

**Untersuchungen zur entzündungsbedingten Regulation  
der Interleukine IL1B und IL1RA im Uterus des Rindes**

von Anna Maria Kneidl

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

Untersuchungen zur entzündungsbedingten Regulation  
der Interleukine IL1B und IL1RA im Uterus des Rindes

von Anna Maria Kneidl  
aus Weiden in der Oberpfalz

München 2022

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

Lehrstuhl für Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung

Arbeit angefertigt unter der Leitung von:

Univ.-Prof. Dr. Holm Zerbe

Mitbetreuung durch:

Dr. Frank Weber

Dr. Marie Meyerholz

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

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

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Holm Zerbe

Korreferent: Prof. Dr. Sabine André

Tag der Promotion: 30.07.2022

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>I.</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT .....</b>	<b>3</b>
<b>1.</b>	<b>Immunologie der Fortpflanzungsorgane beim weiblichen Rind unter besonderer Berücksichtigung der Interleukin 1-Familie.....</b>	<b>3</b>
1.1.	Immunmechanismen im Reproduktionstrakt beim weiblichen Rind....	3
1.2.	Spezielle Betrachtung der IL1-Familie .....	7
1.2.1.	Bestandteile der IL1-Familie .....	7
1.2.2.	Konzentrationsveränderungen von IL1A, IL1B und IL1RA in Zusammenhang mit verschiedenen Krankheitsbildern .....	9
1.2.3.	Das IL1-System in Bezug auf die weiblichen Fortpflanzungsorgane ..	9
1.2.3.1.	Physiologische Veränderungen im Zyklusverlauf des Rindes.....	9
1.2.3.2.	Das IL1-System in Bezug auf die Etablierung und Erhaltung einer Trächtigkeit .....	10
<b>2.</b>	<b>Gebärmutterentzündung beim Rind unter besonderer Berücksichtigung der subklinischen Endometritis .....</b>	<b>12</b>
2.1.	Begriffsbestimmungen und Erscheinungsbild .....	12
2.2.	Prävalenz.....	13
2.3.	Ätiologie, Pathogenese und prädisponierende Faktoren.....	13
2.3.1.	Intrauterine Infektionen .....	13
2.3.2.	Weitere Risikofaktoren .....	15
2.3.3.	Ätiologie, Pathogenese und prädisponierende Faktoren für SE .....	15
2.4.	Diagnostik klinischer und subklinischer Gebärmutterentzündungen .	17
2.4.1.	Äußere Adspektion .....	17
2.4.2.	Transrektale Palpation .....	17
2.4.3.	Beurteilung des Vaginalschleims.....	17
2.4.4.	Ultrasonographische Untersuchung .....	18
2.4.5.	Zytologische Untersuchung .....	18

---

2.4.6.	Histopathologische Untersuchung .....	19
2.4.7.	Leukozyten-Esterase-Test.....	20
2.5.	Therapie .....	21
2.5.1.	Einsatz von Antibiotika.....	21
2.5.2.	Einsatz von Entzündungshemmern.....	22
2.5.3.	Hormonelle Therapie mit Prostaglandin F <sub>2α</sub> .....	22
2.5.4.	Einsatz von Antiseptika .....	22
2.5.5.	Selbstheilung subklinischer Endometritiden.....	22
2.5.6.	Experimentell therapeutischer Einsatz von <i>Lactobacilli</i> .....	23
2.6.	Folgen .....	23
2.7.	Prophylaxe .....	24
<b>III.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>25</b>
<b>1.</b>	<b>Untersuchung der Regulation der Genexpression von IL1B und IL1RA in einer bovinen endometrialen Explantkultur .....</b>	<b>25</b>
1.1.	Vorbereitung der Reagenzien .....	25
1.1.1.	Vorbereitung des Mediums für die Inkubation.....	25
1.1.2.	Vorbereitung der eingesetzten Bakterienstämme .....	26
1.1.2.1.	<i>Escherichia coli</i> .....	26
1.1.2.2.	<i>Bacillus pumilus</i> .....	27
1.1.2.3.	<i>Lactobacillus buchneri</i> .....	27
1.1.3.	Vorbereitung der eingesetzten Zytokine .....	28
1.2.	Gewinnung von bovinen endometrialen Explantaten .....	28
1.3.	Präparation und Inkubation der Explantate.....	30
1.4.	Untersuchung der Vitalität der Explantate.....	32
1.5.	Weitere Untersuchungen zur Uterusgesundheit der Spendertiere zur Explantgewinnung .....	34
1.5.1.	Bakteriologische Untersuchung .....	35
1.5.2.	Zytologische Untersuchung .....	35
1.6.	Molekularbiologische Untersuchung .....	35

---

1.6.1.	RNA-Extraktion .....	36
1.6.2.	Bestimmung der RNA-Integrität und -Konzentration .....	36
1.6.3.	Synthese von cDNA durch Reverse Transkription .....	37
1.6.4.	Bestimmung der cDNA-Konzentration und -Reinheit .....	38
1.6.5.	Etablierung einer Standardkurve für die qPCR für IL1RA .....	38
1.6.6.	qPCR zur Untersuchung der Genexpression von IL1B und IL1RA ...	39
<b>2.</b>	<b>Untersuchung der Proteinkonzentration von IL1RA und IL1B in bovinen Uterussekretproben .....</b>	<b>41</b>
2.1.	Probengewinnung .....	41
2.1.1.	Beschreibung und Vorbereitung der Utensilien für die Gewinnung von Uterussekret .....	41
2.1.2.	Ablauf der Probengewinnung .....	43
2.1.3.	Aufbereitung der Uterussekretproben .....	44
2.1.4.	Weitere Untersuchungen zur Uterusgesundheit der Spendertiere .....	45
2.1.4.1.	Bakteriologische Untersuchung .....	45
2.1.4.2.	Zytologische Untersuchung .....	45
2.2.	Bestimmung der Proteinkonzentration von IL1RA in bovinen Uterussekretproben .....	46
2.2.1.	Etablierung eines AlphaLISA für bovines IL1RA .....	46
2.2.1.1.	Kopplung eines anti-IL1RA-Antikörpers an Akzeptor-Beads .....	47
2.2.1.2.	Durchführung des AlphaLISA .....	47
2.2.1.3.	Evaluierung des AlphaLISA .....	48
2.2.2.	Anwendung des AlphaLISA zur Messung der Konzentration von IL1RA in bovinen Uterussekretproben .....	50
2.3.	Bestimmung der Konzentration von IL1B in bovinen Uterussekretproben .....	50
2.4.	Rechnerische Korrekturen .....	50
2.4.1.	Rechnerische Korrektur der Verdünnung des Uterussekrets durch Extraktionspuffer .....	50
2.4.2.	Rechnerische Korrektur der Blutkontamination von <i>in vivo</i> gewonnenem Uterussekret .....	51

---

2.5.	Berechnung des IL1RA/IL1B-Verhältnisses auf Proteinebene in bovinen Uterussekretproben .....	52
<b>3.</b>	<b>Statistische Analyse.....</b>	<b>52</b>
3.1.	Deskriptive statistische Analyse .....	52
3.2.	Induktive statistische Analyse.....	52
3.2.1.	Auswertung der Daten aus der Explantkultur .....	53
3.2.2.	Auswertung der Daten der Uterussekretproben .....	54
3.2.3.	Einordnung der Ergebnisse und Kategorisierung der p-Werte .....	55
<b>IV.</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>56</b>
<b>1.</b>	<b>Methodische Vorarbeiten .....</b>	<b>56</b>
1.1.	Evaluierung der Explantkultur .....	56
1.1.1.	Untersuchung der Stoffwechselaktivität .....	56
1.1.1.1.	Vergleich der Stoffwechselaktivität nach 3 h und 24 h Inkubation....	56
1.1.1.2.	Einfluss der Koinkubationsansätze auf die Stoffwechselaktivität .....	57
1.1.2.	Einfluss der Kultivierung auf die Genexpression von IL1B und IL1RA .....	57
1.2.	Qualität der Reverse Transkriptase-qPCR .....	58
1.2.1.	RNA-Qualität .....	58
1.2.2.	cDNA-Konzentration .....	58
1.2.3.	Qualität der qPCR-Läufe .....	58
1.2.4.	Überprüfung der qPCR-Ergebnisse auf Targetspezifität .....	59
1.2.4.1.	Ergebnisse der Negativkontrollen .....	59
1.2.4.2.	Ergebnisse der –RT-Kontrollen .....	59
1.2.4.3.	Schmelztemperatur der qPCR-Produkte .....	61
1.3.	Evaluierung der Untersuchung von Uterussekretproben .....	61
1.3.1.	Verdünnung des Uterussekrets .....	61
1.3.2.	Blutkontamination der Uterussekretproben .....	62
1.4.	Evaluierung des AlphaLISA für bovines IL1RA.....	62
1.4.1.	Durchführung des AlphaLISA mit definierten Standardkonzentrationen.....	63

---

1.4.2.	Evaluierung des AlphaLISA .....	63
1.4.2.1.	Bestimmung des Lower Detection Limits (LDL) .....	63
1.4.2.2.	Untersuchung der Intra-Assay-Variation .....	63
1.4.2.3.	Untersuchung der Inter-Assay-Variation .....	64
1.4.2.4.	Bestimmung des Hook Points .....	64
1.4.2.5.	Untersuchung der Wiederfindungsrate .....	64
<b>2.</b>	<b>Uterusgesundheit der Spendertiere .....</b>	<b>65</b>
2.1.	Bakteriologische Untersuchung .....	65
2.1.1.	Bakteriologische Untersuchung der Spendertiere für die Explantkultur .....	65
2.1.2.	Bakteriologische Untersuchung der Spendertiere für die Uterussekretproben .....	66
2.2.	Zytologische Untersuchung .....	66
2.2.1.	Zytologische Untersuchung der Spendertiere für die Explantkultur ..	66
2.2.2.	Zytologische Untersuchung der Spendertiere für die Uterussekretproben .....	67
2.3.	Leukozyten-Esterase-Test .....	67
<b>3.</b>	<b>Regulation der Genexpression von IL1B und IL1RA in der endometrialen Explantkultur .....</b>	<b>67</b>
3.1.	Einfluss der Koinkubation mit ausgewählten Bakterien auf die Genexpression von IL1B und IL1RA sowie auf das IL1B/IL1RA- Verhältnis .....	68
3.2.	Einfluss der Koinkubation mit rekombinanten bovinen Zytokinen....	72
<b>4.</b>	<b>Proteinkonzentration von IL1B und IL1RA sowie IL1RA/IL1B- Verhältnis in bovinen Uterussekretproben .....</b>	<b>74</b>
4.1.	Proteinkonzentration von IL1B und IL1RA sowie IL1RA/IL1B- Verhältnis in Uterussekret in Abhängigkeit von der Gebärmuttergesundheit .....	74
4.2.	Proteinkonzentration von IL1B und IL1RA sowie IL1RA/IL1B- Verhältnis in Uterussekret in Abhängigkeit von der Herkunft der Uterussekretproben .....	75
<b>V.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>77</b>

---

<b>1.</b>	<b>Die Explantkultur ist zur Darstellung des Einflusses entzündungsrelevanter Komponenten auf das IL1-System geeignet.....</b>	<b>77</b>
<b>2.</b>	<b>Endometriale Genexpression von IL1B und IL1RA nach bakterieller Exposition .....</b>	<b>80</b>
<b>3.</b>	<b>IL10 ist ein potenter Modulator der lokalen Immunantwort im bovinen Endometrium .....</b>	<b>82</b>
<b>4.</b>	<b>Kühe mit subklinischer Endometritis zeigen eine Verschiebung des IL1RA/IL1B-Verhältnisses im Uterussekret .....</b>	<b>83</b>
<b>5.</b>	<b>Proteinkonzentration von IL1B und IL1RA in Uterussekretpuben aus Tierversuch und Schlachtorganen.....</b>	<b>85</b>
<b>6.</b>	<b>Fazit.....</b>	<b>87</b>
<b>VI.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>89</b>
<b>VII.</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>92</b>
<b>VIII.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>95</b>
<b>IX.</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>123</b>
<b>X.</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS.....</b>	<b>125</b>
<b>XI.</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>126</b>
<b>1.</b>	<b>Verwendete Geräte, Instrumente, Materialien und Reagenzien</b>	<b>126</b>
1.1.	Für verschiedene Untersuchungen verwendete Geräte, Instrumente, Materialien und Reagenzien .....	126
1.1.1.	Für verschiedene Untersuchungen verwendete Geräte.....	126
1.1.2.	Für verschiedene Untersuchungen verwendete Instrumente .....	127
1.1.3.	Für verschiedene Untersuchungen verwendete Materialien .....	127
1.1.4.	Für verschiedene Untersuchungen verwendete Reagenzien.....	128
1.2.	Für die bakteriologische Untersuchung verwendete Geräte, Instrumente, Materialien und Reagenzien .....	128
1.2.1.	Für die bakteriologische Untersuchung verwendete Geräte .....	128
1.2.2.	Für die bakteriologische Untersuchung verwendete Materialien .....	128

---

1.3.	Für die zytologische Untersuchung verwendete Geräte, Instrumente, Materialien und Reagenzien .....	129
1.3.1.	Für die zytologische Untersuchung verwendete Geräte .....	129
1.3.2.	Für die zytologische Untersuchung verwendete Materialien.....	129
1.3.3.	Für die zytologische Untersuchung verwendete Reagenzien .....	129
1.4.	Für die Gewinnung, Inkubation und Konservierung der Explants verwendete Geräte, Instrumente, Materialien und Reagenzien .....	129
1.4.1.	Für die Gewinnung, Inkubation und Konservierung der Explants verwendete Geräte .....	129
1.4.2.	Für die Gewinnung, Inkubation und Konservierung der Explants verwendete Instrumente .....	130
1.4.3.	Für die Gewinnung, Inkubation und Konservierung der Explants verwendete Materialien.....	130
1.4.4.	Für die Gewinnung, Inkubation und Konservierung der Explants verwendete Reagenzien .....	130
1.5.	Für die Molekularbiologische Untersuchung verwendete Geräte, Instrumente, Materialien und Reagenzien .....	131
1.5.1.	Für die Molekularbiologische Untersuchung verwendete Geräte ....	131
1.5.2.	Für die Molekularbiologische Untersuchung verwendete Materialien und Reagenzien .....	132
1.6.	Für die Gewinnung der Uterussekretproben verwendete Geräte, Instrumente, Materialien und Reagenzien .....	133
1.6.1.	Für die Gewinnung der Uterussekretproben verwendete Geräte .....	133
1.6.2.	Für die Gewinnung der Uterussekretproben verwendete Materialien	133
1.6.3.	Für die Gewinnung der Uterussekretproben verwendete Reagenzien	134
1.7.	Für den AlphaLISA verwendete Geräte, Instrumente, Materialien und Reagenzien .....	134
1.7.1.	Für den AlphaLISA verwendete Geräte .....	134
1.7.2.	Für den AlphaLISA verwendetes Material .....	134
1.7.3.	Für den AlphaLISA verwendete Reagenzien .....	135
<b>2.</b>	<b>Protokolle.....</b>	<b>137</b>
2.1.	Dokumentation der Probengewinnung und -aufbereitung.....	137

---

2.2.	Laborprotokoll für die Haema-Schnellfärbung.....	138
2.3.	Laborprotokolle für die Explantkultur .....	138
2.3.1.	Protokoll für die Herstellung der <i>E. coli</i> -Suspension .....	138
2.3.2.	Protokoll für die RNA-Extraktion .....	139
2.3.3.	Protokoll für die cDNA-Synthese .....	140
2.3.4.	Primer-Spezifikationen .....	141
2.3.5.	Protokolle der Standardkurvenetablierung für IL1RA .....	142
2.3.5.1.	Protokoll der konventionellen PCR .....	142
2.3.5.2.	Protokoll der Klonierung des Produktes aus der konventionellen PCR .....	142
2.3.5.3.	Weitere Inkubation der <i>E. coli</i> in LB-Medium .....	143
2.3.5.4.	Plasmidextraktion .....	144
2.3.5.5.	Extraktion der Zielsequenz aus dem Plasmid (Linearisierung) .....	144
2.3.5.6.	Aufreinigung und Verdünnung der Zielsequenz.....	144
2.3.6.	Protokoll für die qPCR.....	145
2.4.	Laborprotokolle für AlphaLISA-Untersuchungen.....	146
2.4.1.	Herstellung der Reagenzien für die Kopplung des anti-IL1RA- Antikörpers an Akzeptor-Beads.....	146
2.4.2.	Protokoll für den IL1RA-AlphaLISA .....	146
2.4.2.1.	Herstellung der Verdünnungen .....	146
2.4.2.2.	Pipettierschema .....	147
2.4.3.	Protokoll für den IL1B-AlphaLISA.....	147
2.4.4.	Berechnung des Verdünnungsfaktors .....	148
2.4.5.	Rechnerische Korrektur der Blutkontamination .....	149
<b>3.</b>	<b>Ergebnistabellen der statistischen Auswertung .....</b>	<b>151</b>
3.1.	Genexpression von IL1B und IL1RA sowie IL1RA/IL1B-Verhältnis auf Genexpressionsebene nach Koinkubation mit hitzeinaktivierten Bakterien oder Zytokinen .....	151
3.2.	Proteinkonzentrationen von IL1B und IL1RA sowie IL1RA/IL1B- Verhältnis in Uterussekretproben .....	153
<b>XII.</b>	<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>155</b>

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

A260/A280	Verhältnis der Absorption bei 260 nm zur Absorption bei 280 nm bei nanophotometrischer Messung
AlphaLISA	Amplified luminescent proximity homogeneous assay - linked immunosorbent assay
AMP	Antimikrobielle Peptide
Aqua dest.	Aqua destillata
<i>B. (pumilus)</i>	<i>Bacillus (pumilus)</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CMO	Carboxymethoxylamin
C <sub>t</sub>	cycle threshold
CV	Variationskoeffizient (EN: coefficient of variation)
DAMPs	damage-associated molecular patterns
DMEM-F12	Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Ham's Nutrient Mixture
DNA	Desoxyribonukleinsäure (EN: deoxyribonucleic acid)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphate
<i>E.(coli)</i>	<i>Escherichia (coli)</i>
<i>F</i>	Verdünnungsfaktor
for	forward
g	Erdbeschleunigung (Beschleunigungsgröße der Zentrifuge)
H0	Nullhypothese
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-Ethansulfonsäure
IFN	Interferon

IFN $\tau$	Interferon $\tau$
IL	Interleukin
IL1RA	Interleukin 1-Rezeptorantagonist
IQR	Interquartilsabstand
IVF	<i>in vitro</i> -Fertilisation
KBE	Koloniebildende Einheiten
KE	Klinische Endometritis
<i>L. (buchneri)</i>	<i>Lactobacillus (buchneri)</i>
LB	Lysogeny broth
LDL	Lower Detection Limit
LE	Leukozyten-Esterase
MALDI-TOF	Matrix-assisted laser desorption time-of-flight
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
<i>n</i>	Anzahl (von Proben oder Tieren)
OD	Optische Dichte
OD <sub>3</sub> , OD <sub>24</sub>	Optische Dichte der Explantüberstände nach 3 bzw. 24 h
p.p.	post partum
PAMPs	pathogen-associated molecular patterns
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (EN: phosphate-buffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (EN: polymerase chain reaction)
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
PGF <sub>2<math>\alpha</math></sub>	Prostaglandin F <sub>2<math>\alpha</math></sub>
PMN	Polymorphkerniger Leukozyt, Verwendung für ‚neutrophiler Granulozyt‘
PPE	Physiologische puerperale Entzündung

---

PRR	pattern recognition receptors
qPCR	quantitative Real Time Polymerase-Kettenreaktion
RA	Rezeptor Antagonist
rev	reverse
RNA	Riboukleinsäure (EN: ribonucleic acid)
RNase	Ribonukleasen
rpm	Runden pro Minute (EN: rounds per minute)
RQI	RNA Quality Index
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
-RT	Proben zum Einsatz in die qPCR, bei denen während der cDNA-Synthese keine RT zugegeben wurde
SD	Standardabweichung (EN: Standard deviation)
SE	Subklinische Endometritis
SE <sub>neg</sub> , SE <sub>pos</sub>	Gruppe von Tieren ohne (neg) und mit (pos) diagnostizierter SE nach zytologischer Untersuchung
<i>spp.</i>	<i>Species pluralis</i>
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
TSB	Tryptic soja broth
US	Uterussekret
VRB	Violet Red Bile
WST-8	Water-soluble Tetrazolium-8

## I. EINLEITUNG

Erkrankungen der Fortpflanzungsorgane beim weiblichen Rind spielen in der Milchviehhaltung eine zentrale Rolle. Entzündungen der Gebärmutter beeinträchtigen das Tierwohl und darüber hinaus die Fruchtbarkeit der betroffenen Kuh (STOJKOV et al., 2015; SHELDON et al., 2019). Für Milchviehhalter ergeben sich durch Fruchtbarkeitsstörungen relevante wirtschaftliche Verluste: Nach Berechnungen von INCHAISRI et al. (2010) summieren sich die Kosten verminderter Fruchtbarkeit auf einen jährlichen Nettoverlust von 231 € je betroffener Milchkuh gegenüber einer Milchkuh mit guter Fruchtbarkeit. SHALLOO et al. (2014) bezifferten die Kosten für verlängerte Zwischenkalbezeiten auf bis zu 4,57 € je Kuh und Tag sowie zusätzliche Kosten durch erhöhten Besamungs- und Arbeitsaufwand und erhöhte Remontierung auf 47,84 € je Kuh und Jahr. Fruchtbarkeitsstörungen zählen zu den häufigsten Abgangsgründen aus Milchviehbeständen (ARMENGOL & FRAILE, 2018; RILANTO et al., 2020).

Auch subklinische Endometritiden führen zu verringerter Fruchtbarkeit (KASIMANICKAM et al., 2004; GILBERT et al., 2005; LEE et al., 2018). Für sie existiert jedoch keine einfach anzuwendende, einheitlich als Goldstandard akzeptierte diagnostische Methode (DE BOER et al., 2014). Zudem kommen Studien zu therapeutischen Möglichkeiten bei subklinischer Endometritis zu uneinheitlichen Ergebnissen, sodass hier aktuell keine evidenzbasierte Therapieempfehlung ausgesprochen werden kann (GALVÃO et al., 2009a; GALVÃO et al., 2009b; WAGENER et al., 2017a; SHELDON et al., 2019). Auch die Ursachen von subklinischer Endometritis sind nicht abschließend geklärt und werden in der Literatur kontrovers diskutiert (GILBERT et al., 2007; HERATH et al., 2009; BRODZKI et al., 2015b). Daher ist die weitere Erforschung der subklinischen Endometritis, insbesondere der Pathogenese, von zentraler Bedeutung.

In diesem Zusammenhang sind die Proteine der Interleukin (IL) 1-Familie von besonderem Interesse, da diese direkten Einfluss auf das Entzündungsgeschehen nehmen. Für eine adäquate lokale Entzündungsregulation müssen das proinflammatorische Zytokin IL1B und der zugehörige Rezeptorantagonist IL1RA im passenden Verhältnis zueinander vorliegen (DINARELLO, 1996). Im Zusammenhang mit klinischer oder subklinischer Endometritis beim Rind war IL1B be-

reits Gegenstand zahlreicher *in vivo* wie *in vitro* durchgeführter Untersuchungen (FISCHER et al., 2010; SWANGCHAN-UTHAI et al., 2012; WAGENER et al., 2017b; PETER et al., 2018; HELFRICH et al., 2020). Dagegen sind die Regulation von IL1RA und das Verhältnis von Antagonist IL1RA zu Agonist IL1B in diesem Zusammenhang bisher wenig erforscht. Die vorliegende Arbeit verfolgte daher das übergeordnete Ziel, die entzündungsbedingte Regulation von IL1B und IL1RA im bovinen Uterus näher zu untersuchen. Dazu wurden inhaltlich und methodisch unterschiedliche Herangehensweisen gewählt.

Explantkulturen stellen eine gut geeignete Methode für die Untersuchung regulatorischer Mechanismen dar (BORGES et al., 2012). Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit eine Explantkultur mit bovinem Endometrium modifiziert und zur Untersuchung der Auswirkung ausgewählter Bakterien und Zytokine auf die Genexpression von IL1B und IL1RA verwendet werden.

Darüber hinaus sollten in dieser Arbeit auch Untersuchungen an Uterussekreten durchgeführt werden. Uterussekrete haben sich in vorausgegangenen Untersuchungen dieser Arbeitsgruppe als geeignetes Medium zur Pathogeneseforschung und Diagnose von subklinischer Endometritis erwiesen (HELFRICH et al., 2020; HILLMER et al., 2020). Unverdünt kann es jedoch nur in kleinen Mengen gewonnen werden, sodass für dessen Untersuchung Labormethoden erforderlich sind, die für kleine Probenvolumina geeignet sind. Bei HELFRICH et al. (2020) stellte sich die AlphaLISA-Technik als gut geeignet heraus. Nachdem für die Messung von bovinem IL1B bereits ein kommerzielles AlphaLISA-Kit existiert, war ein weiteres methodisches Ziel dieser Arbeit, einen *in house*-AlphaLISA zur Messung von bovinem IL1RA zu etablieren.

Mittels Explantkultur und AlphaLISA sollten schließlich folgende Hypothesen überprüft werden:

- 1) Pathogene, potenziell pathogene und potenziell protektive Bakterien unterscheiden sich in ihrem Effekt auf die Genexpression von IL1B und IL1RA im bovinen Endometrium.
- 2) Pro- und antiinflammatorische Zytokine modulieren die Genexpression von IL1B und IL1RA im bovinen Endometrium.
- 3) Subklinische Endometritis spiegelt sich im IL1RA/IL1B-Verhältnis in bovinem Uterussekrete wider.

## **II. LITERATURÜBERSICHT**

### **1. Immunologie der Fortpflanzungsorgane beim weiblichen Rind unter besonderer Berücksichtigung der Interleukin 1-Familie**

In den Fortpflanzungsorganen des weiblichen Rindes dienen Mechanismen der angeboren und der adaptiven Immunantwort zur Abwehr von Infektionserregern und der Gesunderhaltung des Gewebes (SHELDON et al., 2014). Die präzise Regulierung dieser Immunmechanismen ermöglicht einerseits eine angemessene Reaktion des Immunsystems auf pathologische Ereignisse wie Infektionen, andererseits die adäquate Anpassung der lokalen Abwehrbereitschaft im Rahmen der verschiedenen Zyklusphasen sowie der Etablierung und Erhaltung einer Trächtigkeit. Die Bedeutung einer angemessenen Regulation der lokalen Immunmechanismen für die Fruchtbarkeit wird in dieser Arbeit am Beispiel der Interleukin (IL) 1-Familie näher beleuchtet.

#### **1.1. Immunmechanismen im Reproduktionstrakt beim weiblichen Rind**

Als anatomische Barrieren stellen Schamabschluss, Vagina und Zervix die ersten Hindernisse für aufsteigende Keime dar. Hinzu kommen vaginaler und zervikaler Mukus als physikalisch-chemische Barriere (SHELDON et al., 2014; DADARWAL et al., 2017). Keime, die dennoch aufgestiegen sind, können von ‚pattern recognition receptors‘ (PRR) erkannt werden. PRR befinden sich auf der Oberfläche von Zellen, die dem Immunsystem zugeordnet werden, aber auch auf den Epithel- und Stromazellen des Endometriums (HERATH et al., 2006; DAVIES et al., 2008; TURNER et al., 2014). Neben Bestandteilen von aufgestiegenen Keimen, den ‚pathogen-associated molecular patterns‘ (PAMPs), erkennen PRR auch Hinweise auf geschädigtes oder gestresstes Gewebe, die ‚damage-associated molecular patterns‘ (DAMPs), wie z.B. freigesetzte ursprünglich intrazelluläre Proteine (PARK et al., 2006; ROELOFS et al., 2006; MOLteni & ROSSETTI, 2021). Auf die Erkennung von PAMPs und DAMPs hin werden zahlreiche Mechanismen wie die Induktion diverser körpereigener Effektoren in Gang gesetzt, welche im Folgenden beschrieben werden.

Eine PRR-Aktivierung führt zu einer gesteigerten Genexpression und Produktion proinflammatorischer Zytokine (ZHANG et al., 2019). Diese fördern Entzün-

dungsprozesse durch chemotaktische Aktivitäten wie die Rekrutierung und Aktivierung von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) und die Beteiligung an der Produktion weiterer entzündungsfördernder Faktoren wie Leukotriene, Cyclooxygenase Typ 2 und Prostaglandin E2 (PGE<sub>2</sub>) (LAAN et al., 1999; HOSHINO et al., 2000; DINARELLO, 2009; ISAILOVIC et al., 2015). Proinflammatorische Zytokine, die im Endometrium und im Uterussekret detektiert wurden, sind insbesondere die proinflammatorischen Interleukine IL1B, IL6 und IL17 $\alpha$ , das Chemokin IL8 und der Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) (PAULA-LOPES et al., 1999; DINARELLO, 2009; GÄRTNER et al., 2015; DADARWAL et al., 2019; ZHANG et al., 2019; HELFRICH et al., 2020).

Unter dem Einfluss proinflammatorischer Zytokine erfolgt auch die Rekrutierung und Aktivierung von Zellen des Immunsystems (SHELDON et al., 2014). PMN strömen in den Uterus ein und wirken dort eingedrungenen Mikroorganismen entgegen. Neben dieser initialen Infiltration, für die vor allem die chemotaktische Wirkung von IL8 bedeutend ist (ZERBE et al., 2003; MACKINTOSH et al., 2013), werden besonders unter dem Einfluss von IL6 auch Makrophagen und Lymphozyten rekrutiert (HURST et al., 2001). Der für die Reifung von Makrophagen bedeutsame Granulocyte-macrophage colony stimulating factor wurde im Epithel sowohl des Uterus als auch des Eileiters nachgewiesen (DE MORAES et al., 1999). B-Lymphozyten, T-Lymphozyten und Natürliche Killerzellen wurden auch im gesunden Uterus detektiert (OLIVEIRA et al., 2013). Dabei liegen B-Lymphozyten in Aggregaten im Stroma sowie an den Blutgefäßen im Myometrium vor (OLIVEIRA et al., 2013) und gelangen unter dem Einfluss von Chemokinen an die Schleimhautoberfläche (DADARWAL et al., 2017).

Zu den Zytokinen wird auch die Gruppe der Interferone gezählt, welche antivirale Eigenschaften besitzen (SAMUEL, 2001) und mit Ausnahme von Interferon  $\tau$  (IFN $\tau$ ) im Rahmen von viralen Infektionen induziert werden (ROBERTS et al., 1999). Im Mausmodell konnte auch bei bakteriell bedingter Endometritis eine antiinflammatorische Wirkung von IFN $\tau$  dargestellt werden (JIANG et al., 2017). Für die Typ I Interferone  $\alpha$  und  $\tau$  konnte außerdem *in vitro* ein hemmender Effekt auf die Sekretion von Prostaglandinen wie PGE<sub>2</sub> nachgewiesen werden (BARROS et al., 1991; DANET-DESNOYERS et al., 1994). Bei wissenschaftlichen Untersuchungen zu IFN $\tau$  beim Rind steht meist seine Funktion als embryonales Signal zur maternalen Trächtigkeitserkennung im Vordergrund (ROBERTS, 2007;

DORNIK et al., 2013; D'OCCHIO et al., 2020).

Werden eingedrungene Pathogene durch das Immunsystem erkannt, werden u.a. spezifische Immunglobuline synthetisiert. Immunglobuline binden an eingedrungene Mikroorganismen, um sie für phagozytierende Zellen zu markieren, Komplementfaktoren zu aktivieren oder die Adhäsion der Mikroorganismen an die Schleimhaut zu verhindern (CORBEIL et al., 1974; BUTLER, 1983; SINGH et al., 2008). In zahlreichen Studien konnte nach experimentell induzierten genitalen Infektionen mit *Leptospira*, *Campylobacter fetus*, *Trueperella pyogenes*, *Histophilus somni* oder *Tritrichomonas foetus* eine erhöhte Konzentration spezifischer Immunglobuline im Uterus-, Zervix- oder Vaginalsekret nachgewiesen werden. Hierbei wurden vor allem die Immunglobuline G und A, aber auch M und E detektiert (DUNCAN et al., 1972; CORBEIL et al., 1974; WATSON et al., 1990; BUTT et al., 1993; DHALIWAL et al., 1996; CORBEIL et al., 2005).

Die Aktivierung von PRR bewirkt weiter eine gesteigerte Genexpression und Produktion von antimikrobiellen Peptiden (AMP), welche aber auch allein durch proinflammatorische Zytokine induziert werden können (KING et al., 2002; DAVIES et al., 2008; ISHIGAME et al., 2009; CHAPWANYA et al., 2013; LEDGARD et al., 2015; IBRAHIM et al., 2016). Im Rahmen von lokalen immunologischen Vorgängen sind im Genitaltrakt des weiblichen Rindes vor allem S100-Proteine (S100A8, S100A9 und S100A12),  $\beta$ -Defensine (v.a. DEFB1, DEFB4A, DEFB5, DEFB300, Lingual Antimicrobial Peptide und Tracheal Antimicrobial Peptide) und Cathelicidine bedeutsam (DAVIES et al., 2008; CHAPWANYA et al., 2009; WATHES et al., 2009; CHAPWANYA et al., 2013; SWANGCHAN-UTHAI et al., 2013; FOLEY et al., 2015; LEDGARD et al., 2015; IBRAHIM et al., 2016). AMP können eingedrungenen Mikroorganismen auf unterschiedliche Art entgegenwirken. Manche AMP binden Mangan und Zink und senken damit deren Verfügbarkeit für Bakterien, welche diese zum Wachstum benötigen (CORBIN et al., 2008; KEHL-FIE et al., 2011). Andere bekämpfen Bakterien durch das Auslösen von autolytischen Vorgängen (BIERBAUM & SAHL, 1985) oder durch Beschädigung der Bakterienwand (SAHL et al., 2005). Darüber hinaus besitzen AMP chemotaktische Eigenschaften und können die Aktivierung von PMN bewirken (LACKMANN et al., 1992; RYCKMAN et al., 2003; VOGL et al., 2007). Des Weiteren wurde beschrieben, dass AMP proinflammatorische Effekte auslösen können, da sie selbst PRR aktivieren und proinflammatorische Zytokine induzie-

ren können (SUNAHORI et al., 2006; VAN LENT et al., 2010; DESSING et al., 2015). Unter anderen Versuchsbedingungen wurden dagegen entzündungshemmende Effekte von AMP durch Bindung von proinflammatorischen Zytokinen und eine abstoßende Wirkung auf neutrophile Granulozyten beobachtet (IKEMOTO et al., 2007; SROUSSI et al., 2007; DONATO et al., 2013). Neben diesen allgemeinen Eigenschaften von AMP ist im Hinblick auf den Genitaltrakt außerdem zu erwähnen, dass eine erhöhte AMP-Konzentration die Lebens- und Bewegungsfähigkeit von Spermien sowie die embryonale Entwicklung beeinträchtigt (FUNESHIMA et al., 2020) und mit frühen Aborten assoziiert wird (NAIR et al., 2015).

Ebenfalls sehr potente Entzündungsmediatoren sind Akute-Phase-Proteine. Sie wirken u.a. als Komplementfaktoren im Rahmen der Opsonisierung und als Vasodilatoren (BRÖKER, 2019). Im Uterus wurden aus dieser Gruppe die Proteine Haptoglobin, Serum Amyloid A und C-reaktives Protein detektiert. Teilweise wurde hierbei eine verstärkte Genexpression und Produktion im Falle einer Endometritis oder einer Entzündungssimulation mittels Lipopolysacchariden nachgewiesen (BRODZKI et al., 2015b; BRODZKI et al., 2015a; ZHANG et al., 2018; TANAI et al., 2020).

Eine wichtige Rolle für das lokale Entzündungsgeschehen spielt auch der Lipidmediator PGE<sub>2</sub>, welcher durch eine Aktivierung von PRR induziert werden kann und u.a. für Vasodilatation und Plasmaexsudation verantwortlich ist (WILLIAMS, 1979; SHELDON et al., 2014; SALVI et al., 2016).

Darüber hinaus wurden im bovinen Uterus verschiedene Mucine nachgewiesen (DAVIES et al., 2008; WAGENER et al., 2017b), welche ebenfalls die Abwehr von eingedrungenen Mikroorganismen unterstützen (BRAYMAN et al., 2004; PLUTA et al., 2012).

All diese Prozesse ermöglichen im Fall von eingedrungenen Infektionserregern eine Entzündungsreaktion und somit eine Elimination oder Hemmung des Wachstums von Mikroorganismen durch das angeborene und das adaptive Immunsystem. Um jedoch ein Überschießen der Entzündung zu verhindern und nach Beseitigung der Noxe die Abdämpfung der Immunreaktion zu bewirken, sind Mechanismen der Gegenregulation ebenfalls von erheblicher Bedeutung. Die antiinflammatorischen Zytokine IL4, IL10 und IL13 hemmen die Genexpression von

proinflammatorischen Zytokinen wie IL1, TNF $\alpha$  und Chemokinen (DINARELLO, 2000). Rezeptorantagonisten (RA) wie IL1RA, IL36RA und IL38 verhindern die Wirkung von proinflammatorischen Agonisten, indem sie deren Rezeptoren blockieren (DINARELLO, 2009; TOWNE et al., 2011; VAN DE VEERDONK et al., 2012). Neben den antiinflammatorischen Zytokinen spielen außerdem Resolvine aus der Gruppe der Lipidmediatoren eine Rolle bei der Rückbildung einer Entzündung (SHELDON et al., 2014).

## 1.2. Spezielle Betrachtung der IL1-Familie

Zur Familie der IL1-Zytokine gehören sowohl proinflammatorisch als auch antiinflammatorisch wirkende Vertreter. Im Folgenden werden die IL1-Zytokine mit der zugehörigen Physiologie und Pathologie speziesübergreifend näher beschrieben.

### 1.2.1. Bestandteile der IL1-Familie

IL1A und IL1B: IL1A und IL1B sind proinflammatorische Zytokine, die hauptsächlich von Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen sowie von B-Lymphozyten und natürlichen Killerzellen produziert werden. Diese Zytokine können aber auch von Epithel- und Stromazellen des bovinen Endometriums synthetisiert werden (PAULA-LOPES et al., 1999; DINARELLO, 2009). Ihre Synthese wird, wie in II.1.1. beschrieben, durch die Aktivierung von PRR angeregt (DINARELLO, 2005b). Darüber hinaus können sowohl IL1A als auch IL1B die eigene Synthese und die des jeweils anderen fördern (DINARELLO et al., 1987; LI & SMITH, 2013). Beide Zytokine beschleunigen ein Entzündungsgeschehen durch die Anregung der Synthese von weiteren entzündungsfördernden Faktoren wie PGE<sub>2</sub>, Leukotrienen, proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen (DINARELLO, 2000, 2005a, 2009). IL1A funktioniert dabei als sogenanntes Alarmin, d.h. es liegt intrazellulär in bioaktiver Form vor. Nur bei Zellschäden liegt es auch extrazellulär vor und stellt dann ein Alarmsignal dar (CHEN et al., 2007; YAZDI & GHORESCHI, 2016). Dagegen wird IL1B aktiv sezerniert und muss für eine bioaktive Wirkung mittels Caspase-1 aktiviert werden (BLACK et al., 1988; THORNBERRY et al., 1992; BAUERNFEIND et al., 2011; PICCIOLI & RUBARTELLI, 2013).

IL1R1, IL1R2 und IL1R3: Die Wirkung von IL1A und IL1B wird durch den Rezeptor IL1R1 vermittelt (SIMS et al., 1988). Nachdem IL1A oder IL1B an IL1R1

gebunden haben, verändert IL1R1 seine Struktur. Der Co-Rezeptor IL1R3 kann nach der Konformationsänderung von IL1R1 ebenfalls an IL1R1 binden, ohne dabei Kontakt zu IL1A oder IL1B zu haben. Diese Bindung von IL1R3 an IL1R1 komplettiert die Aktivierung (DINARELLO, 2018). Darüber hinaus stellt IL1R2 einen weiteren Rezeptor für IL1B dar. Die Bindung von IL1B an IL1R2 löst jedoch keine weitere Reaktion aus und stellt somit eine Neutralisation dar (COLOTTA et al., 1993; DINARELLO, 2009).

Interleukin 1-Rezeptorantagonist (IL1RA): IL1RA bindet an IL1R1 mit der gleichen Affinität wie IL1A und IL1B (HANNUM et al., 1990). Dabei erfolgt jedoch keine Aktivierung des Rezeptors, da IL1RA eine Bindungsstelle weniger als IL1A und IL1B besitzt und somit eine Domäne des Rezeptors unberührt bleibt (EVANS et al., 1995). Dadurch kann IL1RA die entzündungsfördernde Wirkung von IL1A und IL1B hemmen. Um die Bindung von IL1A oder IL1B an IL1R1 in ausreichendem Maße zu verhindern, muss IL1RA jedoch in einer zehnfach bis tausendfach höheren Konzentration als die beiden Rezeptoragonisten vorliegen (DINARELLO, 1996). Bei *in vitro*-Versuchen wurde beobachtet, dass die Konzentration von IL1RA je nach Gewebeart 5- bis 100-mal so hoch wie die von IL1A oder IL1B sein muss, um die durch letztere induzierten Effekte um 50 % zu hemmen (AREND et al., 1990). Diese Beobachtungen werden zum einen durch die kurze Halbwertszeit, die schnelle Exkretion und die langsame Rezeptorbindung von IL1RA erklärt (DINARELLO, 1996). Zum anderen stellen die starke Expression von IL1R1 auf vielen Zellen sowie eine effektive Wirkung von IL1A und IL1B bereits bei nur wenigen aktivierten Rezeptoren mögliche Erklärungen dar (GABAY et al., 2010). Wie die beiden proinflammatorischen Agonisten kann auch IL1RA u.a. von den Zellen des Endometriums produziert werden (BELLEHUMEUR et al., 2009; ZLATSKA et al., 2017). Eine Induktion von IL1RA kann durch IL1B (BELLEHUMEUR et al., 2009; LI & SMITH, 2013) sowie durch die Interleukine IL10 und IL6 (JENKINS et al., 1994; JORDAN et al., 1995) und verschiedene Infektionserreger (JORDAN et al., 1995; SMEEKENS et al., 2015) erfolgen.

Weitere Mitglieder der IL1-Familie: Darüber hinaus gehören zur IL1-Familie die proinflammatorischen Interleukine IL18, IL33, IL36A, IL36B und IL36G, die antiinflammatorischen Interleukine IL36RA, IL37 und IL38, sowie die Rezeptoren IL18R $\alpha$ , IL36R und ST2 (YAZDI & GHORESCHI, 2016).

### **1.2.2. Konzentrationsveränderungen von IL1A, IL1B und IL1RA in Zusammenhang mit verschiedenen Krankheitsbildern**

Bei verschiedenen chronisch-entzündlichen Erkrankungen liegt eine übermäßige Produktion von IL1A und IL1B vor. In der Humanmedizin wird in manchen Fällen das daraus entstehende Ungleichgewicht zwischen IL1A bzw. IL1B und IL1RA durch die Gabe von rekombinantem IL1RA, bezeichnet als Anakinra, behandelt. Beispiele für erfolgreiche Behandlungen mit Anakinra sind für die systemische juvenile idiopathische Arthritis (PASCUAL et al., 2005), die autoinflammatorische Erkrankung Muckle-Wells Syndrom (HAWKINS et al., 2003) oder Verläufe der rheumatologischen Erkrankung Morbus Still, die nicht auf eine Kortisoltherapie ansprechen (FITZGERALD et al., 2005), beschrieben. Auch bei entzündlichen Erkrankungen der Fortpflanzungsorgane sind häufig Veränderungen im IL1-System zu beobachten. So besteht bei der Kuh ein Zusammenhang zwischen klinischer oder subklinischer Endometritis und einer erhöhten Genexpression von IL1A, IL1B und IL1RA im Endometrium (GABLER et al., 2009; DADARWAL et al., 2019). Bei der Stute wurden Unterschiede in der Regulation der Genexpression von IL1B und IL1RA im Endometrium zwischen gesunden Tieren und solchen, die für Post-Breeding-Endometritis empfänglich sind, beobachtet (CHRISTOFFERSEN et al., 2012; WOODWARD et al., 2013).

### **1.2.3. Das IL1-System in Bezug auf die weiblichen Fortpflanzungsorgane**

Wie in II.1.1. beschrieben, stellen die Bestandteile der IL1-Familie als pro- bzw. antiinflammatorische Zytokine einen sehr wichtigen Teil der lokalen Immunmechanismen der weiblichen Fortpflanzungsorgane dar. Die Steuerung der Genexpression und Produktion der IL1-Proteine unterliegt dort auch den Einflüssen von reproduktionsbiologischen Ereignissen. Außerdem sind Veränderungen der Regulation von IL1A, IL1B und IL1RA auch mit Fortpflanzungsstörungen assoziiert. Beides wird nachfolgend näher beschrieben.

#### **1.2.3.1. Physiologische Veränderungen im Zyklusverlauf des Rindes**

Aufgrund der Unterschiede zwischen den ovariellen Zyklen der Säugetiere wird in diesem Kapitel ausschließlich auf den Zyklus des Rindes eingegangen. Für die Genexpression und Produktion von IL1B im bovinen Endometrium sind Schwankungen entlang des ovariellen Zyklusverlaufs beschrieben. Verglichen mit der Lutealphase wurde im Zeitraum um die Ovulation eine vermehrte Genexpression

von IL1B in endometrialen Zellen nachgewiesen (FISCHER et al., 2010). Jedoch wurden auch örtliche Unterschiede innerhalb des Endometriums beschrieben: Bei PAULA-LOPES et al. (1999) konnte im luminalen endometrialen Epithel im Verlauf des ovariellen Zyklus am Zyklustag 0 die höchste Proteinkonzentration von IL1B detektiert werden, während im glandulären Epithel wie auch in uterinen Spülungen über die verschiedenen Zyklusphasen hinweg keine Unterschiede in der IL1B-Konzentration gezeigt werden konnten. In Bezug auf IL1RA konnte eine erhöhte Genexpression im bovinen Endometrium unmittelbar nach der Ovulation im Vergleich zur präovulatorischen Phase und der Lutealphase gezeigt werden (GABLER et al., 2009).

### **1.2.3.2. Das IL1-System in Bezug auf die Etablierung und Erhaltung einer Trächtigkeit**

Im Rahmen der Entstehung, Etablierung und Erhaltung einer Trächtigkeit sowie der Geburt erfolgt physiologischerweise eine spezifische Regulierung von IL1A, IL1B, IL1RA und anderen Entzündungsmediatoren. Für bestimmte reproduktionsmedizinische Ereignisse wie Dezidualisierung, Implantation oder das Erzeugen von Wehen spielt die Steigerung von Entzündungsmediatoren wie IL1A und IL1B eine wichtige Rolle, wie nachfolgend näher beschrieben wird. Generell ist jedoch für die Toleranz eines semiallogenen Fetus im maternalen Organismus und die Aufrechterhaltung einer Trächtigkeit eine ausreichende Kontrolle von entzündlichen Prozessen nötig (NADEAU-VALLÉE et al., 2016). Eine adäquate Regulierung des IL1-Systems ist also für eine erfolgreiche Fortpflanzung von Bedeutung.

Die Rolle des IL1-Systems bei der embryomaternalen Kommunikation und der Implantation wurde bisher vor allem im Mausmodell und beim Menschen erforscht. In einer Untersuchung von BOURDIEC et al. (2014) konnte dargestellt werden, dass die Genexpression des Rezeptors IL1R1 im Endometrium der Maus in den ersten beiden Tagen der Trächtigkeit vorübergehend ansteigt. Die Autoren werten dies als Reaktion auf die Samenflüssigkeit. Wie in II.1.2.1. beschrieben, vermittelt IL1R1 bei Aktivierung ein Entzündungsgeschehen. Gleichzeitig konnte in den ersten beiden Tagen der Trächtigkeit auch ein vorübergehender Anstieg der Genexpression der beiden entzündungshemmenden Komponenten IL1R2 und IL1RA im Endometrium gezeigt werden. Am vierten Trächtigkeitstag, an dem bei der Maus der Implantationszeitraum beginnt (WANG & DEY, 2006), wurde dann

nochmals ein Anstieg der Genexpression von IL1R1 im Endometrium detektiert, jedoch kein Anstieg der Genexpression von IL1R2 und IL1RA. Wird IL1RA bei Mäusen ab dem ersten Trächtigkeitstag artifiziell zugeführt, kommt es trotz normaler Entwicklung der Embryonen zur Beeinträchtigung der Implantation (SIMÓN et al., 1994b; SIMÓN et al., 1998). *In vitro* konnte eine Beteiligung von IL1RA an der durch Toll-like-Rezeptor-3 induzierten Hemmung der Adhäsion von Trophoblastzellen an endometriale Zellen dargestellt werden (MONTAZERI et al., 2016). Andererseits konnte eine reduzierte Fruchtbarkeit bei Mäusen mit IL1RA-Knockout gezeigt werden (KREINES et al., 2018). Murine und humane Embryonen produzieren zu einem sehr frühen Zeitpunkt IL1B, IL1RA und IL1R1 (DE LOS SANTOS et al., 1996; HUANG et al., 1997). Bei diesen Spezies wird dies als wichtiges und frühes Signal der embryomaternalen Kommunikation angesehen (SIMÓN et al., 1994a). Eine starke Produktion von IL1A durch menschliche Embryonen, die im Rahmen einer *in vitro*-Fertilisation (IVF) eingesetzt wurden, steht in Zusammenhang mit einer erfolgreichen Implantation (SHETH et al., 1991). Auch ein Anstieg der Konzentration von IL1B im Serum von Frauen im Verlauf einer IVF-Behandlung wird mit dem Behandlungserfolg assoziiert (KREINES et al., 2018). Aufgrund der großen Unterschiede zwischen den embryomaternalen Kommunikationsmechanismen verschiedener Säugetiere ist jedoch die Übertragbarkeit dieser Ergebnisse auf das Rind eingeschränkt.

Im weiteren Verlauf einer Schwangerschaft scheint eine ausreichend hohe Konzentration des antiinflammatorischen IL1RA im Uterus von Bedeutung zu sein. Bei der Frau wurde ein Zusammenhang zwischen einem Allel, welches mit der Synthese eines „low-function“-IL1RA-Protein assoziiert wird, und dem Auftreten von wiederholten Aborten beobachtet (AVILA-VERGARA et al., 2018). Andere Autoren beschrieben einen Zusammenhang zwischen einem Genpolymorphismus, der die Transkriptionsaktivität von IL1RA beeinflusst, und wiederholten Frühaborten (TARLOW et al., 1993; NAIR et al., 2014). Bei trächtigen Stuten wurde eine höhere endometriale Genexpression von IL1RA nach der Implantation im Vergleich zu trächtigen Stuten vor der Implantation oder zu zyklischen Stuten vorgefunden (HANEDA et al., 2009). Beim Rind konnte gezeigt werden, dass die IL1B-Konzentration in Gebärmuttersspülproben zwischen dem 17. und dem 25. Tag der Trächtigkeit absinkt (DAVIDSON et al., 1995). Zudem konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass gegen Ende der Trächtigkeit sowohl IL1A als

auch IL1B die Kontraktion von myometrialen Zellen fördert (ROMERO et al., 1989; TRIBE et al., 2003; CHEVILLARD et al., 2007). Dies könnte die Erforderlichkeit einer adäquaten Hemmung der Wirkung von IL1A und IL1B durch IL1RA bis zum Zeitpunkt der Geburt begründen.

## **2. Gebärmuterentzündung beim Rind unter besonderer Berücksichtigung der subklinischen Endometritis**

SHELDON et al. (2009b) konnten in einer Metanalyse zeigen, dass die Gebärmuterentzündung beim Rind nicht nur das Wohlbefinden, sondern auch die Fruchtbarkeit und somit die Wirtschaftlichkeit der betroffenen Tiere beeinträchtigt. Sie ist eine für Veterinärmedizin und Landwirtschaft bedeutsame Erkrankung.

### **2.1. Begriffsbestimmungen und Erscheinungsbild**

Die vielfältigen Erscheinungsformen der Gebärmuterentzündung beim Rind können anhand folgender Aspekte unterteilt werden: Pathologisch-anatomisch, histopathologisch und klinisch. Da die verschiedenen existierenden Bezeichnungen nicht immer einheitlich angewendet werden, kommen in der vorliegenden Arbeit die Definitionen nach SHELDON et al. (2006) zur Anwendung:

#### Puerperale Metritis:

Beim Vorliegen systemischer Symptome wie Fieber, Mattigkeit oder Rückgang der Milchleistung aufgrund einer Gebärmuterentzündung in Verbindung mit einem pathologisch vergrößerten Uterus und übelriechendem wässrig-braunen Ausfluss, wird die Erkrankung als puerperale Metritis bezeichnet.

#### Klinische Metritis:

Die klinische Metritis wird durch einen pathologisch vergrößerten Uterus mit purulentem Ausfluss innerhalb der ersten 21 Tage post partum (p.p.) unter Abwesenheit von systemischen Entzündungssymptomen definiert.

#### Klinische Endometritis:

Klinische Endometritis (KE) wird durch eitrigen Ausfluss nach dem 21. Tag p.p. ohne Störungen des Allgemeinbefindens definiert. Dabei wird zwischen purulent (Anteil des Eiters > 50 %) und mukopurulent (Anteil des Eiters ≤ 50 %) unterschieden.

### Pyometra:

Kommt es während des Bestehens eines persistierenden Corpus luteums und einer geschlossenen Zervix zu einer intrauterinen Ansammlung von Eiter, wird die Erkrankung als Pyometra definiert.

### Subklinische Endometritis:

Subklinische Endometritis (SE) liegt bei einem zu hohen Anteil an PMN in der zytologischen Untersuchung bei gleichzeitiger Abwesenheit von klinischen Symptomen nach dem 21. Tag p.p. vor. Als Grenzwert des Referenzbereiches nennt SHELDON et al. (2006) einen PMN-Anteil über 18 % während der Zeitspanne zwischen 21 und 33 Tagen p.p. sowie über 10 % während der Zeitspanne zwischen 34 und 47 Tagen p.p.. Hinsichtlich des im gesunden Uterus maximal vorliegenden PMN-Wertes bestehen in der Literatur jedoch unterschiedliche Ansichten (siehe II.2.4.5.).

## **2.2. Prävalenz**

Puerperale Metritis wurde in einer Untersuchung von BENZAQUEN et al. (2007) bei 21 % der involvierten Kühe festgestellt. Für KE ermittelten BENZAQUEN et al. (2007) eine Inzidenz von 24 % bis zum 30. Tag p.p., LEBLANC et al. (2002a) eine Prävalenz von 17 %. Die Angaben zur Prävalenz von SE variieren in der Literatur stark. Einflussfaktoren auf die Prävalenzergebnisse sind der gewählte PMN-Anteil in endometrialen Abstrichen oder Gebärmutterspülproben, ab dem bei der zytologischen Untersuchung die Diagnose der SE gestellt wird (vgl. II.2.4.5.) und der zeitliche Abstand zwischen Probenentnahme und der vorausgegangenen Geburt. Die Spanne der Prävalenzwerte reicht von 12 % bis 94 % (KAUFMANN et al., 2009; SALASEL et al., 2010). Zudem wurden große Varianzen zwischen verschiedenen Herden trotz gleichbleibender Untersuchungsmethode beschrieben (GILBERT et al., 2005).

## **2.3. Ätiologie, Pathogenese und prädisponierende Faktoren**

Faktoren, welche auf die Entstehung und Entwicklung der Gebärmutterentzündung beim Rind Einfluss nehmen, werden im Folgenden näher beschrieben. Aufgrund der Komplexität wird dabei auf die SE gesondert eingegangen.

### **2.3.1. Intrauterine Infektionen**

Gebärmutterentzündungen werden beim Rind vor allem in den ersten Wochen

nach der Geburt diagnostiziert (SHELDON et al., 2009a). Bei der Geburt können Bakterien aus dem Umfeld oder von der Haut der Kuh in den Uterus gelangen. In Studien konnten bei über 90 % der untersuchten Kühe in den ersten zwei Wochen nach der Geburt Bakterien aus dem Uterus isoliert werden. Dieser Anteil reduzierte sich im Verlauf des Puerperiums (GRIFFIN et al., 1974; SMITH & RISCO, 2002). Allerdings führt die Kontamination des Uterus mit Bakterien nach der Geburt nicht grundsätzlich dazu, dass nachfolgend das betroffene Tier eine Gebärmutterentzündung erleidet oder die Fruchtbarkeit beeinträchtigt wird (HUSSAIN et al., 1990). Entscheidend für die Entstehung und den Verlauf einer möglichen Gebärmutterentzündung sind die Pathogenität der Bakterien und die Immunität der betroffenen Kuh (FÖLDI et al., 2006; SHELDON et al., 2009a). Als Hauptpathogene im postpartalen Uterus des Rindes werden *Escherichia coli* (*E. coli*), *Trueperella pyogenes*, *Prevotella species pluralis* (*spp.*) und *Fusobacterium necrophorum* angesehen (BONNETT et al., 1991; DOHMEN et al., 2000; WILLIAMS et al., 2005; DONOFRIO et al., 2008).

Weniger eindeutig ist die Bedeutung potenziell pathogener Keime wie *Bacillus spp.* In einer Untersuchung von WAGENER et al. (2015) konnte im Zeitraum bis 28 Tage p.p. bei 10 % der beprobten Kühe *Bacillus spp.* detektiert werden. Über die Hälfte dieser Isolate stellten *Bacillus pumilus* (*B. pumilus*) dar. GÄRTNER et al. (2016) konnten zeigen, dass eine Koinkubation mit *B. pumilus* *in vitro* proinflammatorisch auf bovine endometriale Epithelzellen wirkt und den Zelltod auslösen kann. Dennoch zeigte die begleitende vaginoskopische Untersuchung bei WAGENER et al. (2015), dass sich unter den von *B. pumilus* betroffenen Tieren neben Kühen mit KE auch klinisch unauffällige Kühe befanden.

Grundsätzlich ist das Lumen des bovinen Uterus nicht als steril anzusehen. Auch im Uterus gesunder Kühe mit abgeschlossenem Puerperium sind Bakterien nachweisbar, darunter insbesondere *Proteobacteriae*, zu denen unter anderem die Gattung *Escherichia* gehört, und *Firmicutes*, zu denen neben der Gattung *Bacillus* auch *Staphylococcus* und *Clostridium* sowie die kommensalen *Lactobacilli* gezählt werden (CLEMMONS et al., 2017; LIETAER et al., 2021). Es wurden jedoch Unterschiede in der Zusammensetzung der mikrobiellen Besiedlung von Kühen mit klinischer Metritis und Kühen mit einem normalen Verlauf des Puerperiums beschrieben (PENG et al., 2013; BICALHO et al., 2017).

Neben bakteriellen Infektionen werden auch Infektionen mit dem bovinen Her-

pesvirus Typ 4 und dem bovinen Virusdiarrhoe-Virus mit Metritis und Endometritis in Verbindung gebracht (GÜR & DOĞAN, 2010; CHENG et al., 2017).

### **2.3.2. Weitere Risikofaktoren**

Neben der Bedeutung von Infektionserregern sind weitere Risikofaktoren zu beachten, die mit dem Auftreten von entzündlichen Erkrankungen des Uterus assoziiert sind: Dystokie, Totgeburten, ein niedriger Body-Condition-Score, Nachgeburtshaltung und mangelnde Stallhygiene korrelieren direkt mit dem Auftreten von KE und SE (PASCAL et al., 2021). Darüber hinaus zeigte sich in einer Untersuchung von MANRÍQUEZ et al. (2020) ein erhöhtes Risiko für puerperale und klinische Metritis nach Überschreiten der physiologischen Trächtigkeitsdauer, sowie bei einer verkürzten Trockenstehphase (< 30 Tage) für puerperale Metritis.

### **2.3.3. Ätiologie, Pathogenese und prädisponierende Faktoren für SE**

Eine SE entwickelt sich häufig aus einer vorausgegangenen klinischen Metritis (CHEONG et al., 2011; LEE et al., 2018). Jedoch sind auch Fälle von SE beschrieben, bei denen zuvor keine klinische Metritis diagnostiziert worden war (BARAŃSKI et al., 2012).

Während bakterielle Infektionen sowie uterine Läsionen die Entstehung von klinischen Metritiden zu fördern scheinen, wird mit SE vor allem die Dysregulation der lokalen Immunmechanismen assoziiert (LEBLANC, 2014). In diesem Zusammenhang wird auch eine Dysregulation der puerperalen Entzündung mit der Entwicklung von SE in Verbindung gebracht (LEBLANC, 2014). Diese Entzündungsprozesse werden als physiologischer Vorgang angesehen (CHAPWANYA et al., 2012) und daher bei HELFRICH (2018) als ‚physiologische puerperale Entzündung‘ (PPE) bezeichnet. Die PPE ist an der Ablösung der Nachgeburt, der Reinigung des Uterus von aufgestiegenen Bakterien und der Wiederherstellung der Epithelintegrität beteiligt. Deshalb ist die PPE wichtig für die Regeneration des Uterus und das Wiedererlangen eines physiologischen Zustandes des Endometriums nach der Geburt (HERATH et al., 2009; GABLER et al., 2010; CHAPWANYA et al., 2012; LEBLANC, 2014; SHELDON et al., 2014). Im Rahmen der PPE ist die Genexpression proinflammatorischer Zytokine wie IL1B, IL8 und IL6 im bovinen Endometrium während des klinischen Puerperiums erhöht (GABLER et al., 2010). Zum Ende einer unauffälligen PPE erfolgt jedoch eine effektive Gegenregulation der lokalen Immunabwehr auf die basale Aktivität

(LEBLANC, 2014). Im Hinblick auf einen möglichen Zusammenhang zwischen einer dysregulierten puerperalen Entzündung und der Entwicklung einer SE existieren in der Literatur verschiedene, nachfolgend vorgestellte Hypothesen.

Einige Untersuchungen deuten auf die Entwicklung einer SE als Folge einer zu schwachen puerperalen Entzündung hin. GALVÃO et al. (2011) detektierten 12 h sowie eine Woche p.p. eine reduzierte Genexpression der proinflammatorischen Zytokine IL1B und Tumornekrosefaktor  $\alpha$  im Endometrium von Kühen, die später eine SE entwickelten, gegenüber Kühen, die gesund blieben. Auch eine Suppression der lokalen Immunabwehr p.p. durch erhöhte Konzentrationen des antiinflammatorischen Zytokins IL10 wird mit der Entwicklung von SE in Verbindung gebracht. Jedoch sind die Angaben in der Literatur diesbezüglich nicht einheitlich. So wiesen BRODZKI et al. (2015b) in der ersten Woche p.p. in Uterusspülproben von Kühen, die später eine SE entwickelten, eine im Vergleich zu gesund bleibenden Kühen erhöhte IL10-Konzentration nach. In einer Untersuchung von GALVÃO et al. (2011) zeigte sich jedoch bezüglich der IL10-Genexpression in endometrialen Biopaten, die wöchentlich ab 12 h p.p. gewonnen wurden, kein Unterschied zwischen den Kühen, die eine SE entwickelten, gegenüber solchen, die gesund blieben.

Eine mögliche Folge einer abgeschwächten puerperalen Entzündung ist die unvollständige Elimination von bei der Geburt aufgestiegenen Bakterien aus dem Uterus. Dadurch können dauerhafte Expositionen des Endometriums fortbestehen, welche die lokalen Immunmechanismen aktivieren und so das Entstehen einer chronischen Endometritis fördern (GILBERT et al., 2007; BRODZKI et al., 2015b). So konnten GHANEM et al. (2015) zeigen, dass das Persistieren von Bakterien im Uterus über mehrere Wochen p.p. mit der Entwicklung einer SE assoziiert ist.

Im Gegensatz dazu kann die Entwicklung einer SE auch als Folge einer übersteigerten Immunreaktion p.p. betrachtet werden. HERATH et al. (2009) zeigten eine stärkere endometriale Genexpression proinflammatorischer Zytokine wie IL1A und IL1B in der ersten Woche p.p. bei Kühen, die später eine SE entwickelten, im Vergleich zu Kühen, die gesund blieben. Darüber hinaus war zu diesem Zeitpunkt bei den später erkrankten Tieren ein größeres Verhältnis der Genexpression des proinflammatorischen Zytokins IL1 zu der des antiinflammatorischen Zytokins IL10 feststellbar.

Das Risiko für die Entwicklung einer SE wird neben den in II.2.3.2. beschriebenen allgemeinen Faktoren auch durch metabolische Erkrankungen wie Ketose erhöht (CHEONG et al., 2011). In einer Studie von ESPOSITO et al. (2020) untersuchten die Autoren das Endometrium von Kühen, die peripartal eine restriktive Fütterung erhielten, welche zu erhöhten Werten an freien, unveresterten Fettsäuren und dem Ketonkörper  $\beta$ -Hydroxybutyrat im Blut führte. Dabei konnte in der uterinen zytologischen Untersuchung am 14. und am 28. Tag p.p. höhere PMN-Anteile gegenüber einer nicht restriktiv gefütterten Vergleichsgruppe festgestellt werden. Außerdem war die endometriale Genexpression der proinflammatorischen Zytokine IL1 und IL8 am 35. Tag p.p. bei den restriktiv gefütterten Kühen erhöht. Auch *in vitro* konnte ein stimulierender Einfluss von freien, unveresterten Fettsäuren auf die Produktion proinflammatorischer Zytokine in bovinen endometrialen Epithelzellen dargestellt werden (CHANKEAW et al., 2018).

#### **2.4. Diagnostik klinischer und subklinischer Gebärmutterentzündungen**

Zur Diagnose von klinischer und subklinischer Gebärmutterentzündung können verschiedene Techniken eingesetzt werden, welche nachfolgend näher beschrieben werden.

##### **2.4.1. Äußere Adspektion**

Bei der klinischen Untersuchung sollte zunächst auf äußerlich sichtbaren Ausfluss an Vulva, Perineum oder Schwanzunterseite geachtet werden, welcher gegebenenfalls anhand von Farbe, Konsistenz und Geruch beurteilt werden kann (LEBLANC et al., 2002a).

##### **2.4.2. Transrektale Palpation**

Durch transrektale Palpation können Größe, Symmetrie, Fluktuation und Kontraktibilität des Uterus beurteilt und so klinische Symptome einer Entzündung festgestellt werden. Allerdings gilt die alleinige Anwendung dieser Methode als wenig sensitiv für die Detektion von Endometritiden (GILBERT et al., 2005).

##### **2.4.3. Beurteilung des Vaginalschleims**

Um auch bei unauffälliger äußerer Adspektion Vaginalschleim auf Veränderungen von Farbe, Konsistenz und Geruch untersuchen zu können, stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. Zum einen kann eine vaginoskopische Untersuchung unter Zuhilfenahme eines Spekulum durchgeführt werden. Verschiedene

Studien kommen zu dem Schluss, dass zur Erhöhung der Sensitivität statt alleiniger transrektaler Palpation eine Kombination mit einer vaginoskopischen Untersuchung anzuraten ist (MILLER et al., 1980; LEBLANC et al., 2002a). Zum anderen kann mittels manueller vaginaler Exploration Schleim aus der Vagina gewonnen und anschließend beurteilt werden. Alternativ kann dazu ein Metricheck-Instrument eingesetzt werden. Dies besteht aus einem etwa 50 cm langen Stab, an dessen Spitze eine Silikonkappe angebracht ist. Das Instrument wird vaginal eingeführt und anschließend wieder zurückgezogen, wobei sich Schleim aus der Vagina in der Silikonkappe ansammelt. Dieser Schleim wird nachfolgend auf Eiterbeimengungen kontrolliert (PLETICHA et al., 2009).

#### **2.4.4. Ultrasonographische Untersuchung**

Mittels transrektaler ultrasonographischer Untersuchung des Uterus können intrauterine Flüssigkeitsansammlungen als Symptom einer Entzündung detektiert werden. BARLUND et al. (2008) ermittelten für diese Methode zur Diagnosestellung einer Endometritis eine Sensitivität von 30,8 % und eine Spezifität von 92,8 %. Des Weiteren kann bei der transrektalen ultrasonographischen Untersuchung des Uterus die Dicke des Endometriums beurteilt werden. Hierfür ist zur Detektion von Endometritiden von BARLUND et al. (2008) eine Sensitivität von 3,9 % und eine Spezifität von 89,2 % beschrieben (Referenzmethode jeweils zytologische Untersuchung mit Cytobrush-Methode (siehe II.2.4.5.)).

#### **2.4.5. Zytologische Untersuchung**

Durch die zytologische Untersuchung des Endometriums kann die Anwesenheit von PMN festgestellt werden, welche im Verlauf einer Entzündung in den Uterus einwandern (vgl. II.1.1.). Zur Gewinnung des Zellmaterials existieren verschiedene Methoden, die nachfolgend beschrieben werden.

Bei der Uterusspülung wird Natriumchloridlösung in den Uterus infundiert und ein Teil der Flüssigkeit durch Aspiration wiedergewonnen. Nach Zentrifugation der Flüssigkeit wird das gewonnene Zellmaterial auf einen Objektträger übertragen, fixiert und gefärbt. Anschließend wird mit Hilfe eines Mikroskops die Zusammensetzung, insbesondere der Anteil an PMN, beurteilt (GILBERT et al., 2005; VAN SCHYNDEL et al., 2018).

Eine andere Methode zur Gewinnung von Zellmaterial stellt die Cytobrush-Methode dar. Dabei wird ein Abstrichbürstchen genutzt, welches erst über das

Endometrium und anschließend über einen Objektträger gerollt wird (KASIMANICKAM et al., 2004). Angaben zur Sensitivität der Untersuchung auf subklinische Endometritis mittels Cytobrush variieren je nach Zeitpunkt der Beprobung zwischen 17 % und 86 %, die Angaben zur Spezifität zwischen 42 % und 92 % (DE BOER et al., 2014).

Zudem wurde die Methode des Cytotapes entwickelt. Dabei wird während der künstlichen Besamung endometriales Zellmaterial mit Hilfe eines Klebebandes gewonnen, welches am tierseitigen Ende der Besamungspipette befestigt ist. Während der Passage von Vagina und Zervix befindet sich das Cytotape innerhalb eines über die Besamungspipette gestülpten Kunststoffstabes und ist so vor Kontamination geschützt. Erst im Uterus wird die Spitze der Besamungspipette und somit das Cytotape aus dem umhüllenden Kunststoffstab hervorgeschoben. Zytologische Untersuchungen mit Zellmaterial aus Cytobrush- und Cytotape-Anwendungen führen überwiegend zu übereinstimmenden Ergebnissen (PASCOTTINI et al., 2015; PASCOTTINI et al., 2017b).

Die Grenzwerte für den prozentualen Anteil an PMN unter den gewonnenen Zellen, ab denen die Diagnose der SE gestellt wird, variieren in der Literatur stark. Je nachdem, wie viele Wochen p.p. die Beprobung stattgefunden hat, wurde diese Grenze bei Werten von  $\geq 1$  % bis  $\geq 18$  % PMN-Anteil im gewonnenen Zellmaterial gezogen (KASIMANICKAM et al., 2004; CHEONG et al., 2011; GALVÃO et al., 2011; GHASEMI et al., 2012; POLAT et al., 2015; PASCOTTINI et al., 2017b). Für eine zytologische Untersuchung vier Wochen p.p. sehen LEE et al. (2018) einen Grenzwert von 14 % als geeignet an, da sich in ihren Untersuchungen ab diesem PMN-Anteil im weiteren Verlauf eine Beeinträchtigung der Fruchtbarkeit zeigte. MADDOZ et al. (2013) schließen dagegen aus ihren Beobachtungen, dass ein niedrigerer Grenzwert von 5 % bereits ab drei Wochen und bis neun Wochen p.p. geeignet ist, was sich mit den Resultaten von GILBERT et al. (2005) deckt. Dies stellt auch den üblicherweise gewählten Grenzwert für Beprobungen in dieser Zeit mittels Uterusspülung oder Cytobrush dar (WAGENER et al., 2017a; SHELDON et al., 2019).

#### **2.4.6. Histopathologische Untersuchung**

Mittels Biopsiezange können unter transrektaler Kontrolle Biopate aus dem Endometrium gewonnen werden. Nach entsprechender Aufbereitung können die

Biopate mit einem Mikroskop auf Anzeichen einer Entzündung wie Entzündungsinfiltrate, Vaskularisation und morphologische Veränderungen des Gewebes untersucht werden (BONNETT et al., 1991). Allerdings findet in der Praxis die Diagnostik mittels histopathologischer Untersuchung beim Rind vergleichsweise wenig Anwendung, da sie mit hohem Aufwand verbunden ist und zudem die Probenqualität nicht immer die nötigen Voraussetzung erfüllt (PASCOTTINI & OPSOMER, 2016). Die Aussagen bezüglich einer potenziellen Beeinträchtigung der Fruchtbarkeit durch die Biopatientnahme sind in der Literatur nicht einheitlich (RAMIREZ-GARZON, 2017).

Im Hinblick auf die Diagnostik subklinischer Endometritiden wurden wiederholt geringe Übereinstimmungen zwischen den Ergebnissen zytologischer und histopathologischer Untersuchungen beschrieben (MADOZ et al., 2014; CENGIZ et al., 2016; PASCOTTINI et al., 2016; HELFRICH et al., 2020). Ebenfalls zeigt sich ein Unterschied zwischen zytologischer und histopathologischer Diagnostik bei zusätzlicher Untersuchung der Expression entzündungsrelevanter Gene in entsprechenden Biopaten. So konnten HELFRICH et al. (2020) in Biopaten aus dem Endometrium von Kühen, denen nach zytologischer Untersuchung die Diagnose SE gestellt wurde, eine im Vergleich zu uterusgesunden Kühen erhöhte Genexpression proinflammatorischer Zytokine detektieren. In Biopaten von Kühen, denen nach histopathologischer Untersuchung eine SE diagnostiziert wurde, unterschied sich die Expression dieser entzündungsrelevanten Gene dagegen nicht signifikant von den Werten gesunder Kühe. Eine mögliche Erklärung für die geringe Übereinstimmung zwischen den beiden Untersuchungsmethoden ist, dass mittels histopathologischer Untersuchung im Gegensatz zur zytologischen Untersuchung auch Hinweise auf entzündliche Prozesse wie Entzündungsinfiltrate und Gefäßstauung in tiefer liegenden Schichten des Endometriums detektiert werden können (BONDURANT, 1999; CENGIZ et al., 2016). Somit wird in der histopathologischen Untersuchung die Diagnose der SE auch für Kühe gestellt, auf deren Endometrium in der zytologischen Untersuchung kein erhöhter PMN-Anteil detektiert wurde.

#### **2.4.7. Leukozyten-Esterase-Test**

Mittels Leukozyten-Esterase (LE)-Test kann das gleichnamige Enzym detektiert werden, das von PMN sezerniert wird. Dabei werden Teststreifen eingesetzt, die eine erhöhte LE-Konzentration anzeigen. Der dafür mindestens notwendige Trop-

fen Probenflüssigkeit kann beispielsweise aus einer Uterusspülung stammen (vgl. II.2.4.5.) (CHEONG et al., 2012; VAN SCHYNDEL et al., 2018). Die Probenflüssigkeit wird auf den Teststreifen aufgetragen, der sich anschließend entsprechend des LE-Gehaltes einfärbt. SANTOS (2006) ermittelten eine hohe Korrelation zwischen den Ergebnissen von zytologischer Untersuchung und LE-Test. Zur Diagnose von subklinischer Endometritis ermittelten CHEONG et al. (2012) eine Sensitivität von 77 % und eine Spezifität von 51 % (Referenzmethode: Zytologische Untersuchung mit Uterusspülung).

## **2.5. Therapie**

Zur Therapie der Gebärmutterentzündung beim Rind kommen unterschiedliche Ansätze zur Anwendung, die im Folgenden beschrieben werden.

### **2.5.1. Einsatz von Antibiotika**

Für die Behandlung puerperaler Metritiden stehen antibiotikahaltige Präparate zur Verfügung, deren erfolgreiche Anwendung mehrfach beschrieben wurde (DRILLICH et al., 2001; CHENAULT et al., 2004; NAK et al., 2011). Im Hinblick auf lokale Entzündungen des Uterus ohne systemische Symptomatik wird die Rechtfertigung einer systemischen Therapie in Frage gestellt (FÖLDI et al., 2006). Während bei einer systemischen Therapie hohe Konzentrationen antibiotischer Wirkstoffe appliziert werden müssen, um im Uterus eine ausreichende Wirkstoffkonzentration zu erreichen, kann dies durch die lokale intrauterine Applikation leichter erreicht werden (MASERA et al., 1980). Jedoch rückt in Bezug auf die lokale Anwendung antibiotischer Präparate zunehmend der Aspekt der daraus resultierenden lokalen Irritation in den Fokus (FÖLDI et al., 2006). Untersuchungen zur Wirksamkeit lokaler Antibiotikaanwendungen lieferten gegensätzliche Ergebnisse. Manche Autoren konnten eine Verbesserung der Fruchtbarkeit nach intrauteriner Behandlung mit Cephalosporinen darstellen (LEBLANC et al., 2002b; RUNCIMAN et al., 2009). Andere Untersuchungen zeigen diesbezüglich keinen Mehrwert (GALVÃO et al., 2009b; SHELDON et al., 2019). Eine mögliche Erklärung für das Ausbleiben der Verbesserung der Fruchtbarkeit nach antibiotischer Behandlung sehen SHELDON et al. (2019) darin, dass nicht allein die Anwesenheit der Bakterien im Uterus ursächlich für Entzündungen und Fruchtbarkeitsstörungen sein muss, sondern auch die Regulation der lokalen Immunantwort eine Rolle spielt (vgl. II.2.3.1.). Darüber hinaus konnten mehrfach Resisten-

zen von Endometritis-assoziierten Bakterien gegen verschiedene antibiotische Wirkstoffe dargestellt werden (FÖLDI et al., 2006; RAHEEL et al., 2020; AGRAWAL et al., 2021). Insbesondere ist hier eine geringe Empfindlichkeit des für Endometritis bedeutsamen Keims *Trueperella pyogenes* gegen das häufig lokal eingesetzte Oxytetracyclin zu beachten (MALINOWSKI et al., 2011).

### **2.5.2. Einsatz von Entzündungshemmern**

Der Einfluss von Entzündungshemmern auf den Verlauf einer Gebärmutterentzündung ist wenig erforscht. In einer Untersuchung von PRIEST et al. (2013) konnte nach Behandlung von SE mit einem nicht-steroidalen Antiphlogistikum keine Reduzierung des PMN-Anteils in der zytologischen Untersuchung festgestellt werden. Dennoch verbesserte sich die Fruchtbarkeit der behandelten Tiere.

### **2.5.3. Hormonelle Therapie mit Prostaglandin F<sub>2α</sub>**

Bei der Behandlung von puerperalen Metritiden konnten MELENDEZ et al. (2004) einen vorteilhaften Effekt von Prostaglandin F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>) aufzeigen. Die häufig praktizierte Behandlung von KE mit PGF<sub>2α</sub> zur Herbeiführung der Luteolyse und Entleerung des Uterus wird in der Literatur kontrovers diskutiert (LEFEBVRE & STOCK, 2012). Für die Behandlung von SE konnten GALVÃO et al. (2009a) und DUBUC et al. (2011) keine Verbesserung durch den Einsatz von PGF<sub>2α</sub> feststellen.

### **2.5.4. Einsatz von Antiseptika**

Eine weitere Therapiemöglichkeit für die Behandlung von KE und SE stellt der lokale Einsatz von Povidon-Jod nach Abschluss des klinischen Puerperiums dar. Hierbei sind Verbesserungen der Fruchtbarkeit nach lokaler, intrauteriner Anwendung beschrieben (KOUJAN et al., 1996; MIDO et al., 2016). Dieser Effekt wird der Induktion einer vorübergehenden Entzündung durch das Povidon-Jod mit nachfolgender Regeneration des Endometriums (YOSHIDA et al., 2020) zugeschrieben.

### **2.5.5. Selbstheilung subklinischer Endometritiden**

Ergänzend ist zu erwähnen, dass sich bei SE insgesamt eine hohe Tendenz zur Selbstheilung zeigt. In der Literatur sind Selbstheilungsraten von 40 % sowie 66 % beschrieben (DUBUC et al., 2011; BARAŃSKI et al., 2012; KASIMANICKAM et al., 2013).

### 2.5.6. Experimentell therapeutischer Einsatz von *Lactobacilli*

*In vitro* konnten wiederholt hemmende Einflüsse von *Lactobacilli* auf Wachstum und Adhäsion pathogener Bakterien gezeigt werden. Dabei standen bei vielen Untersuchungen genitalpathogene Bakterien wie *E. coli* oder *Gardnerella vaginalis* im Zentrum (MCGROARTY & REID, 1988; VELRAEDS et al., 1998; ATASSI et al., 2006; LIU et al., 2016). Erste Ergebnisse zur Wirkung von *Lactobacilli in vivo* sind ebenfalls vielversprechend. WU et al. (2021) konnten bei Kühen mit SE während des Gesamtpuerperiums eine signifikant stärkere Reduktion des PMN-Anteils im Endometrium innerhalb von vier Wochen bei den Kühen feststellen, aus deren Uterus *Lactobacillus spp.* isoliert werden konnte. PETER et al. (2018) konnten nach einer experimentellen intrauterinen Infusion von *Lactobacillus buchneri* (*L. buchneri*) bei Kühen mit gesundem Endometrium sowie bei Kühen mit SE in beiden Gruppen eine verbesserte Fruchtbarkeit gegenüber Tieren, die einen Placebo erhalten hatten, feststellen. Zudem zeigte sich bei den Tieren mit SE drei Wochen nach der Behandlung mit *L. buchneri* eine verringerte endometriale Genexpression proinflammatorischer Faktoren. Auch in der Humanmedizin existieren bereits vielversprechende Studienergebnisse zum kurativen und präventiven Einsatz von *Lactobacilli* im weiblichen Reproduktionstrakt (TIDBURY et al., 2021).

### 2.6. Folgen

Zum einen beeinträchtigen uterine Erkrankungen das Tierwohl (SHELDON et al., 2019). STOJKOV et al. (2015) konnten zeigen, dass klinische Metritis eine schmerzhafte Erkrankung ist. Zum anderen sind die Folgen von Endometritis für die Fruchtbarkeit zu beachten (SHELDON et al., 2019). Die wirtschaftlichen Verluste infolge reduzierter Fruchtbarkeit wurden in der Einleitung (siehe I.) dargestellt. Auch SE kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen: LEE et al. (2018) stellten fest, dass zunächst die Wiedererlangung der Zyklizität nach der Geburt durch SE beeinträchtigt wird. Werden Tiere, bei denen während oder nach Abschluss des Gesamtpuerperiums SE diagnostiziert wurde, schließlich zur Besamung vorgestellt, ist für das Erreichen einer Trächtigkeit eine höhere Anzahl an Besamungen erforderlich, als bei Tieren ohne SE (GILBERT et al., 2005; LEE et al., 2018). In Untersuchungen von KASIMANICKAM et al. (2004), GILBERT et al. (2005) und LEE et al. (2018) wurden die Trächtigkeitsraten von Tieren mit und ohne SE verglichen, wobei der untersuchte Zeitraum bis zu 300 Tagen p.p. reichte. Dabei

wurden bei Kühen mit SE übereinstimmend niedrigere Trächtigkeitsraten festgestellt als bei Kühen ohne SE. Andere Autoren konnten hingegen keine Unterschiede bezüglich der Fruchtbarkeit von Kühen mit SE und uterusgesunden Kühen feststellen (PLÖNTZKE et al., 2010; CHEONG et al., 2011). Als mögliche Erklärung für die ausgebliebene Beeinträchtigung der Fruchtbarkeit durch SE in den von PLÖNTZKE et al. (2010) untersuchten Betrieben ist zu beachten, dass es sich hier um Betriebe mit extensiver Weidehaltung handelt, in denen unabhängig von der Studie routinemäßig wöchentlich bis zweiwöchentlich reproduktionsmedizinische Untersuchungen durchgeführt wurden. Grundsätzlich können weitere Faktoren wie Body-Condition-Score, Milchleistung sowie Anwendung und Auswahl einer Therapie von SE die Fruchtbarkeitsaussichten beeinflussen (BARLUND et al., 2008; PASCOTTINI et al., 2017a), was die Vergleichbarkeit verschiedener Studien einschränkt.

### **2.7. Prophylaxe**

Aufgrund der negativen Folgen auf Tierwohl, Fruchtbarkeit und Wirtschaftlichkeit (siehe I. und II.2.6.) sollte bei der Bekämpfung von Gebärmutterentzündungen beim Rind der Prävention eine große Bedeutung zukommen (FÖLDI et al., 2006; SHELDON et al., 2019). Einen wichtigen Ansatzpunkt stellt hierbei die rechtzeitige Behandlung von Geburtsstörungen und Nachgeburtsverhaltungen dar (FÖLDI et al., 2006). Darüber hinaus unterstützt ein gutes Management während der Transitperiode und des Puerperiums die Prävention von Gebärmutterentzündungen (LEBLANC, 2014; ALERI et al., 2016). Ein weiterer Aspekt zur Prävention ist die Berücksichtigung der Empfänglichkeit für Gebärmutterentzündung bereits bei der Zuchtauswahl (SHELDON et al., 2019).

### **III. MATERIAL UND METHODEN**

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Regulation der Genexpression von IL1B und IL1RA im bovinen Endometrium sowie die Proteinkonzentration dieser Analyten in bovinem Uterussekt untersucht. In diesem Kapitel wird die Vorgehensweise bei der Gewinnung, Aufbereitung und Untersuchung von Proben sowie bei der Auswertung der Daten beschrieben. Eine Auflistung der dabei verwendeten Reagenzien, Materialien, Instrumente und Geräte mit Angabe der Hersteller findet sich im Anhang dieser Arbeit, ebenso die verwendeten Laborprotokolle (siehe XI.1. und XI.2.).

#### **1. Untersuchung der Regulation der Genexpression von IL1B und IL1RA in einer bovinen endometrialen Explantkultur**

Mithilfe einer Explantkultur wurden die Genexpression von IL1B und IL1RA in bovinem Endometrium und ihre Regulation unter dem Einfluss verschiedener Bakterienstämme und Zytokine untersucht.

##### **1.1. Vorbereitung der Reagenzien**

In Vorbereitung auf die Inkubation von bovinen endometrialen Explants wurden zunächst das Medium sowie die Bakterienstämme und Zytokine für die Inkubation präpariert.

###### **1.1.1. Vorbereitung des Mediums für die Inkubation**

Für die Inkubation der Explants wurde Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Ham's Nutrient Mixture F12 (DMEM-F12) verwendet. Je 500 ml DMEM-F12 wurden unter einer Sterilwerkbank 500 µg Penicillin, 500 µg Streptomycin und 10 µg Amphotericin B zugegeben. Im Anschluss wurde das Medium zu je 45 ml aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Am Tag der Explantgewinnung erfolgte eine Vorinkubation des Mediums in den später verwendeten Multiwellplatten für Zellkulturen mit 24 Wells. Dafür wurde unter einer Sterilwerkbank 1 ml Medium je Well pipettiert und die Platte für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Multiwellplatten bis zum Eintreffen der Explants im Labor bei 4 °C gelagert.

### 1.1.2. Vorbereitung der eingesetzten Bakterienstämme

Für die Explantkultur wurden drei unterschiedliche Bakterienstämme, die aus bovinen Uteri gewonnen worden waren, zur Koinkubation eingesetzt. Sie stammten entweder aus einer klinisch erkrankten Kuh (*E. coli*) oder aus Isolaten von gesunden Kühen, die durch die Arbeitsgruppe von Herrn PD Dr. Gabler am Institut für Veterinär-Biochemie der Freien Universität Berlin zur Verfügung gestellt wurden (*B. pumilus* und *L. buchneri*).

#### 1.1.2.1. *Escherichia coli*

Der verwendete *E. coli*-Stamm war im Rahmen der bakteriologischen Diagnostik aus der Gebärmutter einer Kuh der Rasse Braunvieh isoliert und differenziert worden. Zudem war der Keim mittels Cryobank Tube bei -80 °C kryokonserviert worden. Das Protokoll zur Herstellung der *E. coli*-Suspension mit dem kryokonservierten Bakterium wird in XI.2.3.1. beschrieben.

Bei dem beprobten Tier handelte es sich um eine Patientin der Klinik für Wiederkäuer mit Ambulanz und Bestandsbetreuung der Ludwig-Maximilians-Universität München, die elf Tage zuvor zwei vitale Kälber geboren hatte. Im Anschluss kam es zu einer Nachgeburtsverhaltung und zu einer klinischen Metritis mit eitrigem, übelriechendem Ausfluss. Zudem hatte die Kuh Fieber und wurde zum Zeitpunkt der Probenentnahme seit sechs Tagen systemisch antibiotisch mit Marbofloxacin und zuvor mit Amoxicillin behandelt. Für die sterile Probengewinnung aus dem Uterus wurde der in III.2.1.1. beschriebene Arbeitskanal und das ebendort beschriebene, jedoch auf 1,5 cm gekürzte Merocel-Schwämmchen verwendet. Die genaue Anwendung beider Instrumente wird in III.2.1.2. näher beschrieben und hier in Kürze dargestellt. Nach einer Reinigung der Scham wurde der sterile Arbeitskanal unter transrektaler Kontrolle durch Scheide und Zervix in den Uterus eingeführt. Zum Schutz vor Kontaminationen wurde dabei ein Kunststoffüberzug verwendet, der während der Zervixpassage durch Zurückziehen durchstoßen wurde. Nachdem der Arbeitskanal intrauterin platziert worden war, wurde das sterile Merocel-Schwämmchen mithilfe eines Führungsstabes durch den Arbeitskanal in den Uterus eingeführt und dort für 10 s belassen. Anschließend wurde das Merocel-Schwämmchen in den Arbeitskanal zurückgezogen und das gesamte Probenentnahmegesamt aus dem Genitaltrakt entfernt. Der Arbeitskanal mit dem sich in ihm befindlichen Schwämmchen wurde in eine sterile Hülle geschoben und unmittelbar in das Labor für bakteriologische Untersuchungen verbracht. Dort

wurde das Merocel-Schwämmchen auf einem Columbia-Agar mit Schafblut, auf einem Violet Red Bile (VRB)-Agar und auf einem Edwards-Agar ausgestrichen. Die drei Agarplatten wurden bei 37 °C für 48 h bebrütet und nach 24 h sowie nach 48 h auf Bakterienwachstum kontrolliert. Zu beiden Kontrollzeitpunkten zeigte sich ein Wachstum von zwei morphologisch unterschiedlichen Keimen, wobei je Selektivagar (Edwards und VRB) jeweils ein morphologisch identisches Keimwachstum auftrat. Für beide Selektivagarplatten wurde eine Speziesdifferenzierung mittels MALDI-TOF am Lehrstuhl für Bakteriologie und Mykologie der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt, welche die Keime als *E. coli* und *Streptococcus uberis* identifizierte.

#### 1.1.2.2. *Bacillus pumilus*

Der verwendete *B. pumilus*-Stamm wurde aus dem Uterus einer klinisch gesunden Milchkuh isoliert. Zur Speziesdifferenzierung wurde die 16 Svedberg ribosomale Desoxyribonukleinsäure (DNA) amplifiziert und sequenziert sowie die Datenbank des National Center of Biotechnology Information genutzt (GÄRTNER et al., 2016). Für die hier beschriebene Explantkultur wurde der *B. pumilus*-Stamm in Lysogeny broth (LB) mit 20 % Glycerin (86 %) zur Verfügung gestellt. Zur Hitzeinaktivierung wurden die Bakterien für 60 min in einem Wasserbad mit 95 °C belassen. Zur Erfolgskontrolle der Hitzeinaktivierung erfolgte ein Ausstreichen auf einem Columbia-Agar mit Schafblut und eine Bebrütung des Agars bei 37 °C für 48 h und anschließender Kontrolle auf Keimwachstum. Anschließend wurde die Suspension mit steriler phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) auf eine Bakterienkonzentration von  $1,0 \times 10^8$  koloniebildende Einheiten (KBE)/ml verdünnt und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

#### 1.1.2.3. *Lactobacillus buchneri*

Der verwendete *L. buchneri*-Stamm wurde aus dem Uterus einer klinisch gesunden Milchkuh isoliert. Die Speziesdifferenzierung erfolgte analog zur in III.1.1.2.2. beschriebenen Differenzierung von *B. pumilus* (GÄRTNER et al., 2015). Für die hier beschriebene Explantkultur wurde der *L. buchneri*-Stamm in PBS zur Verfügung gestellt. Zur Hitzeinaktivierung wurden die Bakterien für 45 min in einem Wasserbad mit 80 °C belassen. Zur Erfolgskontrolle der Hitzeinaktivierung erfolgte ein Ausstreichen auf einem Agar nach De Man, Rogosa and Sharpe und eine Bebrütung des Agars bei 37 °C für 96 h unter reduzierten Sauer-

stoffbedingungen (5,5 % O<sub>2</sub>). Anschließend wurde die Suspension mit sterilem PBS auf eine Bakterienkonzentration von  $1,0 \times 10^8$  KBE/ml verdünnt und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

### 1.1.3. Vorbereitung der eingesetzten Zytokine

Des Weiteren wurden die Zytokine bovines IL1B, IL17A und IL10 in Form von rekombinanten Proteinen zur Koinkubation eingesetzt. Die jeweils lyophilisierten Zytokine wurden je nach Herstellerangaben in sterilem H<sub>2</sub>O, Natriumchloridlösung oder PBS gelöst. Anschließend erfolgte eine Verdünnung mit sterilem PBS, dem als Carrier-Protein 0,1 % bovines Serumalbumin (BSA) zugesetzt worden war, auf eine Konzentration von 2 µg/ml und das Einfrieren bei -20 °C in Aliquots zu je 100 µl bis zur weiteren Verwendung.

### 1.2. Gewinnung von bovinen endometrialen Explantaten

Die Gewinnung der Explants erfolgte an Schlachtorganen in einem lokalen Schlachthof. Neben den Explants wurden von jedem beprobten Uterus auch Proben für die zytologische und die bakteriologische Untersuchung gewonnen, um die Uterusgesundheit der Spendertiere beurteilen zu können. Dafür wurden am Organband geeignete Organe ausgewählt.

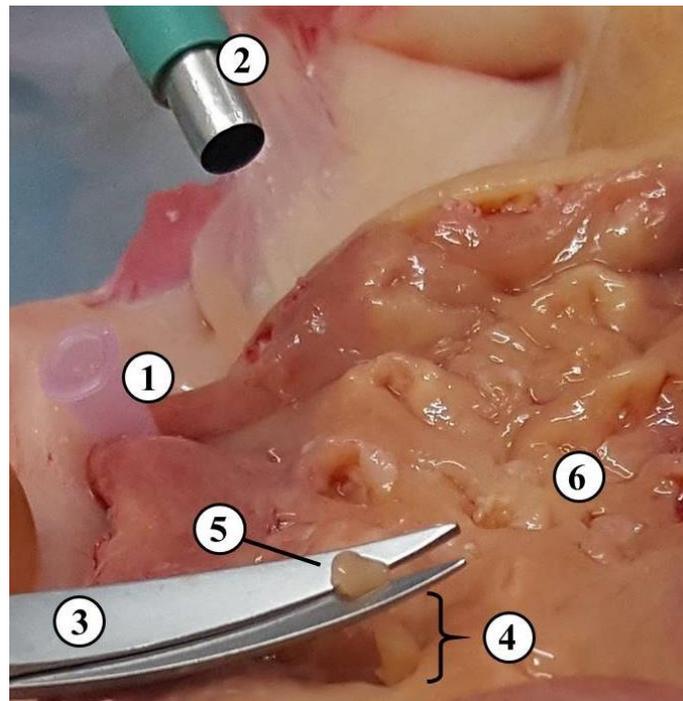
Kriterien für die Eignung waren:

- Adspektorische und palpatorische Unauffälligkeit von Vagina, Zervix, Uterus, Salpingen und Ovarien, um im Hinblick auf die Genitalgesundheit eine möglichst homogene Gruppe an Spendertieren zu generieren,
- Symmetrie der Uterushörner, um den Abschluss des klinischen Puerperiums sicherzustellen,
- Vorhandensein eines Gelbkörpers in Blüte, um eine ausschließliche Beprobung von Tieren im Diöstrus sicherzustellen und so eine im Hinblick auf den Zyklusverlauf möglichst homogene Gruppe an Spendertieren zu generieren.
- Keine Hinweise auf eine bestehende frühe Trächtigkeit.

Wurden alle Kriterien erfüllt, erfolgte die Entnahme der jeweiligen Gebärmutter mit Eierstöcken und Teilen der Vagina sowie die Erfassung von Rasse (Braunvieh, Fleckvieh, Holstein-Friesian, Red-Holstein oder Fleischrasse) und Alter des Tieres. In einem separaten Raum des Schlachthofs wurde die Oberfläche des Ute-

rus mit Leitungswasser gereinigt und anschließend auf einer mit autoklavierter Alufolie bedeckten Fläche ausgelegt. Alle für die Explantentnahme verwendeten Instrumente waren steril und wurden nach jedem Tier gewechselt. Nach Desinfektion des Perimetriums mit 70 % Ethanol wurde der Uterus an der Basis des Uterushorns ipsilateral zum Ovar mit Gelbkörper mit einem Skalpell durch einen longitudinalen Schnitt über etwa 2 cm eröffnet. Durch diese Eröffnung wurde zunächst eine Tupferentnahme aus dem Uterus für die bakteriologische Untersuchung durchgeführt und der Tupfer anschließend in Amiesmedium auf Eis gelagert. Im nächsten Schritt wurde mit der Cytobrush-Methode Probenmaterial für die zytologische Untersuchung gewonnen. Dazu wurde das Bürstchen zunächst auf zwei Objektträgern ausgestrichen, die luftgetrocknet wurden. Das am Bürstchen verbliebenen Material wurde mit 1 ml H<sub>2</sub>O in ein Probengefäß gespült und für einen LE-Test verwendet. Dafür wurde ein LE-Teststreifen verwendet, der die Einordnung in die Kategorien negativ, Spuren, klein, moderat und groß ermöglichte. Der Teststreifen wurde kurz in die Flüssigkeit getaucht und nach 1 min abgelesen. Nun wurde zur Entnahme der Explants die Eröffnung des Uterushornes in Richtung der Hornspitze erweitert und die Schnittträger mit sterilen Kanülen aufgespannt. Die Explantentnahme wurde immer im interkarunkulären Bereich durchgeführt. Entsprechend der von BORGES et al. (2012) und SCHABMEYER et al. (2021) beschriebenen Methode erfolgte die Explantentnahme mit einer Stanze für Hautbiopsien. Die Stanze mit 5 mm Durchmesser wurde auf das Endometrium aufgesetzt. Durch Drehen der Stanze unter leichtem Druck wurde das Gewebe im Bereich des Endo- und Myometriums kreisförmig durchtrennt. Anschließend wurde mit einer Pinzette die noch bestehende Gewebeverbindung zwischen Explant und Uterus gegriffen und das Explant von der luminalen Organoberfläche abgehoben. Schließlich wurde es durch einen Scherenschlag im Bereich des Myometriums abgetrennt (siehe Abbildung 1).

Auf diese Weise wurden von 26 Tieren je 42 Explants aus dem gleichen Uterushorn gewonnen (insgesamt  $n = 1.092$ ). Für den Transport ins Labor wurden die Explants in sterilem PBS auf Eis gelagert. Dabei und bei allen nachfolgenden Arbeitsschritten wurden die Explants nach Spendertier getrennt behandelt. Die Zeitspanne zwischen Schlachtung des Spendertieres und Einsetzen der gewonnenen Explants in PBS auf Eis betrug maximal 90 min.



**Abbildung 1: Darstellung der Explantgewinnung.**

Die Schnittländer des eröffneten Uterushorns wurden mit Hilfe einer Kanüle (1) steril fixiert. Mit einer Stanze für Hautbiopsien (2) wurde das Endometrium und ein Teil des darunterliegenden Myometriums kreisförmig durchtrennt und so das Explant aus seiner Gewebeumgebung gelöst. Mit Hilfe einer Pinzette (nicht dargestellt) wurde das Explant von der Gewebeoberfläche abgehoben. Mit einer Schere (3) wurde die noch bestehende myometriale Gewebebrücke (4) zwischen Uterus und Explant (5) durchtrennt. Im Hintergrund sind bereits beprobte Regionen des Endometriums sichtbar (6).

### 1.3. Präparation und Inkubation der Explantate

Alle weiteren Arbeitsschritte wurden im Labor unter einer Sterilwerkbank durchgeführt. Zunächst wurden die Explants und das für den Transport der Explants verwendete PBS in Petrischalen überführt. Dort erfolgte mittels Präzisionspinzette und Skalpell die Abtrennung von makroskopisch sichtbaren myometrialen Geweberesten. Die Explants wurden in die vorinkubierten Multiwellplatten (siehe III.1.1.1.) eingesetzt (ein Explant pro Well) und für 1 h bei 4 °C gelagert. Anschließend wurde das Medium aus den Wells entfernt. Mit dieser einstündigen Ruhepause und der anschließenden Entfernung des Mediums wurde beabsichtigt, dass DAMPs (vgl. II.1.1.), die möglicherweise von den Explants auf die Verletzung des Gewebes im Rahmen der Explantgewinnung hin produziert wurden, vor Beginn der eigentlichen Inkubation entfernt werden. DAMPs besitzen das Potenzial, durch eine PRR-Aktivierung die Genexpression von IL1B und IL1RA zu beeinflussen (DINARELLO, 2005b; PARK et al., 2006; ROELOFS et al., 2006; BELLEHUMEUR et al., 2009; LI & SMITH, 2013; ZHANG et al., 2019;

MOLTENI & ROSSETTI, 2021).

Unmittelbar nach dem Abnehmen des Mediums wurde zu jedem Explant frisches Medium pipettiert und zusätzlich die vorbereiteten Bakterien und Zytokine (siehe III.1.1.2. und III.1.1.3.) zugesetzt, sodass die beigefügte Menge jeweils 1.000  $\mu$ l entsprach. Die dabei angewendeten Zusammensetzungen für die Koinkubation sind in Tabelle 1 aufgeführt.

**Tabelle 1: Zusammensetzungen bei der Koinkubation der Explants.**

<b>Koinkubation mit:</b>	
<b>Bakterien</b>	<b>Zusammensetzung</b>
<i>E. coli</i>	900 $\mu$ l Medium 100 $\mu$ l <i>E. coli</i> -Suspension (siehe III.1.1.2.)
<i>B. pumilus</i>	900 $\mu$ l Medium 100 $\mu$ l <i>B. pumilus</i> -Suspension (siehe III.1.1.2.)
<i>L. buchneri</i>	900 $\mu$ l Medium 100 $\mu$ l <i>L. buchneri</i> -Suspension (siehe III.1.1.2.)
<b>Zytokinen</b>	<b>Zusammensetzung</b>
IL1B	900 $\mu$ l Medium 100 $\mu$ l IL1B in PBS + 0,1 % BSA (siehe III.1.1.3.)
IL17A	900 $\mu$ l Medium 100 $\mu$ l IL17A in PBS + 0,1 % BSA (siehe III.1.1.3.)
IL10	900 $\mu$ l Medium 100 $\mu$ l IL10 in PBS + 0,1 % BSA (siehe III.1.1.3.)
<b>Kontrollen</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Kontrolle	1.000 $\mu$ l Medium
Kontrolle <i>B. pumilus</i>	900 $\mu$ l Medium 100 $\mu$ l LB-Medium mit 20 % Glycerin (86 %), in PBS verdünnt (analog zur Verdünnung der <i>B. pumilus</i> -Suspension (siehe III.1.1.2.))
Kontrolle Zytokine	900 $\mu$ l Medium 100 $\mu$ l PBS + 0,1 % BSA

Die Zuordnung der Kontrollen zu den Koinkubationsansätzen mit Bakterien und Zytokinen lautet wie folgt:

- „Kontrolle“ für *E. coli* und *L. buchneri*
- „Kontrolle *B. pumilus*“ für *B. pumilus*
- „Kontrolle Zytokine“ für IL1B, IL17A und IL10

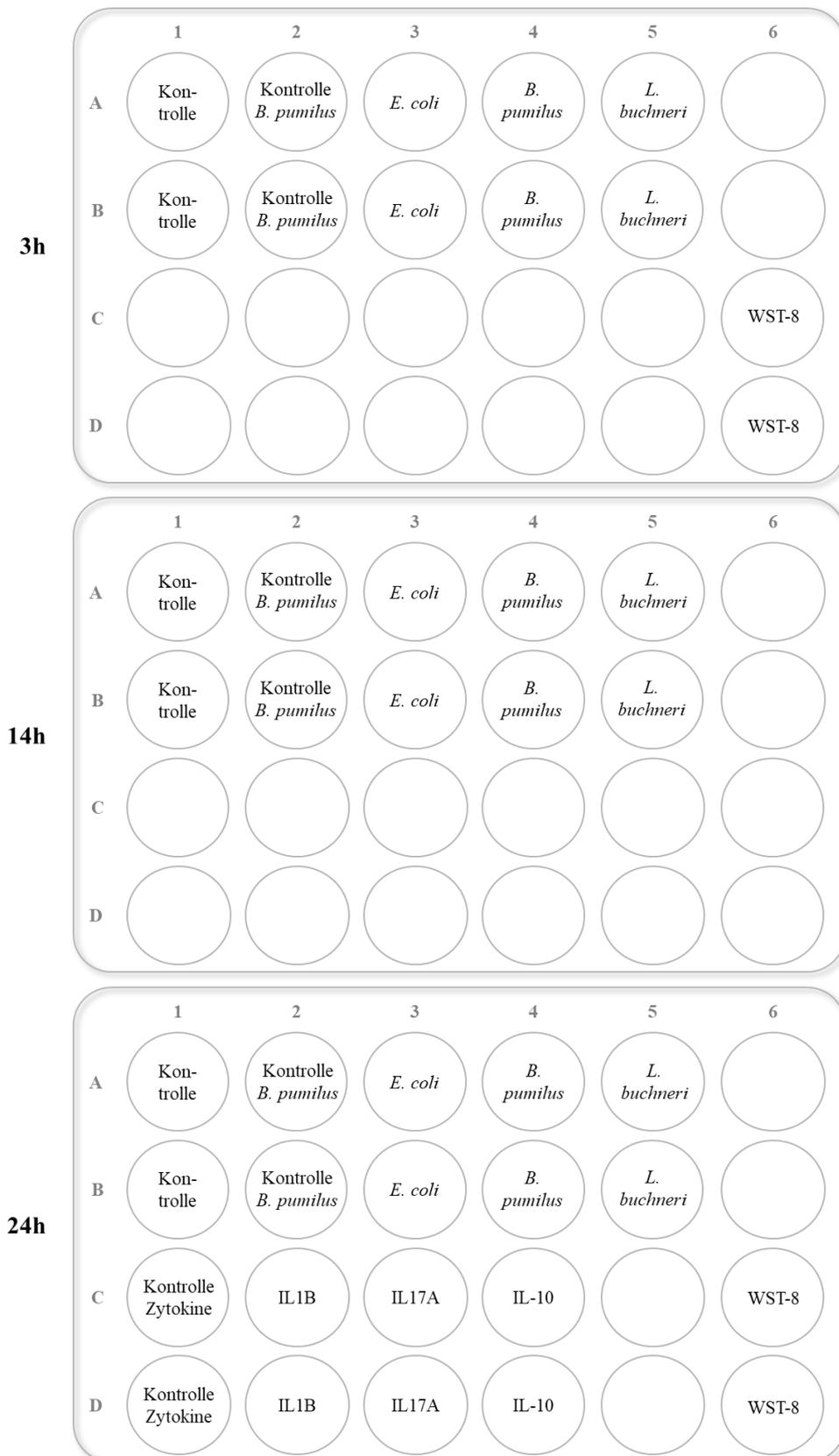
Alle Ansätze, die Bakterien oder Zytokine enthielten, sowie alle Kontrollen wurden im Doppelansatz eingesetzt. Je Explant wurde für die (Ko-)Inkubation jeweils nur eine Art von Bakterien oder alternativ eine Art von Zytokinen bzw. eine Kontrolle zugegeben. Eine Kombination verschiedener Bakterien, Zytokine und Kontrollen fand nicht statt. Die Explants eines Tieres wurden auf drei Multiwellplatten verteilt, deren Layouts Abbildung 2 entnommen werden können.

Die erste Platte wurde mit allen Koinkubationsansätzen mit Bakterien und Zytokinen sowie den Kontrollen versehen und für 24 h inkubiert. Zu den bakteriellen Komponenten sind in der Literatur jedoch teilweise Effekte auf die Genexpression von IL1A und IL1B bereits deutlich vor 24 h Inkubationsdauer sowie deren Rückgang nach wenigen Stunden beschrieben (GÄRTNER et al., 2016; DANESH MESGARAN et al., 2018). Daher wurden zwei weitere Platten mit den bakteriellen Ansätzen und den entsprechenden Kontrollen versehen und über 3 h und 14 h inkubiert. Die Inkubationen fanden jeweils bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt und 5,5 % O<sub>2</sub>-Gehalt statt. Im unmittelbaren Anschluss wurde jedes Explant in 450 µl RNAlater überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Die Überstände wurden je Well einzeln abpipettiert und bei -20 °C gelagert.

#### **1.4. Untersuchung der Vitalität der Explantate**

Um sicherzustellen, dass das verwendete Gewebe über das gesamte Experiment eine ausreichende Vitalität aufweist, wurde je Tier eine Vitalitätskontrolle mitgeführt, bei der Water-soluble Tetrazolium-8 (WST-8) zum Einsatz kam. Sind Zellen vital, erfolgt durch Dehydrogenasen eine Reduktion von WST-8 zu Formazan. Dies ist durch eine orangerote Färbung makroskopisch sichtbar und kann photometrisch gemessen werden. Der Formazangehalt ist dabei direkt proportional zur Stoffwechselaktivität der Zellen des Explants und daher aussagekräftig in Bezug auf deren Vitalität (TOMINAGA et al., 1999).

Für diese Vitalitätskontrolle wurden je Tier vier Explants verwendet. Diese wurden bis zum Absaugen des Mediums nach der Ruhepause von 1 h wie die restlichen Explants behandelt (siehe III.1.2. und III.1.3.). Sie wurden nicht in die spätere Untersuchung der Genexpression von IL1B und IL1RA einbezogen. Für 3 h und für 24 h Inkubation wurden je zwei Explants pro Spendertier ohne Bakterien oder Zytokine mitgeführt, wobei jeweils 3 h vor Inkubationsende 100 µl WST-8 zugegeben wurden. Abbildung 2 zeigt die sich ergebenden Plattenprotokolle.



**Abbildung 2: Darstellung des Plattenlayouts für die Explantkultur.**

Die Abbildung stellt das Layout der pro Tier angesetzten Multiwellplatten mit Inkubationszeit dar. Jedes beschriftete Well enthielt ein Explant und jeweils einen der in Tabelle 1 aufgeführten Koinkubationsansätze bzw. Kontrollen. Im Fall von WST-8 wurde mit 1.000  $\mu$ l Medium inkubiert und für die letzten 3 h der Inkubation 100  $\mu$ l WST-8 zugegeben.

Zur Bestimmung der optische Dichte (OD) wurden je Well 270  $\mu\text{l}$  aspiriert, in eine 96-Well MT-Platte überführt und photometrisch bei 460 nm Wellenlänge gemessen.

Um dabei den tatsächlichen Effekt der Stoffwechselaktivität der Explants ohne den Einfluss des Mediums und des WST-8 auf die OD repräsentieren zu können, wurden außerdem einmalig zwei Ansätze je Inkubationsdauer aus je 1.000  $\mu\text{l}$  Medium und 100  $\mu\text{l}$  WST-8 hergestellt, die nicht mit einem Explant in Kontakt kamen. Die Mitführung dieser Leeransätze und die Messung ihrer OD wurden identisch mit den oben beschriebenen Bedingungen durchgeführt. Für beide Zeitspannen (3 h bzw. 24 h Inkubation) wurde der jeweilige Mittelwert gebildet und von den entsprechenden Messwerten der Ansätze mit Explant abgezogen.

Durch einen Vergleich der Werte nach 3 h mit den Werten nach 24 h könnte ein mögliches Absinken der Gewebektivität während des Versuches detektiert werden.

Um auszuschließen, dass die verwendeten Koinkubationsansätze der Vitalität der Explants beeinträchtigen, wurden mit Explants von einem weiteren Tier zwei zusätzliche Multiwellplatten bestückt. Dabei wurde wie in III.1.2. beschrieben vorgegangen, wobei alle Koinkubationsansätze eingesetzt wurden, die bei der 24-stündigen Inkubation angewendet wurden, sowie ein Well mit ausschließlich Medium zur Kontrolle. Eine Platte wurde für 3 h inkubiert, die andere für 24 h. In beiden Fällen wurden 3 h vor dem jeweiligen Inkubationsende jedem besetzten Well 100  $\mu\text{l}$  WST-8 zugegeben. Nach Inkubationsende wurden aus jedem Well 270  $\mu\text{l}$  aspiriert und die OD bei 460 nm gemessen. Auch hier wurde die OD von Medium und WST-8 alleine abgezogen. So konnte für beide Zeitpunkte der Einfluss der verwendeten Koinkubationsansätze auf die Vitalität im Vergleich zur Kontrolle und zudem die Entwicklung der Vitalität der Explants unter dem Einfluss der Koinkubationsansätze zwischen 3 h und 24 h Inkubation verglichen werden.

### **1.5. Weitere Untersuchungen zur Uterusgesundheit der Spendertiere zur Explantgewinnung**

Die Gebärmuttergesundheit der beprobten Spendertiere sollte bei der späteren Betrachtung der Ergebnisse der Genexpression von IL1B und IL1RA berücksichtigt werden können. Daher wurden zusätzlich zur adspektorischen und palpatori-

schen Beurteilung der Uteri sowie dem LE-Test (siehe III.1.2.) für jeden beprobten Uterus eine bakteriologische und eine zytologische Untersuchung durchgeführt.

#### **1.5.1. Bakteriologische Untersuchung**

Um potenzielle Infektionen der beprobten Uteri zu erfassen, wurde aus jedem beprobten Uterus unmittelbar nach seiner Eröffnung eine Probe für die bakteriologische Untersuchung gewonnen (siehe III.1.2.). Jeder Tupfer wurde auf einem Columbia-Agar mit Schafblut, einem VRB-Agar und einem Edwards-Agar ausgestrichen. Im Anschluss erfolgte eine Bebrütung bei 37 °C über 48 h. Die Kontrolle auf Keimwachstum wurde nach 24 h und nach 48 h durchgeführt. Im Fall eines Keimwachstums erfolgte das Anlegen einer Reinkultur, die in eine Speziesdifferenzierung mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie (Matrix-assisted laser desorption time-of-flight) am Lehrstuhl für Bakteriologie und Mykologie der Ludwig-Maximilians-Universität München eingesetzt wurde.

#### **1.5.2. Zytologische Untersuchung**

Um potenzielle subklinische Endometritiden der beprobten Uteri zu erfassen, wurde aus jedem beprobten Uterus mittels Cytobrush Material für die zytologische Untersuchung gewonnen (siehe III.1.2.). Im Labor wurden die nun luftgetrockneten Objektträger mittels Haema-Schnellfärbung nach Herstellerangaben gefärbt (siehe XI.2.2.). Die Auswertung der Objektträger wurde an einem Lichtmikroskop bei 1.000-facher Vergrößerung unter Verwendung von Immersionsöl vorgenommen. Alle Objektträger wurden von zwei verschiedenen Personen in getrennten Untersuchungen beurteilt. MELCHER et al. (2014) konnten zeigen, dass die Auswertung von 300 Zellen je Ausstrich für die Diagnostik von subklinischer Endometritis als genau und reproduzierbar einzuschätzen ist. Daher wurden bei jedem Objektträger an drei unterschiedlichen Stellen mäanderförmig jeweils 100 kernhaltige Zellen gezählt und der prozentuale Anteil an PMN pro Objektträger erfasst. Aus den erhaltenen vier Einzelwerten pro Tier wurde der Mittelwert berechnet. Die Diagnose der subklinischen Endometritis wurde einem Tier analog zu MADDOZ et al. (2013) ab einem Mittelwert von 5 % PMN gestellt.

#### **1.6. Molekularbiologische Untersuchung**

Für die Untersuchung der Genexpression von IL1B und IL1RA in den inkubierten Explants wurde eine Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion durchge-

führt. Dafür wurde zunächst die Extraktion der Ribonukleinsäuren (RNA) aus den Explants durchgeführt. Im Anschluss erfolgte ein Umschreiben der extrahierten RNA in komplementäre Desoxyribonukleinsäure (cDNA), welche schließlich in eine quantitative Real Time Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) für IL1B bzw. IL1RA eingesetzt wurde.

#### **1.6.1. RNA-Extraktion**

Für die Extraktion der Gesamt-RNA aus den endometrialen Explants wurde ein kommerzielles RNA Kit sowie Lysetubes mit 2,4-2,8 mm Keramik-Beads nach Herstellerangaben verwendet. Das genaue Vorgehen ist in XI.2.3.2. beschrieben.

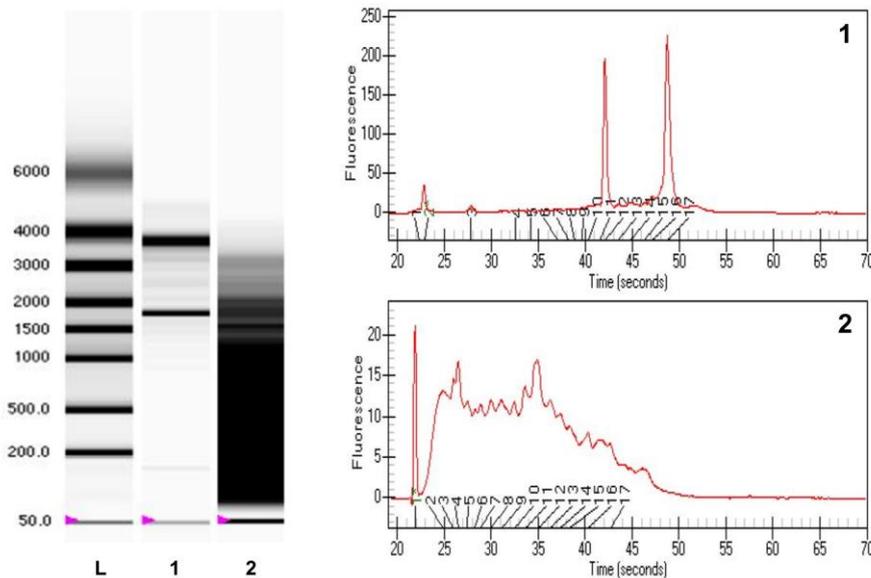
#### **1.6.2. Bestimmung der RNA-Integrität und -Konzentration**

Pro durchgeführtem RNA-Extraktionsdurchgang konnte die RNA aus zwölf Explants extrahiert werden. Im unmittelbaren Anschluss an jeden RNA-Extraktionsdurchgang wurden die Integrität und die Konzentration der extrahierten RNA überprüft. Hierfür wurde eine automatisierte Kapillar-Elektrophorese durchgeführt.

Dafür wurde zunächst ein RNA StdSens Chip sowie die zugehörigen Reagenzien entsprechend den Herstellerangaben vorbereitet. Der Chip wurde mit je 1 µl pro RNA-Probe sowie 1 µl RNA-Leiter beladen und in einer Vortex Station über 1 min gemischt. Anschließend wurde der Chip in die automatisierte Kapillar-Elektrophorese eingesetzt, in der die Auftrennung von messenger RNA (mRNA), Fraktionen der ribosomalen RNA (rRNA) (5 Svedberg, 18 Svedberg, 28 Svedberg) und fragmentierten RNAs nach ihrer Größe erfolgte. Bei der Auswertung durch die Experion Software wird maßgeblich die rRNA berücksichtigt, da diese den größten Anteil an der Gesamt-RNA darstellt. Die Experion Software stellt das Ergebnis der Elektrophorese in Form eines Elektropherogramms für jede RNA-Probe dar (vgl. Abbildung 3).

Im Fall einer intakten RNA sind die 28 Svedberg- und die 18 Svedberg-Regionen als prominente Peaks zu erkennen und stellen sich im Idealfall in einem 2:1-Verhältnis zueinander dar. Die Darstellung der aufgetrennten RNA-Fraktionen wird zusätzlich in einem virtuellen Gel visualisiert (vgl. Abbildung 3). Darüber hinaus wird für jede eingesetzte Probe ein RNA Quality Index (RQI) berechnet, der einen Wert zwischen eins (komplett degradierte RNA) und zehn (intakte RNA) annehmen kann (BECKER et al., 2009). Da eine gute RNA-

Qualität ab  $RQI > 5$  angenommen werden kann (FLEIGE & PFAFFL, 2006), wurden bei der späteren Auswertung der qPCR-Ergebnisse nur Proben mit  $RQI > 5$  berücksichtigt.



**Abbildung 3: Darstellung der Elektropherogramme und des virtuellen Gels zweier RNA-Proben.**

In der linken Abbildungshälfte ist das virtuelle Gel dargestellt. Es umfasst die im Kit enthaltene RNA-Leiter (L) sowie eine Probe mit guter RNA-Qualität (Probe 1) und eine Probe mit schlechter RNA-Qualität (Probe 2). In der rechten Bildhälfte sind die Elektropherogramme der beiden Proben dargestellt. Bei Probe 1 sind im virtuellen Gel zwei deutliche Banden und im Elektropherogramm zwei eindeutige Peaks zu erkennen, die die 28 Svedberg- und die 18 Svedberg-Regionen der intakten RNA darstellen. Bei Probe 2 sind diese Regionen nicht erkennbar. Der RQI-Wert (RNA Quality Index) als Maß für die Qualität nimmt Werte zwischen 1 (komplett degradierte RNA) und 10 (intakte RNA) an. Im Fall von Probe 1 beträgt der RQI-Wert 9,8, im Fall von Probe 2 beträgt der RQI-Wert 2,5.

### 1.6.3. Synthese von cDNA durch Reverse Transkription

Im unmittelbaren Anschluss an jeden RNA-Extraktionsdurchgang wurden pro RNA-Probe 10  $\mu\text{l}$  als Template in eine cDNA-Synthese eingesetzt. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben und wird im XI.2.3.3. beschrieben.

Zusätzlich wurde je Durchgang eine –RT (Reverse Transkriptase)-Kontrolle erstellt. Bei den –RT-Kontrollen wurde die RT durch das gleiche Volumen an Nuklease-freiem Wasser ersetzt, die weitere Zusammensetzung und die Behandlung der –RT-Kontrollen unterschieden sich nicht von denen der übrigen Proben. Mit Hilfe der –RT-Kontrollen konnte in der späteren qPCR eine Kontamination der Proben durch genomische DNA ausgeschlossen werden.

#### **1.6.4. Bestimmung der cDNA-Konzentration und -Reinheit**

Nach der cDNA-Synthese wurden die Proben über 15 min bei Raumtemperatur (21 °C) abgekühlt. Anschließend wurden die Konzentration und die Reinheit der cDNA mit einem Nanophotometer überprüft. Dafür wurde je 1 µl Probe aufgetragen und die OD bei 260 nm und 280 nm gemessen.

Um die Proben später in einer einheitlichen Konzentration von 200 ng/µl in die qPCR einsetzen zu können, wurde anhand der gemessenen cDNA-Konzentration das Volumen an Nuklease-freiem Wasser berechnet, welches für eine Verdünnung der Probe auf eine Konzentration von 200 ng/µl notwendig war und diese Verdünnung unmittelbar durchgeführt.

Zur Einschätzung der Reinheit der Proben wurde das Verhältnis der Absorption bei 260 nm zur Absorption bei 280 nm herangezogen ( $A_{260}/A_{280}$ ). Da Nukleinsäuren ihr Absorptionsmaximum bei 260 nm und Proteine ihres bei 280 nm haben, kann anhand dieses Verhältnisses eine Aussage über eine Kontamination der Proben durch Proteine getroffen werden. Für reine DNA sollte  $A_{260}/A_{280}$  einen Wert von mindestens 1,8 betragen (GLASEL, 1995). Nach der Bestimmung dieser Parameter wurde die cDNA bis zum Einsatz in die qPCR bei -20°C eingefroren.

#### **1.6.5. Etablierung einer Standardkurve für die qPCR für IL1RA**

Vor der Durchführung der qPCR zur Untersuchung der Genexpression von IL1RA wurde zunächst ein entsprechendes Primerpaar ausgewählt. Dies bildete auch die Grundlage der Vervielfältigung der IL1RA-Zielsequenz, um daraus eine Standardkurve herzustellen, die im Rahmen der PCR eine absolute Quantifizierung ermöglichte. Für IL1B war in Vorgängerprojekten mit dem Primerpaar von NEUVIANS et al. (2004) bereits nach dem gleichen Ablauf eine Standardkurve etabliert worden.

Für die Suche nach einem passenden Primerpaar wurde das Programm „Primer-Blast“ des National Center for Biotechnology Information (USA) genutzt. Auswahlkriterien waren dabei eine Schmelztemperatur zwischen 58 und 61 °C, eine Größe von etwa 20 Basenpaaren, ein Guanin- und Cytosin-Gehalt von etwa 50 %, Guanin oder Cytosin als Basen am 3'-Ende und eine Exon-Exon-Übergreifung. Das ausgewählte Primerpaar ist in Abschnitt XI.2.3.4. dargestellt. Mit diesem Primerpaar und zwei der in III.1.6.3. beschriebenen cDNA-Proben wurde zu-

nächst eine konventionelle PCR durchgeführt, in der die Zielsequenz aus IL1RA vervielfältigt wurde. Das entsprechende Protokoll ist in XI.2.3.5.1. dargestellt. Im Anschluss erfolgte die Bestimmung der Größe der hergestellten PCR-Produkte mittels Kapillar-Elektrophorese nach Herstellerangaben. Das Ergebnis von 290 Basenpaaren entsprach der aufgrund der Position der Primer in der IL1RA-Sequenz erwarteten Größe.

Anschließend wurde eine Klonierung der Zielsequenz durchgeführt. Dabei wurde ein handelsübliches Kit mit „Competent *E. coli*“-Bakterien nach Herstellerangaben verwendet. Bakterien, in die das Plasmid erfolgreich eingebracht worden war, wurden in LB-Medium inkubiert und anschließend das Plasmid mit Hilfe eines weiteren Kits nach Herstellerangaben extrahiert. Die Bestätigung, dass bei der Klonierung tatsächlich die Zielsequenz aus IL1RA vervielfältigt wurde, erfolgte im Rahmen einer Sequenzierung der bei der Extraktion erhaltenen Probe durch die Firma Eurofins Genomic – Life Science Services, Ebersberg. Danach erfolgte die Linearisierung der Plasmide mittels Restriktionsenzym Hind III und die Aufreinigung mit einem handelsüblichen Kit nach Herstellerangaben. Die genaue Vorgehensweise bei der Klonierung, Plasmidextraktion, Linearisierung und Aufreinigung sind in XI.2.3.5.2. bis XI.2.3.5.6. dargestellt.

Schließlich wurde mit Hilfe eines Nanophotometers die Reinheit des aufgereinigten Produktes überprüft und die DNA-Konzentration gemessen. Da die Länge der Zielsequenz bekannt war, konnte die vorliegende Anzahl an Kopien der Zielsequenz berechnet werden. Anschließend wurden mit nukleasefreiem H<sub>2</sub>O definierte Verdünnungen hergestellt (10<sup>6</sup>, 10<sup>5</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>2</sup> Kopien/μl), die bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert wurden. Diese Verdünnungen stellten die Grundlage für die Standardkurve in der qPCR dar.

#### **1.6.6. qPCR zur Untersuchung der Genexpression von IL1B und IL1RA**

Die qPCR basiert auf dem Prinzip der konventionellen PCR und stellt so eine Methode dar, mit der sich DNA vervielfältigen lässt. Im Gegensatz zur konventionellen PCR ermöglicht die qPCR jedoch zusätzlich zum Nachweis von DNA-Molekülen auch deren Quantifizierung. Dies wird in der vorliegenden Arbeit durch den Einsatz eines interkalierenden Farbstoffes ermöglicht, welcher nach Einlagerung in doppelsträngige DNA fluoresziert. Die gemessene Fluoreszenz ist direkt proportional zur Menge der doppelsträngigen DNA-Moleküle. Durch Mes-

sung der Fluoreszenz wird das PCR-Produkt so detektierbar und quantifizierbar. Indem die fluorometrische Messung nach jedem Reaktionszyklus der qPCR durchgeführt wird, können die vorhandenen doppelsträngigen DNA-Moleküle in Echtzeit quantifiziert werden.

Ist in einer Probe targetspezifische DNA vorhanden, entstehen in jedem Reaktionszyklus der qPCR entsprechend mehr doppelsträngige DNA-Moleküle, in die sich der interkalierende Farbstoff einlagert. In diesem Fall steigt die Stärke der Fluoreszenz je nach Menge der DNA-Moleküle ab einer bestimmten Zykluszahl typischerweise exponentiell an. Im weiteren qPCR-Verlauf zeigen sich ein linearer Anstieg der Fluoreszenz und schließlich ein Plateau, wenn die für die Amplifikation essenziellen Komponenten aus dem Reaktionsansatz verbraucht sind. Am Übergang in die exponentielle Phase wird ein Wert für die Fluoreszenzstärke als Grenzwert festgelegt. Die Zyklusanzahl, bei der die Fluoreszenz aus einer Probe diesen Grenzwert überschreitet, stellt den  $C_T$ -Wert (cycle threshold) dieser Probe dar. Je nach Menge der targetspezifischen DNA-Moleküle in der Probe wird ein Überschreiten des Grenzwertes früher oder später erreicht und der  $C_T$ -Wert ist entsprechend niedriger oder höher.

Für eine absolute Quantifizierung der in der Probe enthaltenen DNA-Moleküle wurde auf jeder Platte eine Standardkurve (siehe III.1.6.5.) mitgeführt. Diese enthielt fünf definierte Verdünnungen von aufgereinigten Plasmiden mit der Zielsequenz ( $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$  Kopien/ $\mu$ l).

Im hier beschriebenen Versuch wurde eine qPCR für IL1B und IL1RA mit einem handelsüblichen qPCR-Kit nach Herstellerangaben durchgeführt. Die verwendeten Primer sind in XI.2.3.4. näher beschrieben. Das Vorgehen bei der qPCR ist in XI.2.3.6. beschrieben.

Für die Auswertung der qPCR wurde die Software TOptical eingesetzt. Nach jedem qPCR-Lauf wurde das Verhalten der Negativkontrollen, die Effizienz der Standardkurve und das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  der Standardkurve überprüft. Des Weiteren wurde nach jedem qPCR-Lauf überprüft, ob die erfassten Schmelztemperaturen der qPCR-Produkte den targetspezifischen Schmelztemperaturen entsprachen. So konnten Auffälligkeiten erfasst und gegebenenfalls in Form von Wiederholungen der qPCR-Läufe reagiert werden.

## **2. Untersuchung der Proteinkonzentration von IL1RA und IL1B in bovinen Uterussekretproben**

Im Folgenden wird die Gewinnung von bovinen Uterussekretproben und die Untersuchung der Proteinkonzentration von IL1RA und IL1B im Uterussekret (US) mittels AlphaLISA-Verfahren (Amplified luminescent proximity homogeneous assay - linked immunosorbent assay) dargestellt.

### **2.1. Probengewinnung**

Die Konzentrationsbestimmung von IL1RA und IL1B in bovinem US mittels AlphaLISA wurde in zwei unterschiedlichen Probengruppen durchgeführt. Zum einen wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit US-Proben aus Schlachtorganen gewonnen. Zum anderen wurden auch Proben untersucht, die bereits im Rahmen eines anderen Forschungsprojektes *in vivo* gewonnen worden waren (HELFRICH, 2018). Dabei wurden Proben ausgewählt, die noch ausreichend Volumen für die Verwendung in der hier vorliegenden Arbeit enthielten und nicht stark blutkontaminiert oder verdünnt waren (siehe III.2.4.). Für beide Probengruppen wurde ein von HILLMER (2018) entwickeltes und von HELFRICH (2018) modifiziertes Probenentnahmeggerät verwendet. Bei beiden Probengruppen wurden zusätzlich zu den US-Proben auch Proben für die zytologische und die bakteriologische Untersuchung gewonnen, um die Uterusgesundheit der Spender-tiere beurteilen zu können. Im Folgenden wird die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführte Beprobung der Schlachtorgane dargestellt. Die Probengewinnung mit dem „Uterus-Probenentnahmeggerät München“ *in vivo* wurde bei HELFRICH (2018) ausführlich beschrieben.

#### **2.1.1. Beschreibung und Vorbereitung der Utensilien für die Gewinnung von Uterussekret**

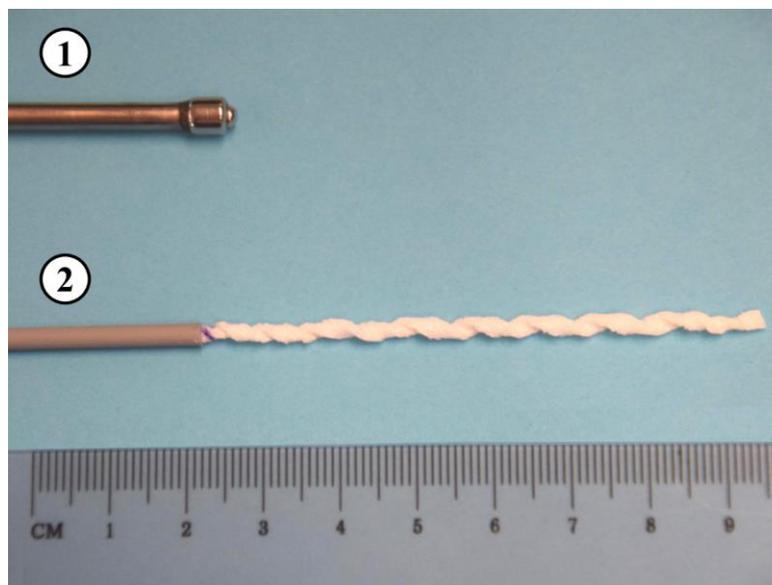
Das „Uterus-Probenentnahmeggerät München“ zur Gewinnung von US und weiteren Probentypen (Cytobrush, Biopsie) war innerhalb der Arbeitsgruppe entwickelt und modifiziert worden (HELFRICH, 2018; HILLMER, 2018). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden davon ausschließlich die zur Gewinnung von US relevanten, nachfolgend beschriebenen Bestandteile eingesetzt:

### Arbeitskanal

Ein 60 cm langes Rundrohr aus Edelstahl stellt den Arbeitskanal dar, der während der Probengewinnung intrauterin eingeführt wird. Während der Zervixpassage ist dieser durch einen Mandrin verschlossen (siehe Abbildung 4). Nach der intrauterinen Platzierung können durch den Arbeitskanal weitere Instrumente ohne wiederholte Zervixpassage eingeführt werden.

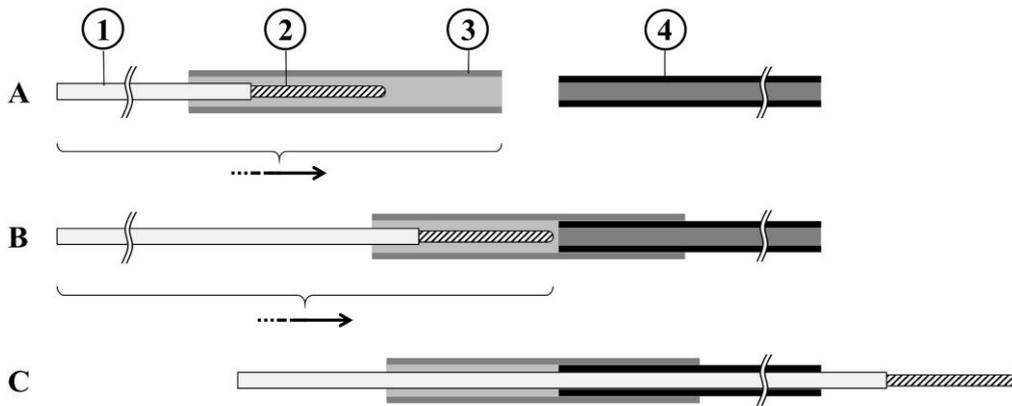
### Merocel-Schwämmchen

Als Saugmaterial für US dienen beim verwendeten Probenentnahmegesetz Merocel-Schwämmchen. Je Beprobung wird davon ein 102,5 mm x 2 mm x 4 mm großer, verdrehter Zuschnitt eingesetzt, der an der Spitze eines Führungsstabs aus Kunststoff befestigt wird (siehe Abbildung 4). Um das verdrehte Schwämmchen bei der Beprobung einfacher in den Arbeitskanal einführen zu können, beinhaltet das Probenentnahmegesetz außerdem ein Verbindungsstück. Dies ist ein Rundrohr aus Edelstahl mit 16 cm Länge, welches über das Merocel-Schwämmchen gestülpt wird. Da der Innendurchmesser des Verbindungsstücks im vorderen Bereich den Außendurchmesser des Arbeitskanals übersteigt, kann er bei der Beprobung auf das hintere Ende des im Uterus platzierten Arbeitskanals aufgesetzt und einige



**Abbildung 4: Verwendete Bestandteile des „Uterus-Probenentnahmegesetzes München“.**

Dargestellt sind die verwendeten Bestandteile des Probenentnahmegesetzes: Arbeitskanal mit Mandrin (1), dessen Spitze intrauterin platziert wird und durch den das am Führungsstab befestigte Merocel-Schwämmchen (2) für die US-Gewinnung in den Uterus eingebracht wird (modifiziert nach HELFRICH (2018)).



**Abbildung 5: Schematische Darstellung des Einführens des Merocel-Schwämmchens durch den Arbeitskanal.**

Das am vorderen Ende des Führungsstabs (1) befestigte Merocel-Schwämmchen (2) befindet sich anfangs geschützt innerhalb des Verbindungsstücks (3). Durch Aufstecken (A→B) des Verbindungsstücks auf den Arbeitskanal (4, verkürzt dargestellt) kann das Schwämmchen unmittelbar in den Arbeitskanal eingeschoben (B→C) und für die Beprobung im Uterus platziert werden.

Zentimeter über diesen geschoben werden. So kann das Merocel-Schwämmchen unmittelbar in den Arbeitskanal eingeführt und der Kontakt zur potenziell keimhaltigen Umgebungsluft reduziert werden. Abbildung 5 verdeutlicht diesen Vorgang schematisch.

Vor jeder Beprobung wurden die verwendeten Utensilien gereinigt (sofern Mehrwegmaterial) und sterilisiert. Dafür wurden folgende Methoden eingesetzt:

- Dampfsterilisation (Arbeitskanal mit Mandrin, Verbindungsstück)
- Bestrahlung mit Gammastrahlen (Merocel-Schwämmchen (Kobalt-60, Dosis 52,6 kGy) bei BBF Sterilisationservice (Kernen-Rommelshausen))
- 70 % Ethanol (Führungsstab)

Anschließend wurden alle Instrumente in Sterilisationsfolie eingeschweißt.

### 2.1.2. Ablauf der Probengewinnung

Die Auswahl der Uteri zur Gewinnung von US erfolgte analog zur Auswahl für die Explantgewinnung und unter Einbezug derselben Rassen (siehe III.1.2.).

Die Oberfläche der ausgewählten Organe wurde in einem separaten Raum des Schlachthofs mit Leitungswasser gereinigt und der äußere Muttermund mit 70 % Ethanol desinfiziert. Anschließend wurde der Arbeitskanal über die Zervix in den Uterus eingebracht und ipsilateral zum Gelbkörper im entsprechenden Ute-

rushorn platziert. Im nächsten Schritt wurde das Verbindungsstück auf das Ende des Arbeitskanals aufgesetzt und das Merocel-Schwämmchen mithilfe seines Führungsstabs in den Uterus vorgeschoben. Das Merocel-Schwämmchen wurde für 4 min im Uterus belassen und anschließend wieder durch den Arbeitskanal herausgezogen. Danach wurde das Schwämmchen umgehend mit sterilen Instrumenten gegriffen, vom Führungsstab abgesetzt und in ein Mikro-Schraubröhrchen gegeben. In diesem waren als Transportmedium vor Beginn der Probenentnahme 300 µl Extraktionspuffer vorgelegt worden (PBS mit 100 µg/ml Aprotinin). Im Anschluss wurde der Arbeitskanal wieder aus dem Uterus entfernt.

Um die Uterusgesundheit der Spendertiere beurteilen zu können, wurden anschließend Proben für die bakteriologische und zytologische Untersuchung gewonnen sowie ein LE-Test durchgeführt. Dafür wurde der Uterus erneut mit H<sub>2</sub>O gereinigt und auf einer mit autoklavierter Alufolie bedeckten Fläche ausgelegt. Er wurde wie in III.1.2. beschrieben eröffnet und mittels Bürstchen und Tupfer beprobt. Der LE-Test wurde wie in III.1.2. beschrieben durchgeführt. Im Anschluss wurden die Proben auf Eis in das Labor transportiert.

### **2.1.3. Aufbereitung der Uterussekretproben**

Jedes Merocel-Schwämmchen wurde zunächst mitsamt Mikroröhrchen auf einer Präzisionswaage gewogen. Dies diente der späteren Ermittlung des probenindividuellen Verdünnungsfaktors (siehe III.2.4.1.). Anschließend wurden die Merocel-Schwämmchen in je ein Filterröhrchen mit einer Cellulose-Acetat-Membran umgesetzt. Flüssigkeit, die noch im für den Transport verwendeten Mikroröhrchen verblieben war, wurde durch Pipettieren ebenfalls in das Filterröhrchen übertragen. Die Filterröhrchen wurden bei 14.000 x g und 20 °C für 15 min zentrifugiert und so das US extrahiert. Im Anschluss wurden die Merocel-Schwämmchen in je ein neues Filterröhrchen umgesetzt, nochmals 300 µl Extraktionspuffer hinzugegeben und der Zentrifugationsschritt wiederholt. Die US-Eluate aus beiden Zentrifugationsschritten wurden in einem weiteren Mikroröhrchen auf ein Eluat je Tier zusammengeführt. Um den Grad einer potenziellen Blutkontamination beurteilen zu können (siehe III.2.4.2.), wurde mittels photometrischer Messung die OD der Eluate bei 570 nm bestimmt. Anschließend wurden die Eluate bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Die für die Extraktion verwendeten Filtereinsätze wurden anschließend mit steri-

len Tupfern beprobt. Diese wurden auf Columbia-Agar mit Schafblut ausgestrichen und dienten als weitere Grundlage für die bakteriologische Untersuchung (siehe III.2.1.4.1.).

#### **2.1.4. Weitere Untersuchungen zur Uterusgesundheit der Spendertiere**

Um die Gesundheit der beprobten Uteri beurteilen zu können, wurde für jedes beprobte Organ eine bakteriologische und eine zytologische Untersuchung durchgeführt.

##### **2.1.4.1. Bakteriologische Untersuchung**

Für die Spendertiere der US-Gewinnung wurde die unmittelbar aus dem Uterus gewonnene Tupferprobe (siehe III.2.1.2.) sowie die Tupferprobe des Filtereinsatzes (siehe III.2.1.3.) auf Columbia-Agar mit Schafblut, Edwards-Agar und VRB-Agar ausgestrichen.

Alle Agarplatten wurden bei 37°C für 48 h inkubiert und nach 24 h sowie nach 48 h auf Keimwachstum kontrolliert. Bei der Auswertung wurden zur Unterscheidung der bakteriologisch positiven Proben von kontaminierten Proben folgende Kriterien nach HELFRICH (2018) herangezogen. Bakteriologisch positive Proben stellten dar:

- Proben mit morphologisch identischem Wachstum im Ausstrich beider Probenmaterialien mit jeweils mindestens fünf KBE, dabei maximal zwei unterschiedliche Kolonie-Morphologien
- Proben mit Wachstum von Monokulturen ausschließlich im Ausstrich der unmittelbaren Beprobung des Uterus mittels Uterustupfer mit mindestens fünf KBE

Alle anderen Proben mit Koloniewachstum wurden als Kontamination eingestuft. Im Fall eines Keimwachstums erfolgte das Anlegen einer Reinkultur, die in eine Speziesdifferenzierung mittels MALDI-TOF am Lehrstuhl für Bakteriologie und Mykologie der Ludwig-Maximilians-Universität München eingesetzt wurde.

##### **2.1.4.2. Zytologische Untersuchung**

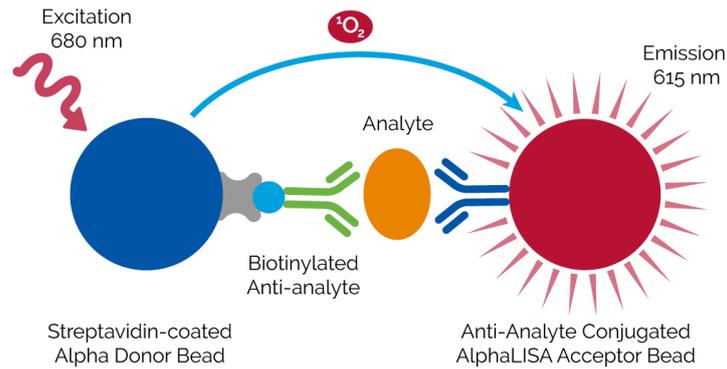
Die Behandlung und Auswertung der Objektträger im Rahmen der zytologischen Untersuchung wurde wie in III.1.5.2. beschrieben durchgeführt.

## **2.2. Bestimmung der Proteinkonzentration von IL1RA in bovinen Uterussekretproben**

In den US-Proben sollte die Proteinkonzentration von IL1RA bestimmt werden. Da US je Tier nur in kleinen Mengen gewonnen werden kann, sind für dessen Untersuchung besonders Methoden von Interesse, für die nur ein geringes Probenvolumen benötigt wird. Für die Bestimmung von Proteinkonzentrationen in US stellt daher die AlphaLISA-Untersuchung eine geeignete Methode dar, da hierfür bereits Probenvolumina ab 1  $\mu$ l eingesetzt werden können. Hierfür wurde zunächst ein *in house*-AlphaLISA zur Detektion von bovinem IL1RA entwickelt und evaluiert.

### **2.2.1. Etablierung eines AlphaLISA für bovines IL1RA**

Für einen AlphaLISA wird zunächst ein gegen das Zielprotein gerichteter Antikörper mittels reduktiver Aminierung an Akzeptor-Beads gekoppelt. Während der Durchführung des Assays wird ein weiterer, zielproteinspezifischer Antikörper eingesetzt, welcher biotinyliert ist, während die zuletzt zuzugebenden Donor-Beads streptavidinkonjugiert sind. Eine Anregung der Donor-Beads mit Licht der Wellenlänge 680 nm führt zu einer Abspaltung von reaktivem Singulett-Sauerstoff mit je einem einzelnen angeregten Elektron pro Sauerstoffmolekül. Von diesem wird wiederum Energie auf die Akzeptor-Beads übertragen, wodurch es zu einer Lichtemission kommt, die bei 615 nm messbar ist. Da sich jedoch der reaktive Singulett-Sauerstoff während einer Halbwertszeit von etwa 4 Mikrosekunden nur über eine Entfernung von maximal 200 nm bewegen kann, findet die Energieübertragung auf die Akzeptor-Beads nur dann statt, wenn sich Donor- und Akzeptor-Beads in entsprechender räumlicher Nähe befinden. Andernfalls fällt das angeregte Sauerstoffmolekül ohne messbare Emission in seinen Ausgangszustand zurück. Ist das Zielprotein in der eingesetzten Probe vorhanden, werden Akzeptor- und Donor-Beads durch die zeitgleiche Bindung beider Antikörper an das Zielprotein und die Biotin-Streptavidin-Bindung in die für die Energieübertragung erforderliche räumliche Nähe gebracht und es kommt zur messbaren Emission (vgl. Abbildung 6). Da sich die Stärke des emittierten Signals bei 615 nm Wellenlänge proportional zur Konzentration des Zielproteins in der Probe verhält, kann durch das Mitführen einer Standardkurve die Signalstärke in eine Konzentration umgerechnet werden.



**Abbildung 6: Schematische Darstellung des AlphaLISA-Prinzips.**

Die Anregung der Donor-Beads mit Licht der Wellenlänge 680 nm führt zur Abspaltung von reaktivem Singulett-Sauerstoff ( $^1\text{O}_2$ ). Befinden sich Akzeptor-Beads durch Bindung der an sie gekoppelten Antikörper an den Analyten in räumlicher Nähe, so erfolgt die Energieübertragung von  $^1\text{O}_2$  auf die Akzeptor-Beads und somit die Emission bei 615 nm (Abbildung zur Verfügung gestellt von PerkinElmer, 2021).

#### 2.2.1.1. Kopplung eines anti-IL1RA-Antikörpers an Akzeptor-Beads

Für die Etablierung eines AlphaLISA zur Detektion von bovinem IL1RA wurden zunächst 100  $\mu\text{g}$  eines spezifischen Antikörpers an 1 mg Akzeptor-Beads gekoppelt. Dieser Arbeitsschritt wurde nach den Angaben des Bead-Herstellers durchgeführt, wobei das Protokoll für die Konjugation von 1 mg Akzeptor-Beads und eine Coupling Ratio von 10:1 angewendet wurde. Die Herstellung der dafür benötigten Reagenzien ist in XI.2.4.1 beschrieben. Nach Durchführung der Kopplung erfolgte die Lagerung des Produktes in einem lichtundurchlässigen Eppendorf Tube bei 4 °C.

#### 2.2.1.2. Durchführung des AlphaLISA

Für die Durchführung des AlphaLISA auf 384-Well-AlphaPlates wurde unmittelbar vor der Verwendung die jeweils benötigte Menge an Akzeptor-Beads, eines spezifischen biotinylierten Antikörpers und an Donor-Beads in AlphaLISA HiBlock Buffer verdünnt. Um zu erfassen, welche absoluten Konzentrationen und Konzentrationsverhältnisse dieser Reagenzien und welche Inkubationsabfolge die genaueste Detektion von IL1RA ermöglicht, wurden verschiedene mögliche Varianten getestet. Das schlussendlich im weiteren Verlauf verwendete Assay-Protokoll wird in XI.2.4.2. beschrieben. Aufgrund der Lichtempfindlichkeit der Donor-Beads wurden diese nur unter Abdunkelung mit Filtern verwendet (< 100 Lux). Für die Messung der Lichtemission, welche durch die Energieübertragung auf die Akzeptor-Beads entsteht, wurde ein Mikroplattenreader verwendet, der mit einem Laser für AlphaLISA aufgerüstet wurde und unter folgenden

Einstellungen verwendet wurde: Excitation 680 nm, Emission 615 nm, Excitation time 0,30 s, Integration start 0,36 s, Integration time 0,40 s. Zur Umrechnung der Signalstärke in eine Konzentration wurde auf jeder 384-Well-AlphaPlate eine Standardkurve mitgeführt.

### **2.2.1.3. Evaluierung des AlphaLISA**

Zur Beurteilung der Qualität des etablierten AlphaLISA wurden verschiedene Teilversuche durchgeführt, die nachfolgend beschrieben werden.

#### Bestimmung des Lower Detection Limits

Nachdem sich Donor- und Akzeptor-Beads nicht nur durch eine gleichzeitige Bindung an das Zielprotein IL1RA über die beiden spezifischen Antikörper, sondern bis zu einem gewissen Maß auch zufällig in räumlicher Nähe befinden können, ist bei der Messung der Emission mit einem Hintergrundrauschen zu rechnen, welches die Sensitivität des Assays bestimmt. Das Lower Detection Limit (LDL) dient der Bestimmung der Konzentration von IL1RA, ab der das gemessene Signal von diesem Hintergrundrauschen unterschieden werden kann. Zur Ermittlung des LDLs des etablierten Assays wurde entsprechend der Herstellerangaben ein sogenannter Background zwölfmal pipettiert, in welchem statt einer Probe oder Standardkonzentration das entsprechende Volumen AlphaLISA HiBlock Buffer eingesetzt wurde. Zum Mittelwert der erhaltenen zwölf Signalwerte wurde die dreifache Standardabweichung (SD) addiert. Die zu dieser Signalthöhe korrespondierende IL1RA-Konzentration kann nun anhand der Standardkurve zugeordnet werden und stellt das LDL dar.

#### Untersuchung der Intra-Assay-Variation

Zur Bestimmung der Intra-Assay-Variation wurden der Variationskoeffizient (CV) der Standardpunkte herangezogen. In 18 Durchführungen des AlphaLISA wurden die Standardpunkte dreifach pipettiert, anschließend für jeden Standardpunkt der CV innerhalb einer Assaydurchführung berechnet und die Ergebnisse über alle Durchführungen gemittelt.

#### Untersuchung der Inter-Assay-Variation

Um die Inter-Assay-Variation des entwickelten AlphaLISA zu ermitteln, wurden US-Proben von drei zufällig ausgewählten Tieren jeweils im Dreifachansatz in

den AlphaLISA eingesetzt und aus den gemittelten Signalen mithilfe der Standardkurve die IL1RA-Konzentration in den Proben berechnet. Nachdem dieses Vorgehen mit denselben Proben an zwei weiteren Versuchstagen mit neu angesetzten Reagenzien wiederholt worden war, wurde für jede Probe der CV über die drei Versuchstage bestimmt.

#### Bestimmung des Hook Points

Das Phänomen des Hook Effektes in einem Sandwich Immunoassay tritt auf, wenn in einer eingesetzten Probe das Zielprotein so hoch konzentriert ist, dass die Bindungsstellen beider Antikörper auch ohne die Bildung eines Sandwichkomplexes gesättigt sind. Im Falle eines AlphaLISA ist diese Komplexbildung nötig, um Donor- und Akzeptor-Beads in die für die Energieübertragung und somit für die Signalentstehung erforderliche räumliche Nähe zu bringen. Während unterhalb des Hook Points mit dem Anstieg der Proteinkonzentration des Analyten vermehrt Donor- und Akzeptor-Beads in die notwendige räumliche Nähe gebracht werden und somit das emittierte Signal steigt, wird oberhalb des Hook Points durch weiteres Ansteigen der Konzentration die Annäherung der Beads zunehmend behindert und das Signal nimmt entsprechend wieder ab. Um zu erfassen, in welchem Konzentrationsbereich des Zielproteins der Hook Point beim hier etablierten AlphaLISA liegt, wurde der Assay mit einer erweiterten Standardkurve durchgeführt, in der Standardpunkte bis zu einer IL1RA-Konzentration von 2.000 ng/ml aufgetragen wurden.

#### Untersuchung der Wiederfindungsrate

Um die Messgenauigkeit des etablierten AlphaLISA zu beurteilen, wurden gespikete Puffer- und US-Proben im Dreifachansatz eingesetzt. Dafür wurde AlphaLISA HiBlock Buffer oder US, dessen Konzentration an nativem IL1RA bereits gemessen worden war, eine vorab bestimmte, variierende Menge rekombinantes bovines IL1RA zugesetzt. Nach der Durchführung des Assays wurde berechnet, welcher Anteil der vorab errechneten Konzentration im Assay tatsächlich wiedergefunden wurde (theoretischer Idealwert = 100 %).

### **2.2.2. Anwendung des AlphaLISA zur Messung der Konzentration von IL1RA in bovinen Uterussekretproben**

Mit dem etablierten AlphaLISA wurde die IL1RA-Konzentration in den US-Proben aus *in vivo*-Gewinnung und aus Schlachtorganproben bestimmt. Dabei wurde der Background sechsfach, die Standardpunkte dreifach und die Proben doppelt pipettiert. Betrag der Variationskoeffizient der Mehrfachansätze mehr als 10 %, wurde die Untersuchung der Proben wiederholt. Die Durchführung des AlphaLISA für IL1RA erfolgte gemäß der in III.2.2.1.2. beschriebenen Vorgehensweise und unter Anwendung des in XