dabei konnte sowohl für *Ec 3h*, als auch *Sa 3h* zum Versuchsende eine erhöhte Basisexpression von CXCL8 in den nicht mit Bakterien

exponierten Vierteln festgestellt werden. Bei CCL20 dagegen fand nur in der Gruppe *Ec 3h* eine mRNA-Expressionssteigerung in den Kontrollvierteln statt. Die Werte der Gruppe *Sa 3h* entsprachen für dieses Chemokin den nicht exponierten „Goldstandardtieren“. Auch wenn die molekularbiologischen Untersuchungen der „Goldstandardtiere“ bereits 3 Jahre zuvor erfolgt waren, was sicherlich die Vergleichbarkeit der Ergebnisse erschwert, so ist eine Beeinflussung der Chemokinexpression im Sinne eines wie bei Petzl et al. (2008) und Mitterhuemer et al. (2010) beschriebenen „Cross-talks“ zwischen den Vierteln eines Tieres nicht auszuschließen [13, 35]. Um diesen Effekt zu verhindern, müsste ein Mastitismodell entwickelt werden, bei dem nur ein Viertel inokuliert und auf ein Kontrollviertel innerhalb des Tieres verzichtet wird, was dann den Einsatz von Versuchstieren vervierfachen würde. Für LCN2 war die Basisexpression in der ZZ der Kontrollviertel innerhalb der Gruppe *Sa 3h* schwach signifikant erhöht. Fast alle Tiere zeigten dabei eine geringfügig höhere mRNA-Expression von LCN2 als die Tiere innerhalb der Gruppe *Ec 3h*. Allerdings ist die biologische Relevanz dieses signifikanten Unterschiedes als fraglich zu bewerten.

5.2.2 Immunrelevante Kandidatengene werden innerhalb der ersten drei Stunden nach Pathogen-Inokulation überwiegend in distalen Bereichen des Euters reguliert

In die Milchdrüse eindringende Pathogene gelangen in der Regel über den Strichkanal zunächst in die Zitzen- und Drüsenzisterne. Da diese Kompartimente die ersten epithelialen Oberflächen darstellen, die mit den Mastitiserregern in Kontakt kommen, wird ihnen eine bedeutende Rolle bei der initialen Immunreaktion zugesprochen. Rinaldi et al. (2009) untersuchten Genexpressionsmuster in der akuten Phase (12 und 24 h nach Infusion von *E. coli*) in verschiedenen Kompartimenten der Milchdrüse (Fürstenberg'sche Rosette, Zitzenzisterne, Drüsenzisterne und Drüsenparenchym). Dabei konnte nach 12-stündiger Erregerpräsenz in ZZ und DZ die stärkste Antwort auf Transkriptomebene gemessen werden; das Drüsenparenchym zeigte erst nach 24 h Veränderungen in der Genexpression [14]. Besonders CCL20, welches eine wichtige Rolle an Kontaktflächen zwischen Organismus und Umwelt zu spielen scheint [82], und CXCL8 wurden nach 12-stündiger Stimulation mit *E. coli* im Gewebe der ZZ und DZ stark hochreguliert. Wie in der genannten Studie beschrieben, konnte auch in der vorliegenden Arbeit festgestellt werden, dass die Expressionsmodulation von Genen nach experimenteller Infektion mit *E. coli* und *S. aureus* lokalisationspezifisch erfolgt. Dabei scheinen die distalen Kompartimente ZZ und DZ dem ventralen Euterparenchym

vorgeschaltet zu sein. Die Expressionsmuster verliefen in den beiden distalen Kompartimenten zumeist recht gleichförmig. CCL20 und CXCL8 zeigten dort besonders rasche und sehr starke mRNA-Expressionssteigerungen (siehe 4.2.7.2). Aber auch die Zytokine IL6 und TNF sowie S100A9 wurden in den distalen Kompartimenten massiv hochreguliert (siehe 4.2.7.1 und 4.2.7.3). Möglicherweise wird dadurch die Migration der PMN in die Zisternen und großen Milchgänge des Euters und die Eliminierung der Erreger unmittelbar eingeleitet, während das Euterparenchym eine nachgeschaltete Funktion in der Immunabwehr hat [14]. Im Rahmen der durchgeführten Versuche konnte sowohl für die Gruppe *Ec 3h*, als auch die Gruppe *Sa 3h* keine nennenswerte Genregulation innerhalb der ersten 3 h *p. inoc.* im EU beobachtet werden.

Beim Vergleich der unterschiedlichen Lokalisationen in den Kontrollvierteln konnte im EU eine zumeist niedrigere Basisexpression als in der ZZ und DZ festgestellt werden. ZZ und DZ dagegen lagen in ihrer Grundexpression nah beieinander und es konnte in der Gruppe *Ec 3h* meist kein signifikanter Unterschied zwischen den Basisexpressionen der beiden Kompartimente ausgemacht werden (siehe Tabelle 20). Ob die sehr geringen Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen eine biologische Relevanz haben oder aber auf tierindividuellen Unterschieden beruhen, könnte jedoch nur anhand einer erhöhten Anzahl beprobter Tiere geklärt werden.

Fazit: Eine kompartmentabhängige und pathogenspezifische Regulation ausgewählter Kandidatengene konnte bereits nach 1-stündiger Erregerexposition festgestellt werden. Nach Inokulation von *E. coli* wurde ein Großteil der untersuchten Gene in ZZ und DZ prompt und sehr stark hochreguliert. Auch nach Exposition mit *S. aureus* konnte eine rasche, jedoch deutlich schwächere gleichsinnige Regulation einiger Kandidatengene in den distalen Kompartimenten aufgezeigt werden.

5.3 Untersuchungen zur Adaptation von *E. coli*₁₃₀₃ und *S. aureus*₁₀₂₇ an das Wachstum in Milch

Da sich das Wachstum der beiden im Tierversuch eingesetzten Pathogene *in vivo* nur unzureichend kontrollieren ließ (siehe 4.2.5), wurde ein *in vitro*-Versuch zum Wachstum beider Pathogene in Milch durchgeführt. Hierbei sollte einerseits das Wachstum von *E. coli* und *S. aureus* verglichen werden und andererseits untersucht werden, ob eine Vorinkubation in Milch eine Adaptation an das spezifische Umgebungsmilieu hervorruft und so eine beschleunigte Vermehrung nach Überführung in Milch erreicht werden kann. Hieran sollte die Entscheidung geknüpft werden, ob die

Tiere im Rahmen der Tierversuche mit Pathogenen inokuliert werden sollten, die zuvor bereits in Milch kultiviert waren oder ob wie bisher [13, 35] die Inokulationsdosis durch Vermehrung in Medium hergestellt werden sollte. Da hohe Zellzahlen in der Milch das Wachstum von *E. coli in vitro* hemmen [7], wurde nur niedrigzellige Milch ($< 5 \cdot 10^4$ Zellen/ml) der standardisierten Modelltiere verwendet.

Kommt es zu einer Infektion der Milchdrüse mit Mastitiserregern, so müssen sich die Keime zunächst an die neuen Umgebungsbedingungen gewöhnen ehe sie mit der Replikation beginnen können. Erst nach Überwindung der sogenannten Latenzphase können die Pathogene in die logarithmische Wachstumsphase übertreten [15, 31]. Im Euter finden die Bakterien fast anaerobe Bedingungen vor. Die Milch stellt außerdem durch die Fülle bakterizider humoraler und zellulärer Faktoren kein optimales Wachstumsmedium dar [8, 15, 80]. Es ist bekannt, dass *E. coli* und *S. aureus* in Milch langsamer wachsen als in standardisiertem Medium [7]. Außerdem kommen, wie bei Kornalijnslijper et al. (2004) beschrieben, tierindividuelle Unterschiede zum Tragen. So variiert die Milchzusammensetzung von Kuh zu Kuh, was unterschiedliche Wachstumsbedingungen schafft [7, 58]. Die pathogenspezifischen und tierindividuellen Unterschiede konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit *in vivo* (siehe 4.2) und *in vitro* (siehe 4.3) bestätigt werden. Nach 14-stündiger Inkubation von *E. coli* in keimfreier Vollmilch konnten durchschnittlich $1,2 \cdot 10^9 \pm 2,5 \cdot 10^8$ CFU/ml (MW \pm SD) nachgewiesen werden, wohingegen *S. aureus* nur Keimzahlen von $5,3 \cdot 10^8 \pm 8,9 \cdot 10^8$ CFU/ml (MW \pm SD) erreichte. Besonders in den Ansätzen mit *S. aureus* mussten erhebliche Schwankungen und eine starke Streuung in den ermittelten Keimzahlen hingenommen werden. Diese kamen unter Umständen dadurch zustande, dass *S. aureus* dazu neigt, sich in Haufen aneinanderzulagern [52, 54, 55], was die exakte Ermittlung von CFU/ml erschwert. Auch konnte im mikroskopischen Bild eine massive Anlagerung von *S. aureus*₁₀₂₇ an Fettmizellen der Milch beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Insgesamt bestätigte sich im Rahmen der durchgeführten Versuche, dass die Pathogene nach der Überführung in frisches Medium eine Latenzphase durchlaufen, in der zunächst keine messbare Vermehrung stattfand oder teilweise die Keimzahlen sogar zurückgingen. Die Dauer, in der dieser Anpassungsprozess geschieht, hängt nicht nur von wirtsseitigen Faktoren ab. Auch die Pathogene selbst können ihre Eigenschaften auf Proteom- und Genomebene je nach Umgebung ändern und sich so adaptieren. Ziel dabei ist es, Ernährung und Vermehrung sicherzustellen und die Adhäsion, Invasion und

Gewebeschädigung voranzutreiben, was den Ausgang und die Schwere der Infektion mitbestimmen kann [7, 15, 31].

Durch Vorinkubation in Milch oder LB-Medium sollte den Pathogenen die Möglichkeit gegeben werden, sich während der Inkubation an das Medium anzupassen. So konnte bei Lippolis et al. (2009) nach 24-stündiger Inkubation von *E. coli* in Milch eine veränderte Regulation hunderter Proteine nachgewiesen werden; eine Steigerung der Virulenz wurde vermutet [15]. In einer Studie von Mamo et al. (1991) wurde eine erhöhte Virulenz von *S. aureus* im Maus-Mastitismodell nach Inkubation in Milch aufgezeigt [32]. Im vorliegenden Dissertationsprojekt konnte bei Gegenüberstellung der Wachstumsraten der beiden Versuchsgruppen allerdings kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden (siehe 4.3.2).

Fazit: Eine Adaptation an das Medium Milch fand innerhalb der 14-stündigen Vorinkubation in Vollmilch nicht in dem Sinne statt, als dass dadurch das Wachstum beider Pathogene beeinflusst worden wäre. Möglicherweise nehmen Vorgänge im Sinne einer „Nischenadaptation“ an das Euter mehr Zeit in Anspruch. Dies aufzuklären würde Proteom- und Genomweite Untersuchungen von Mastitis-Pathogenen und modifizierten Mutanten in Langzeit-Infektionsmodellen erfordern. Sowohl das Ausbleiben eines messbaren Wachstumsvorteils nach Vorinkubation in Milch als auch die vergleichsweise stärkeren Schwankungen der Keimzahl in Milch im Gegensatz zu Medium führten zu der Entscheidung, die Inokulationsdosis weiterhin in Medium zu kultivieren. Dies garantierte eine wiederholbar genaue Anzahl an CFU/ml für die Inokulationsdosis.

5.4 Schlussbetrachtung

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass es gelungen ist, ein aussagekräftiges Tiermodell zur Untersuchung initialer Wirt-Pathogen-Interaktionen nach intramammärer Inokulation mit Mastitiserregern zu etablieren. Erstmals war es möglich, durch sequentielle Inokulation eine Zeitkinetik transkriptioneller Veränderungen während der sehr frühen Phase einer Infektion (1-3 h *p.inoc.*) zu simulieren und dabei verschiedene Lokalisationen innerhalb eines Euterviertels zu untersuchen. Durch sorgfältige Auswahl der Versuchstiere und der zu untersuchenden immunrelevanten Kandidatengene konnte ein Einblick in grundlegende Mechanismen der Immunabwehr in der bovinen Milchdrüse gewonnen werden. Hierbei wurde deutlich, dass epitheliale Oberflächen der Zitzen- und Drüsenzisterne eine frühe Wächterfunktion übernehmen und in ihrer Reaktion dem Drüsenparenchym vorgeschaltet sind. Außerdem stellten

Veränderungen in der mRNA-Expression von Chemokinen wie CXCL8 und CCL20 die ersten messbaren Ereignisse auf Transkriptomebene nach Inokulation von *E. coli* oder *S. aureus* dar. Diese Faktoren scheinen somit eine herausragende Rolle bei der Initiierung der Immunabwehr im Euter zu spielen. Das im Rahmen dieser Dissertation etablierte Mastitismodell sowie die über dieses Projekt hinausgehende Asservierung einer umfangreichen Sammlung von Probenmaterial bilden die Grundlage für weitere holistische Ansätze im Gesamtkonzept der Mastitisforschung innerhalb der hiesigen Arbeitsgruppe und ihrer Kooperationspartner. Des Weiteren ebnet die Erkenntnisse über derartige Interaktionen zwischen Wirt und Pathogen in der frühen Phase der Infektion den Weg für die Entwicklung neuer Ansätze in der Mastitisbekämpfung. Die Möglichkeit, Milchkühe vor den Folgen einer Mastitis zu schützen würde einen erheblichen Fortschritt in Sinne des Tierschutzes bedeuten, da somit Schmerzen und Leiden der Tiere verhindert werden könnten. Zielgerichtete innovative Forschung im Bereich der Mastitisprävention dient auch der Bereitstellung hochwertiger, bedenkenloser Lebensmittel im Sinne des Verbraucherschutzes. Nicht zu unterschätzen ist dabei die Sicherung der Wettbewerbsfähigkeit landwirtschaftlicher Betriebe auf einem zunehmend globalisierten Markt für Milch und Milchprodukte.

6 Zusammenfassung

Die Mastitis des Rindes ist die wirtschaftlich bedeutendste Einzeltierkrankung in der Milchwirtschaft. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) und *Escherichia coli* (*E. coli*) zählen zu den wichtigsten Mastitiserregern, die jedoch zumeist sehr unterschiedliche Krankheitsbilder hervorrufen. So verursacht *E. coli* hauptsächlich transiente, akute klinische Mastitiden, während *S. aureus* als bedeutendster Verursacher chronischer bis subklinischer Mastitiden mit persistierendem Verlauf angesehen wird.

In den letzten Jahrzehnten wurde die Pathophysiologie der entzündeten Milchdrüse eingehend wissenschaftlich bearbeitet. Frühe Zeitpunkte einer intramammären Infektion, zu denen die Pathogene zwar bereits erkannt wurden, aber noch keine klinischen Symptomen in Erscheinung getreten sind, wurden bislang *in vivo* noch nicht untersucht. Zu den ersten wirtsseitigen Ereignissen nach dem Eindringen und Erkennen der Pathogene zählen Veränderungen in der Abundanz von mRNA-Transkripten immunrelevanter Gene. Vertreter dieser differentiell exprimierten Gene gehören z.B. zu den Zytokinen, Chemokinen und antimikrobiellen Peptiden. Diese sollen es dem Wirt ermöglichen, eine adäquate Immunantwort zu initiieren, welche als entscheidend für den klinischen Verlauf der Erkrankung gilt.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Tiermodell zur Simulation der ersten 3 h nach dem Eindringen der Pathogene *E. coli* und *S. aureus* in das Euter etabliert. Das Hauptaugenmerk lag hierbei auf der Untersuchung von Expressionsänderungen ausgewählter Kandidatengene nach unterschiedlich langer Erregerexposition (1-3 h) in verschiedenen Kompartimenten der Milchdrüse. Dabei wurden die Lokalisationen Zitenzisterne (ZZ), Drüsenzisterne (DZ) und das ventrale Euterparenchym (EU) näher untersucht. Großes Augenmerk lag auf einer strengen Standardisierung der Versuchstiere, um die Vergleichbarkeit der erzielten Ergebnisse sicherzustellen. Der Versuch umfasste 12 erstlaktierende Kühe der Rasse Holstein-Friesian mit makelloser Allgemein- und Eutergesundheit und einer Zellzahl $< 50.000/\text{ml}$ Milch in allen 4 Eutervierteln. Bei den Tieren wurden 3 Euterviertel jeweils sequentiell über einen Zeitraum von 1, 2 und 3 h entweder mit $5 \cdot 10^6$ CFU *E. coli*₁₃₀₃ (n = 6) oder *S. aureus*₁₀₂₇ (n = 6) intrazisternal inokuliert. Ein Kontrollviertel blieb unbehandelt und diente der Ermittlung von Basisexpressionswerten. Mit Hilfe der unterschiedlich lange inokulierten Viertel konnte ein zeitlicher Verlauf der Expressionsänderungen ausgewählter Kandidatengene extrapoliert werden.

Wie erwartet traten innerhalb des dreistündigen Versuchszeitraumes keinerlei klinische Effekte bei den Versuchstieren auf. Die innere Körpertemperatur, der Leukozytengehalt im Blut, der SCC und verschiedene Milchhaltsstoffe erfuhren keine Veränderungen, die auf die Pathogen-Exposition zurückzuführen waren. Durch wiederholte Untersuchung von Milchproben im Versuchsverlauf wurde die bakterielle Vermehrung analysiert. Hierbei konnte eine Vervielfachung von *E. coli* um durchschnittlich das 30-fache festgestellt werden, wohingegen sich *S. aureus* innerhalb der ersten 3 h *p. inoc.* vergleichsweise schwach vermehrte (durchschnittlich 1,8-fach).

Die beiden im Tiermodell verwendeten Bakterienstämme wurden parallel *in vitro* in Milch und in Nährmedium kultiviert, um deren Wachstum und Adaptationsfähigkeit zu untersuchen. *E. coli* erreichte nach 14-stündiger Inkubation in Milch ein Maximum von $1,2 \cdot 10^9 \pm 2,5 \cdot 10^8$ CFU/ml (MW \pm SD), während *S. aureus* mit $5,3 \cdot 10^8 \pm 8,9 \cdot 10^8$ CFU/ml (MW \pm SD) eine deutlich schwächere und heterogenere Vermehrung zeigte. Im Anschluss an diese Vorinkubation in Vollmilch wurde untersucht, ob sich die Pathogene an das spezifische Wachstumsmedium Milch anpassen konnten. Nach Umsetzen in frische Vollmilch zeigten die Pathogene jedoch kein verbessertes und beschleunigtes Wachstum im Vergleich zu in standardisiertem Medium vorkultivierten Bakterien. Um die Vergleichbarkeit mit früheren Experimenten sicherzustellen, wurden *E. coli* und *S. aureus* deshalb mit Nährmedium für die *in vivo*-Versuche präpariert.

Drei Stunden nach Inokulation des ersten Euterviertels wurden die Tiere getötet und Gewebeproben innerhalb von 20 min aus den drei zu untersuchenden Lokalisationen (ZZ, DZ, EU) der einzelnen Euterviertel gewonnen. Die Proben wurden unmittelbar nach Entnahme in Stickstoff schockgefroren und bis zur Aufarbeitung bei -80°C tiefgefroren. Im Rahmen weiterer Untersuchungen fand dann die mRNA-Extraktion sowie die Analyse der Transkript-Abundanzen entzündungsrelevanter Kandidatengene (IL6, TNF, CXCL8, CCL20, S100A9, LAP, LCN2, MX2 und CYP1A1) mittels qRT-PCR statt. Die Auswahl geeigneter Gene erfolgte sowohl anhand eines orientierenden Vorversuchs *in vivo* als auch anhand bekannter, in vergleichbaren *in vitro*-Experimenten regulierten Genen der Milchdrüsenepithelzelle.

Es konnte gezeigt werden, dass die Expressionsänderungen nach Kontakt mit *E. coli* deutlich stärker und homogener ausfielen als nach Kontakt mit *S. aureus*. Bereits nach 1-stündiger Erregerexposition konnten signifikante Steigerungen der mRNA-Expression einiger Gene verzeichnet werden. Dies galt vor allem für die Chemokine CCL20 und CXCL8 sowohl nach Exposition mit *E. coli*, als auch mit *S. aureus*. Für die Zytokine

IL6 und TNF konnte eine rasche mRNA-Expressionssteigerung nach 1-stündiger intramammärer Inokulation von *E. coli* nachgewiesen werden, während eine Regulation im Euter mit *S. aureus* inokulierter Tiere erst nach 2 h und vergleichsweise schwächer eintrat. Die antibakteriell wirkenden Faktoren S100A9 und LAP waren den Chemokinen und Zytokinen zeitlich nachgeschaltet, wurden aber nur nach Exposition mit *E. coli* deutlich hochreguliert. Im Gegensatz zu *in vitro*-Untersuchungen mit Milchdrüsenepithelzellen konnte für die Gene LCN2, MX2 und CYP1A1 keine nennenswerte Regulation nach Inokulation mit *E. coli* und *S. aureus* festgestellt werden. Des Weiteren fiel auf, dass die untersuchten Kandidatengene invariant stärker in ZZ und DZ heraufreguliert wurden, als im EU. Meist ähnelten sich ZZ und DZ in Stärke und Verlauf der Expressionsänderung. Im ventralen Euterparenchym dagegen konnte nach Inokulation von *E. coli* nur für die Gene IL6, TNF, CXCL8 und S100A9 eine vergleichsweise schwache, aber statistisch signifikante Steigerung der mRNA-Expression aufgezeigt werden. Nach Inokulation mit *S. aureus* konnte in dieser Lokalisation keine Hochregulation der untersuchten Kandidatengene festgestellt werden.

Das in dieser Arbeit etablierte Tiermodell zeigt erstmalig *in vivo* die frühe pathogenspezifische und kompartimentabhängige Regulation immunrelevanter Gene im Eutergewebe der Milchkuh auf. Es bietet damit eine gute Basis für holistische Ansätze zur Untersuchung sehr früher Ereignisse bei der Wirt-Pathogen-Interaktion. Mittelfristig soll hiermit aufgeklärt werden, welche wirts- und pathogenseitigen Mechanismen zur Entstehung akuter und chronischer Mastitiden führen und welche Faktoren persistente Infektionen der Milchdrüse fördern oder verhindern. Detaillierte Kenntnisse über solche frühen Ereignisse ebnen den Weg, Ansätze für eine verbesserte Mastitis-Diagnostik, -Prophylaxe und -Therapie bei der bovinen Mastitis zu finden.

Gefördert im Rahmen des DFG-Projektes FOR 585

7 Summary

Mastitis is a frequent and costly disease in dairy industry. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) and *Escherichia coli* (*E. coli*) are among the most important mastitis-causing agents. However, their clinical appearance differs considerably: *E. coli* principally causes transient acute clinical mastitis, whereas intramammary *S. aureus* infections elicit subclinical inflammation and persistent infections.

Mastitis-research during the last decades has closely examined the pathophysiology of the inflamed mammary gland. Early stages of intramammary infection, in which pathogens have already been recognized but no clinical signs have yet appeared, have up until now not been examined *in vivo*. Among the first host-associated events after pathogen-invasion and -recognition are changes in the abundance of mRNA transcripts of immune-relevant genes. Differentially expressed genes in early stages of infection mostly code for cytokines, chemokines and antimicrobial peptides. These factors combined allow the host to initiate an appropriate immune response, which is considered to determine the clinical course of infection.

The aim of this study was to establish an animal model to simulate the first 3 h after intramammary invasion of *E. coli* and *S. aureus*. The main focus was the examination of changes in the expression profiles of selected candidate-genes in different compartments of the udder. The following localizations were sampled for further analysis: teat cistern (ZZ), gland cistern (DZ) and ventral udder parenchyma (EU). A strict standardization of the animals was crucial in order to guarantee comparability of results. The experiments included 12 first-lactating Holstein-Frisian cows with excellent general and udder health. Milk somatic cell count was < 50,000/ml milk in all udder quarters. Three of four quarters per animal were sequentially inoculated intracisternally with either 5×10^6 CFU *E. coli* (n = 6) or *S. aureus* (n = 6) for 1, 2 and 3 h. One control quarter remained untreated and was used for measuring baseline expression values. By varying the duration of exposure, it was possible to extrapolate a time course of alterations in the mRNA-expression of immune-relevant genes.

As expected the animals did not show any clinical symptoms throughout the 3 h of the experiment: No changes in rectal temperature, blood leukocyte counts, somatic cell count and various milk components which were related to the pathogen exposure were detected. Bacterial growth was assessed by repeated examination of milk samples from sequentially inoculated quarters. A mean 30-fold multiplication was observed in plate

counts of *E. coli*-cultures, whereas bacterial counts of *S. aureus* increased only very slightly (mean 1.8-fold).

In order to examine their growth and adaption capability both bacterial strains used in the model were also cultivated *in vitro* in whole milk and culture medium. *E. coli* reached bacterial counts of $1.2 \cdot 10^9 \pm 2.5 \cdot 10^8$ CFU/ml (Mean \pm SD) after 14 h of incubation in milk whereas *S. aureus* showed a considerably lower growth rate and more heterogeneous growth-pattern ($5.3 \cdot 10^8 \pm 8.9 \cdot 10^8$ CFU/ml [Mean \pm SD]). This pre-incubation in whole milk was followed by the analysis of the pathogens' capacity to adapt to the specific growth-medium milk. After being transferred into fresh milk, however, pathogens did not show any increased and accelerated growth compared to bacteria which had been pre-cultivated in standardized medium. To ensure comparability to previous studies, pathogens therefore were cultivated in culture medium for the *in vivo* experiments.

Animals were culled three hours after inoculation of the first udder quarter, and tissue samples from the three localizations (ZZ, DZ, EU) were taken within the following 20 min. Immediately after collection samples were snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until further processing. Then mRNA-extraction and analysis of transcript-abundance of selected immune-relevant candidate-genes (IL6, TNF, CXCL8, CCL20, S100A9, LAP, LCN2, MX2 and CYP1A1) were assessed by qRT-PCR. A pilot experiment *in vivo* as well as early regulated genes that could previously be detected *in vitro* in mammary epithelial cells served to define appropriate candidate-genes.

It was found that, for the examined genes, *E. coli* induced a much stronger and more homogenous up-regulation of mRNA concentrations, while *S. aureus* elicited a weaker and, to some extent, retarded response. After 1 h of intramammary pathogen presence, a large increase in the expression of several genes could already be observed. This particularly applied to the chemokines CCL20 and CXCL8 after exposure to *E. coli* as well as to *S. aureus*. The cytokines IL6 and TNF were also rapidly and strongly up-regulated after 1 h of intramammary inoculation with *E. coli*, while *S. aureus* inoculation only triggered a comparatively lower regulation 2 h from pathogen-exposure on. The antimicrobial effector molecules S100A9 and LAP were only regulated after exposition with *E. coli* and appeared to be downstream genes compared to those chemokines and cytokines. In contrast to investigations on mammary epithelial cells *in vitro*, no apparent regulation could be detected for the genes LCN2, MX2 and CYP1A1 after experimental intramammary inoculation with *E. coli* and *S. aureus*.

In addition, a consistently stronger induction of candidate-genes could be observed in distal compartments of the udder (ZZ, DZ) compared to ventral parenchyma (EU). In the majority of observations ZZ and DZ resembled in intensity and in the course of mRNA-expression alterations. In EU only a comparatively weak but statistically significant regulation could be detected for the genes IL6, TNF, CXCL8 and S100A9 after being exposed to *E. coli* whereas *S. aureus* failed to provoke up-regulation in this localization.

This newly established short-term mastitis model allowed to show early pathogen-specific and compartment-dependent regulation of immune-relevant genes in the udder tissue of dairy cows for the first time. It thus provides a solid basis for holistic approaches to the research of very early events during the interaction of host and pathogen. This shall clarify which mechanisms in host and pathogen lead to the development of acute and chronic mastitis and elucidate which factors may support or prevent infections of the mammary gland. Detailed knowledge about these early mechanisms paves the way for advanced diagnosis, prophylaxis and treatment of bovine mastitis.

Funded by German Research Foundation (DFG FOR 585)

8 Literaturverzeichnis

1. Bradley, A.J., et al., *Survey of the incidence and aetiology of mastitis on dairy farms in England and Wales*. Vet Rec, 2007. **160**(8): p. 253-7.
2. Bradley, A., *Bovine mastitis: an evolving disease*. Vet J, 2002. **164**(2): p. 116-28.
3. Seegers, H., C. Fourichon, and F. Beaudeau, *Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds*. Vet Res, 2003. **34**(5): p. 475-91.
4. Halasa, T., et al., *Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: a review*. Vet Q, 2007. **29**(1): p. 18-31.
5. Blosser, T.H., *Economic losses from and the national research program on mastitis in the United States*. J Dairy Sci, 1979. **62**(1): p. 119-27.
6. Sutra, L. and B. Poutrel, *Virulence factors involved in the pathogenesis of bovine intramammary infections due to Staphylococcus aureus*. J Med Microbiol, 1994. **40**(2): p. 79-89.
7. Kornalijnslijper, J.E., et al., *Bacterial growth during the early phase of infection determines the severity of experimental Escherichia coli mastitis in dairy cows*. Vet Microbiol, 2004. **101**(3): p. 177-86.
8. Rainard, P. and C. Riollet, *Innate immunity of the bovine mammary gland*. Vet Res, 2006. **37**(3): p. 369-400.
9. Schukken, H., et al., *Host-response patterns of intramammary infections in dairy cows*. Vet Immunol Immunopathol, 2011.
10. Gunther, J., et al., *Comparative kinetics of Escherichia coli- and Staphylococcus aureus-specific activation of key immune pathways in mammary epithelial cells demonstrates that S. aureus elicits a delayed response dominated by interleukin-6 (IL-6) but not by IL-1A or tumor necrosis factor alpha*. Infect Immun. **79**(2): p. 695-707.
11. Lahouassa, H., et al., *Differential cytokine and chemokine responses of bovine mammary epithelial cells to Staphylococcus aureus and Escherichia coli*. Cytokine, 2007. **38**(1): p. 12-21.
12. Griesbeck-Zilch, B., et al., *Staphylococcus aureus and Escherichia coli cause deviating expression profiles of cytokines and lactoferrin messenger ribonucleic acid in mammary epithelial cells*. J Dairy Sci, 2008. **91**(6): p. 2215-24.
13. Mitterhuemer, S., et al., *Escherichia coli infection induces distinct local and systemic transcriptome responses in the mammary gland*. BMC Genomics. **11**: p. 138.
14. Rinaldi, M., et al., *A sentinel function for teat tissues in dairy cows: dominant innate immune response elements define early response to E. coli mastitis*. Funct Integr Genomics. **10**(1): p. 21-38.
15. Lippolis, J.D., D.O. Bayles, and T.A. Reinhardt, *Proteomic changes in Escherichia coli when grown in fresh milk versus laboratory media*. J Proteome Res, 2009. **8**(1): p. 149-58.
16. Zhao, X. and P. Lacasse, *Mammary tissue damage during bovine mastitis: causes and control*. J Anim Sci, 2008. **86**(13 Suppl): p. 57-65.
17. Oviedo-Boyso, J., et al., *Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis*. J Infect, 2007. **54**(4): p. 399-409.
18. Krömker, V., *Kurzes Lehrbuch Milchkunde und Milchhygiene*. 2007.
19. Fuchs, K.W.H.B.H.M.H.-W., *Euter- und Gesäugekrankheiten*. 1994.
20. Wilson, D.J., R.N. Gonzalez, and H.H. Das, *Bovine mastitis pathogens in New York and Pennsylvania: prevalence and effects on somatic cell count and milk production*. J Dairy Sci, 1997. **80**(10): p. 2592-8.

21. Smith, K.L., D.A. Todhunter, and P.S. Schoenberger, *Environmental mastitis: cause, prevalence, prevention*. J Dairy Sci, 1985. **68**(6): p. 1531-53.
22. Wiesner E., R.R., *Lexikon der Veterinärmedizin*. Vol. 4. 2000: Hippokrates.
23. Lehtolainen, T., et al., *Association between virulence factors and clinical course of Escherichia coli mastitis*. Acta Vet Scand, 2003. **44**(3-4): p. 203-5.
24. Lehtolainen, T., *Escherichia coli mastitis - bacterial factors and host response*. 2004, University of Helsinki: Helsinki.
25. M.Spohr, K.W.K.-H.L.K.F., *Handbuch Mastitis*. 1998.
26. Fuchs, K.W.H.B.H.M.H.-W., *Euter- und Gesäugekrankheiten*. 1994. 266-267.
27. Tenhagen, B.A., et al., *Prevalence of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Brandenburg, Germany*. J Dairy Sci, 2006. **89**(7): p. 2542-51.
28. Heckmann, R., B. Coleman, and D. Noorlander, *New technics for mastitis research & control: rubber surfaces*. Mod Vet Pract, 1981. **62**(5): p. 375-80.
29. K. Wendt, H.B., H. Mielke, H.-W. Fuchs, *Euter- und Gesäugekrankheiten*. 1994.
30. Tolle, A., *[Subclinical bovine coccal mastitis. A review]*. Zentralbl Veterinarmed B, 1982. **29**(5): p. 329-58.
31. Lammers, A., et al., *Identification of Staphylococcus aureus genes expressed during growth in milk: a useful model for selection of genes important in bovine mastitis?* Microbiology, 2000. **146** (Pt 4): p. 981-7.
32. Mamo, W., M. Lindahl, and P. Jonsson, *Enhanced virulence of Staphylococcus aureus from bovine mastitis induced by growth in milk whey*. Vet Microbiol, 1991. **27**(3-4): p. 371-84.
33. Lammers, A., P.J. Nuijten, and H.E. Smith, *The fibronectin binding proteins of Staphylococcus aureus are required for adhesion to and invasion of bovine mammary gland cells*. FEMS Microbiol Lett, 1999. **180**(1): p. 103-9.
34. Almeida, R.A., et al., *Staphylococcus aureus invasion of bovine mammary epithelial cells*. J Dairy Sci, 1996. **79**(6): p. 1021-6.
35. Petzl, W., et al., *Escherichia coli, but not Staphylococcus aureus triggers an early increased expression of factors contributing to the innate immune defense in the udder of the cow*. Vet Res, 2008. **39**(2): p. 18.
36. Kerro Dego, O., J.E. van Dijk, and H. Nederbragt, *Factors involved in the early pathogenesis of bovine Staphylococcus aureus mastitis with emphasis on bacterial adhesion and invasion. A review*. Vet Q, 2002. **24**(4): p. 181-98.
37. von Aulock, S., et al., *Lipoteichoic acid from Staphylococcus aureus is a potent stimulus for neutrophil recruitment*. Immunobiology, 2003. **208**(4): p. 413-22.
38. Haveri, M., et al., *Virulence genes of bovine Staphylococcus aureus from persistent and nonpersistent intramammary infections with different clinical characteristics*. J Appl Microbiol, 2007. **103**(4): p. 993-1000.
39. Wang, S.C., et al., *Distribution of superantigenic toxin genes in Staphylococcus aureus isolates from milk samples of bovine subclinical mastitis cases in two major dairy production regions of China*. Vet Microbiol, 2009. **137**(3-4): p. 276-81.
40. Boynukara, B., et al., *Classical enterotoxigenic characteristics of Staphylococcus aureus strains isolated from bovine subclinical mastitis in Van, Turkey*. Int J Food Microbiol, 2008. **125**(2): p. 209-11.
41. Dziewanowska, K., et al., *Fibronectin binding protein and host cell tyrosine kinase are required for internalization of Staphylococcus aureus by epithelial cells*. Infect Immun, 1999. **67**(9): p. 4673-8.
42. Oliveira, M., et al., *Biofilm-forming ability profiling of Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis mastitis isolates*. Vet Microbiol, 2006. **118**(1-

- 2): p. 133-40.
43. Melchior, M.B., H. Vaarkamp, and J. Fink-Gremmels, *Biofilms: a role in recurrent mastitis infections?* Vet J, 2006. **171**(3): p. 398-407.
 44. Blobel, H., et al., *Antiphagocytic factors of Staphylococcus aureus*. Comp Immunol Microbiol Infect Dis, 1980. **3**(4): p. 447-53.
 45. Matsunaga, T., et al., *Characteristics of Staphylococcus aureus isolated from peracute, acute and chronic bovine mastitis*. J Vet Med Sci, 1993. **55**(2): p. 297-300.
 46. Domanski, P.J., et al., *Characterization of a humanized monoclonal antibody recognizing clumping factor A expressed by Staphylococcus aureus*. Infect Immun, 2005. **73**(8): p. 5229-32.
 47. Nicolet, J., *Kompendium der veterinärmedizinischen Bakteriologie*. 1985.
 48. Zhang, L., et al., *Expression of staphylococcal protein Sbi is induced by human IgG*. FEMS Immunol Med Microbiol, 2000. **28**(3): p. 211-8.
 49. Zhang, L., et al., *Staphylococcus aureus expresses a cell surface protein that binds both IgG and beta2-glycoprotein I*. Microbiology, 1999. **145** (Pt 1): p. 177-83.
 50. Brakstad, O.G., K. Aasbakk, and J.A. Maeland, *Detection of Staphylococcus aureus by polymerase chain reaction amplification of the nuc gene*. J Clin Microbiol, 1992. **30**(7): p. 1654-60.
 51. Burvenich, C., et al., *Severity of E. coli mastitis is mainly determined by cow factors*. Vet Res, 2003. **34**(5): p. 521-64.
 52. Hogan, J. and K. Larry Smith, *Coliform mastitis*. Vet Res, 2003. **34**(5): p. 507-19.
 53. Todhunter, D., K.L. Smith, and J.S. Hogan, *Growth of gram-negative bacteria in dry cow secretion*. J Dairy Sci, 1990. **73**(2): p. 363-72.
 54. Rolle M., M.A., *Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*. Vol. Ausgabe 8. 2007. 427-431.
 55. Welty, F.K., K.L. Smith, and F.L. Schanbacher, *Lactoferrin concentration during involution of the bovine mammary gland*. J Dairy Sci, 1976. **59**(2): p. 224-31.
 56. Blum, S., et al., *Identification of a bovine mastitis Escherichia coli subset*. Vet Microbiol, 2008. **132**(1-2): p. 135-48.
 57. Kutila, T., et al., *Antibacterial effect of bovine lactoferrin against udder pathogens*. Acta Vet Scand, 2003. **44**(1-2): p. 35-42.
 58. Kornalijnslip, J.E., et al., *In vitro growth of mastitis-inducing Escherichia coli in milk and milk fractions of dairy cows*. Vet Microbiol, 2003. **91**(2-3): p. 125-34.
 59. Dopfer, D., et al., *Recurrent clinical mastitis caused by Escherichia coli in dairy cows*. J Dairy Sci, 1999. **82**(1): p. 80-5.
 60. Dopfer, D., et al., *Adhesion and invasion of Escherichia coli from single and recurrent clinical cases of bovine mastitis in vitro*. Vet Microbiol, 2000. **74**(4): p. 331-43.
 61. Opdebeeck, J.P., A.J. Frost, and D. O'Boyle, *Adhesion of Staphylococcus aureus and Escherichia coli to bovine udder epithelial cells*. Vet Microbiol, 1988. **16**(1): p. 77-86.
 62. Wenz, J.R., et al., *Escherichia coli isolates' serotypes, genotypes, and virulence genes and clinical coliform mastitis severity*. J Dairy Sci, 2006. **89**(9): p. 3408-12.
 63. Wenz, J.R., et al., *Bacteremia associated with naturally occurring acute coliform mastitis in dairy cows*. J Am Vet Med Assoc, 2001. **219**(7): p. 976-81.
 64. Sussman, M., *E.coli: Mechanisms Of Virulence*. 1997.

65. Fremaux, B., et al., *Dissemination and persistence of Shiga toxin-producing Escherichia coli (STEC) strains on French dairy farms*. Vet Microbiol, 2006. **117**(2-4): p. 180-91.
66. Lipman, L.J., A. de Nijs, and W. Gaastra, *Isolation and identification of fimbriae and toxin production by Escherichia coli strains from cows with clinical mastitis*. Vet Microbiol, 1995. **47**(1-2): p. 1-7.
67. Barnhart, M.M. and M.R. Chapman, *Curli biogenesis and function*. Annu Rev Microbiol, 2006. **60**: p. 131-47.
68. Nemeth, J., C.A. Muckle, and R.Y. Lo, *Serum resistance and the traT gene in bovine mastitis-causing Escherichia coli*. Vet Microbiol, 1991. **28**(4): p. 343-51.
69. Aguero, M.E., et al., *A plasmid-encoded outer membrane protein, TraT, enhances resistance of Escherichia coli to phagocytosis*. Infect Immun, 1984. **46**(3): p. 740-6.
70. Williams, P.H. and N.H. Carbonetti, *Iron, siderophores, and the pursuit of virulence: independence of the aerobactin and enterochelin iron uptake systems in Escherichia coli*. Infect Immun, 1986. **51**(3): p. 942-7.
71. Hill, A.W., D.J. Heneghan, and M.R. Williams, *The opsonic activity of bovine milk whey for the phagocytosis and killing by neutrophils of encapsulated and non-encapsulated Escherichia coli*. Vet Microbiol, 1983. **8**(3): p. 293-300.
72. Pedersen, C.M., et al., *Total synthesis of lipoteichoic acid of Streptococcus pneumoniae*. Angew Chem Int Ed Engl. **49**(14): p. 2585-90.
73. Strandberg, Y., et al., *Lipopolysaccharide and lipoteichoic acid induce different innate immune responses in bovine mammary epithelial cells*. Cytokine, 2005. **31**(1): p. 72-86.
74. McClenahan, D.J., J.P. Sotos, and C.J. Czuprynski, *Cytokine response of bovine mammary gland epithelial cells to Escherichia coli, coliform culture filtrate, or lipopolysaccharide*. Am J Vet Res, 2005. **66**(9): p. 1590-7.
75. al., H.S.e., *Host-response patterns of intra-mammary infections in dairy cows*. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2011.
76. Bannerman, D.D., *Pathogen-dependent induction of cytokines and other soluble inflammatory mediators during intramammary infection of dairy cows*. J Anim Sci, 2009. **87**(13 Suppl): p. 10-25.
77. Shuster, D.E., et al., *Complement fragment C5a and inflammatory cytokines in neutrophil recruitment during intramammary infection with Escherichia coli*. Infect Immun, 1997. **65**(8): p. 3286-92.
78. Lee, J.W., et al., *Characterization of cytokine expression in milk somatic cells during intramammary infections with Escherichia coli or Staphylococcus aureus by real-time PCR*. Vet Res, 2006. **37**(2): p. 219-29.
79. Riollet, C., P. Rainard, and B. Poutrel, *Cell subpopulations and cytokine expression in cow milk in response to chronic Staphylococcus aureus infection*. J Dairy Sci, 2001. **84**(5): p. 1077-84.
80. Sordillo, L.M. and K.L. Streicher, *Mammary gland immunity and mastitis susceptibility*. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2002. **7**(2): p. 135-46.
81. Rossi, D.L., et al., *Identification through bioinformatics of two new macrophage proinflammatory human chemokines: MIP-3alpha and MIP-3beta*. J Immunol, 1997. **158**(3): p. 1033-6.
82. Homey, B., et al., *Up-regulation of macrophage inflammatory protein-3 alpha/CCL20 and CC chemokine receptor 6 in psoriasis*. J Immunol, 2000. **164**(12): p. 6621-32.
83. Gouwy, M., et al., *Synergy in cytokine and chemokine networks amplifies the inflammatory response*. Cytokine Growth Factor Rev, 2005. **16**(6): p. 561-80.
84. Gunther, J., et al., *Assessment of the immune capacity of mammary epithelial*

- cells: comparison with mammary tissue after challenge with *Escherichia coli*. *Vet Res*, 2009. **40**(4): p. 31.
85. Ryckman, C., et al., *Proinflammatory activities of S100: proteins S100A8, S100A9, and S100A8/A9 induce neutrophil chemotaxis and adhesion*. *J Immunol*, 2003. **170**(6): p. 3233-42.
86. Regenhard, P., et al., *The antibacterial psoriasin is induced by E. coli infection in the bovine udder*. *Vet Microbiol*. **143**(2-4): p. 293-8.
87. Foell, D., et al., *S100 proteins expressed in phagocytes: a novel group of damage-associated molecular pattern molecules*. *J Leukoc Biol*, 2007. **81**(1): p. 28-37.
88. Champaiboon, C., et al., *Calprotectin S100A9 calcium-binding loops I and II are essential for keratinocyte resistance to bacterial invasion*. *J Biol Chem*, 2009. **284**(11): p. 7078-90.
89. Kubler, I., et al., *[Defensins: endogenous antibiotics as a central part of innate immunity]*. *Dtsch Med Wochenschr*, 2006. **131**(36): p. 1960-4.
90. Wiesner, J. and A. Vilcinskas, *Antimicrobial peptides: the ancient arm of the human immune system*. *Virulence*. **1**(5): p. 440-64.
91. Lehrer, R.I. and T. Ganz, *Defensins of vertebrate animals*. *Curr Opin Immunol*, 2002. **14**(1): p. 96-102.
92. Swanson, K., et al., *Expression of a beta-defensin mRNA, lingual antimicrobial peptide, in bovine mammary epithelial tissue is induced by mastitis*. *Infect Immun*, 2004. **72**(12): p. 7311-4.
93. Grzyb, J., D. Latowski, and K. Strzalka, *Lipocalins - a family portrait*. *J Plant Physiol*, 2006. **163**(9): p. 895-915.
94. Flo, T.H., et al., *Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron*. *Nature*, 2004. **432**(7019): p. 917-21.
95. Schmidt-Ott, K.M., et al., *Dual action of neutrophil gelatinase-associated lipocalin*. *J Am Soc Nephrol*, 2007. **18**(2): p. 407-13.
96. Schusser, B.M., *Die Bedeutung des Mx-Proteins in der Influenza-Abwehr beim Huhn*. 2010: München.
97. Haller, O., M. Frese, and G. Kochs, *Mx proteins: mediators of innate resistance to RNA viruses*. *Rev Sci Tech*, 1998. **17**(1): p. 220-30.
98. van der Blik, A.M., *Functional diversity in the dynamin family*. *Trends Cell Biol*, 1999. **9**(3): p. 96-102.
99. Simon, A., et al., *Interferon-regulated Mx genes are not responsive to interleukin-1, tumor necrosis factor, and other cytokines*. *J Virol*, 1991. **65**(2): p. 968-71.
100. Staeheli, P., *Interferon-induced proteins and the antiviral state*. *Adv Virus Res*, 1990. **38**: p. 147-200.
101. Darwish, W.S., et al., *Identification and phylogenetic analysis of novel cytochrome P450 IA genes from ungulate species*. *J Vet Med Sci*. **72**(9): p. 1237-41.
102. Androutsopoulos, V.P., A.M. Tsatsakis, and D.A. Spandidos, *Cytochrome P450 CYP1A1: wider roles in cancer progression and prevention*. *BMC Cancer*, 2009. **9**: p. 187.
103. van der Blik, A.M., *Is dynamin a regular motor or a master regulator?* *Trends Cell Biol*, 1999. **9**(7): p. 253-4.
104. Gunther, J., et al., *Stimulated expression of TNF-alpha and IL-8, but not of lingual antimicrobial peptide reflects the concentration of pathogens contacting bovine mammary epithelial cells*. *Vet Immunol Immunopathol*. **135**(1-2): p. 152-7.
105. Burkhardt, F., *Mikrobiologische Diagnostik*. 1992, Stuttgart: Georg Thieme

- Verlag.
106. Johnson, J.R. and A.L. Stell, *Extended virulence genotypes of Escherichia coli strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise*. J Infect Dis, 2000. **181**(1): p. 261-72.
 107. Muller, D., et al., *Identification of unconventional intestinal pathogenic Escherichia coli isolates expressing intermediate virulence factor profiles by using a novel single-step multiplex PCR*. Appl Environ Microbiol, 2007. **73**(10): p. 3380-90.
 108. Duda, K.A., et al., *The lipopolysaccharide of the mastitis isolate Escherichia coli strain 1303 comprises a novel O-antigen and the rare K-12 core type*. Microbiology. **157**(Pt 6): p. 1750-60.
 109. Enright, M.C., et al., *Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol, 2000. **38**(3): p. 1008-15.
 110. Monecke, S. and R. Ehricht, *Rapid genotyping of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) isolates using miniaturised oligonucleotide arrays*. Clin Microbiol Infect, 2005. **11**(10): p. 825-33.
 111. Wolf, C., et al., *Genomic and proteomic characterization of Staphylococcus aureus mastitis isolates of bovine origin*. Proteomics. **11**(12): p. 2491-502.
 112. Rosenberger, G., *Die klinische Untersuchung des Rindes*. 3 ed. 1990. 718.
 113. Mehne, D., *Inaugural-Dissertation: Modellhafte Untersuchungen zur Frühphase der Mastitis beim Rind*. In: Klinik für Wiederkäuer, LMU München. 2009.
 114. Redetzky, R., (2000), *Inaugural Dissertation: Biochemisches Blutprofil, Milchinhaltsstoffe und Milchmengenleistung als Kriterien zur laktationsbegleitenden Beurteilung des Gesundheitszustandes hochleistender HF-Kühe in Anbindehaltung*. In: Tierärztlichen Hochschule, Hannover
 115. Wenz, J.R., et al., *Use of systemic disease signs to assess disease severity in dairy cows with acute coliform mastitis*. J Am Vet Med Assoc, 2001. **218**(4): p. 567-72.
 116. Kubista, M., et al., *The real-time polymerase chain reaction*. Mol Aspects Med, 2006. **27**(2-3): p. 95-125.
 117. Weiß, C., *Basiswissen Medizinische Statistik*, ed. Springer. 2010.
 118. Kraft, W., *Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin*. 3 ed. 1995.
 119. Bastin, C., et al., *Modeling milk urea of Walloon dairy cows in management perspectives*. J Dairy Sci, 2009. **92**(7): p. 3529-40.
 120. Petzl, W., *Lipopolysaccharide pretreatment of the udder protects against experimental Escherichia coli mastitis*, in press. Innate Immunity, 2011.
 121. Petzl, W., (2005), *Inaugural-Dissertation: Untersuchungen zu frühen Erreger-Wirts-Interaktionen bei der Mastitis des Rindes*. In: Tiermedizinische Fakultät. Ludwig-Maximilians-Universität, München.
 122. Vangroenweghe, F., et al., *Increase of Escherichia coli inoculum doses induces faster innate immune response in primiparous cows*. J Dairy Sci, 2004. **87**(12): p. 4132-44.
 123. Swanson, K.M., et al., *Transcriptome profiling of Streptococcus uberis-induced mastitis reveals fundamental differences between immune gene expression in the mammary gland and in a primary cell culture model*. J Dairy Sci, 2009. **92**(1): p. 117-29.
 124. Pyorala, S., *Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis*. Vet Res, 2003. **34**(5): p. 565-78.
 125. Nickerson, S.C., et al., *Effects of novel intramammary device models on incidence of mastitis after experimental challenge*. J Dairy Sci, 1990. **73**(10): p. 2774-84.

126. Shuster, D.E., E.K. Lee, and M.E. Kehrli, Jr., *Bacterial growth, inflammatory cytokine production, and neutrophil recruitment during coliform mastitis in cows within ten days after calving, compared with cows at midlactation*. Am J Vet Res, 1996. **57**(11): p. 1569-75.
127. Burvenich, C., et al., *Role of the neutrophil leucocyte in the local and systemic reactions during experimentally induced E. coli mastitis in cows immediately after calving*. Vet Q, 1994. **16**(1): p. 45-50.
128. Doggweiler R., H.E., *Zellgehalt in der Milch ungeschädigter Euter*. Milchwissensch., 1983: 5-8.
129. Pfister, T., (2009), *Inaugural-Dissertation: Untersuchungen zur Endotoxintoleranz bei der akuten Mastitis des Rindes*. In: Klinik für Wiederkäuer. LMU München
130. Bannerman, D.D., et al., *Escherichia coli and Staphylococcus aureus elicit differential innate immune responses following intramammary infection*. Clin Diagn Lab Immunol, 2004. **11**(3): p. 463-72.
131. Paape, M.J. and H.A. Tucker, *Somatic cell content variation in fraction-collected milk*. J Dairy Sci, 1966. **49**(3): p. 265-7.
132. Vangroenweghe, F., H. Dosogne, and C. Burvenich, *Composition and milk cell characteristics in quarter milk fractions of dairy cows with low cell count*. Vet J, 2002. **164**(3): p. 254-60.
133. Bruckmaier, R.M., *Gene expression of factors related to the immune reaction in response to intramammary Escherichia coli lipopolysaccharide challenge*. J Dairy Res, 2005. **72 Spec No**: p. 120-4.
134. Yang, W., et al., *Bovine TLR2 and TLR4 properly transduce signals from Staphylococcus aureus and E. coli, but S. aureus fails to both activate NF-kappaB in mammary epithelial cells and to quickly induce TNFalpha and interleukin-8 (CXCL8) expression in the udder*. Mol Immunol, 2008. **45**(5): p. 1385-97.
135. Genini, S., et al., *Strengthening insights into host responses to mastitis infection in ruminants by combining heterogeneous microarray data sources*. BMC Genomics. **12**(1): p. 225.
136. Lutzow, Y.C., et al., *Identification of immune genes and proteins involved in the response of bovine mammary tissue to Staphylococcus aureus infection*. BMC Vet Res, 2008. **4**: p. 18.

9 Anhang

Tabelle 19: Statistisch signifikante Unterschiede der Genexpression von Entzündungsfaktoren im Lokalisationsvergleich nach intramamärer Inokulation von *E. coli*₁₃₀₃

Gen	Zeit <i>p.inoc.</i> (h)	verglichene Lokalisationen		
		ZZ → DZ	ZZ → EU	DZ → EU
IL6	0	0,753	0,249	0,116
	1	0,075	0,028	0,028
	2	0,345	0,028	0,028
	3	0,917	0,028	0,028
TNF	0	0,600	0,028	0,075
	1	0,116	0,028	0,028
	2	0,173	0,028	0,028
	3	0,345	0,028	0,028
CXCL8	0	0,753	0,116	0,046
	1	0,116	0,028	0,028
	2	0,917	0,028	0,028
	3	0,345	0,028	0,028
CCL20	0	0,249	0,173	0,075
	1	0,075	0,028	0,028
	2	0,600	0,028	0,028
	3	0,345	0,028	0,028
S100A9	0	0,249	0,028	0,028
	1	0,753	0,028	0,028
	2	0,917	0,028	0,028
	3	0,173	0,028	0,028
LAP	0	0,043	0,028	0,028
	1	0,028	0,046	0,463
	2	0,173	0,028	0,028
	3	0,028	0,028	0,028
LCN2	0	0,345	0,028	0,028
	1	0,116	0,028	0,028
	2	0,753	0,028	0,028
	3	0,345	0,028	0,028
MX2	0	0,249	0,028	0,028
	1	0,345	0,028	0,028
	2	0,249	0,028	0,028
	3	0,116	0,028	0,046
CYP1A1	0	0,046	0,075	0,463
	1	0,028	0,028	0,600
	2	0,116	0,249	0,600
	3	0,046	0,028	0,173

Gezeigt sind die p-Werte der verglichenen Lokalisationen Zitenzisterne (ZZ), Drüsenzisterne (DZ) und ventrales Euterparenchym (EU) innerhalb der Gruppe *Ec 3h* zu den entsprechenden Untersuchungszeitpunkten *p. inoc.* (0 h =Kontrolle, 1 h, 2 h, 3 h). Statistisch signifikante Unterschiede sind fett gedruckt.

Tabelle 20: Statistisch signifikante Unterschiede der Genexpression von Entzündungsfaktoren im Lokalisationsvergleich nach intramamärer Inokulation von *S. aureus*₁₀₂₇

Gen	Zeit <i>p. inoc.</i> (h)	verglichene Lokalisationen		
		ZZ → DZ	ZZ → EU	DZ → EU
IL6	0	0,116	0,173	0,463
	1	0,345	0,075	0,046
	2	0,345	0,028	0,249
	3	0,753	0,046	0,075
TNF	0	0,028	0,028	0,173
	1	0,046	0,028	0,028
	2	0,028	0,028	0,028
	3	0,345	0,028	0,028
CXCL8	0	0,028	0,173	0,753
	1	0,463	0,141	0,173
	2	0,075	0,028	0,173
	3	0,917	0,173	0,249
CCL20	0	0,046	0,028	0,028
	1	0,116	0,028	0,028
	2	0,249	0,028	0,028
	3	0,345	0,028	0,028
S100A9	0	0,046	0,028	0,028
	1	0,463	0,028	0,028
	2	0,075	0,028	0,028
	3	0,753	0,028	0,028
LAP	0	0,028	0,028	0,028
	1	0,028	0,028	0,028
	2	0,028	0,028	0,028
	3	0,028	0,028	0,028
LCN2	0	0,028	0,028	0,028
	1	0,075	0,028	0,028
	2	0,028	0,028	0,028
	3	0,917	0,028	0,028
MX2	0	0,028	0,028	0,173
	1	0,345	0,028	0,028
	2	0,116	0,046	0,046
	3	0,075	0,028	0,028
CYP1A1	0	0,028	0,028	0,075
	1	0,463	0,116	0,028
	2	0,046	0,046	0,249
	3	0,028	0,028	0,753

Gezeigt sind die p-Werte der verglichenen Lokalisationen Zitzenzisterne (ZZ), Drüsenzisterne (DZ) und ventrales Euterparenchym (EU) innerhalb der Gruppe *Sa 3h* zu den entsprechenden Untersuchungszeitpunkten *p. inoc.* (0 h =Kontrolle, 1 h, 2 h, 3 h). Statistisch signifikante Unterschiede sind fett gedruckt.

10 Danksagung

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. Holm Zerbe für die Bereitstellung des Themas und für die engagierte und motivierende Betreuung. Seine stets kompetente und engagierte Unterstützung sowie prompte Hilfeleistung haben maßgeblich zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen.

Ganz besonders danke ich Herrn Dr. Wolfram Petzl für die hervorragende Betreuung und stete Erreichbarkeit für aufkommende Fragen. Durch sein fachliches Know-how und die tatkräftige Unterstützung hat er mir sehr geholfen, motiviert am Ball zu bleiben und Unsicherheiten zu beseitigen.

Bei Herrn Prof. Martin Seyfert, Frau Angelika Deike und den Mitarbeitern des FBN (Leibniz Institut für Nutztierbiologie) in Dummerstorf möchte ich mich ganz herzlich für die Aufarbeitung der gewonnenen Proben bedanken.

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

Bedanken möchte ich mich auch bei den Tierpflegerinnen und Tierpflegern der Klinik für Wiederkäuer mit Ambulanz und Bestandsbetreuung der LMU München für die umsichtige Versorgung und Betreuung der Versuchstiere. Namentlich möchte ich mich bei Frau Kerstin Richter, Herrn Matthias Berger und Herrn Niklas Spinar für die stets unkomplizierte Hilfe, vor allem beim Transport der Versuchstiere, besonders herzlich bedanken.

Weiterhin gilt ein besonderer Dank Frau Rita Radloff, die mir stets mit großer Herzlichkeit bei der ein oder anderen Verwaltungsangelegenheit behilflich war.

Ein ganz herzlicher Dank gilt Frau Dr. Carola Sauter-Louis für ihre Hilfe bei der statistischen Auswertung der Daten.

Frau Christina Beyer und Frau Ingrid Hartmann vom klinischen Labor der Klinik für Wiederkäuer mit Ambulanz und Bestandsbetreuung der LMU München möchte ich danken für die zuverlässige, zügige Bearbeitung der Proben und die nette Zusammenarbeit.

Danken möchte ich auch Frau Priv.-Doz. Dr. Angela Hafner-Marx und den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Pathologie des Bayerischen Landesamts für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit Oberschleißheim für die zuvorkommende Hilfe bei der Sektion der Versuchstiere.

Besonderer Dank gilt auch meiner Teamkollegin Frau Katharina Waldmüller, die mir beim Tierkauf, den Voruntersuchungen und nicht zuletzt während den Versuchen und dem Schreiben der Arbeit mit Rat und Tat freundschaftlich zur Seite stand.

Bei Monique Lind möchte ich mich ganz herzlich fürs Korrekturlesen, aber auch für die schöne Zeit und Freundschaft bedanken. Sie hat mir in so mancher schwierigen Situation neuen Mut gemacht und war immer eine zuverlässige Hilfe.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Clara Berger, Sophie Esch und Bernhard Hiedl, die mir bei der Fertigstellung des Summary behilflich waren.

Bei meinem lieben Freund Maryan möchte ich mich ganz besonders für die Unterstützung, das Korrekturlesen und den Ansporn bedanken. Ohne Dich wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen!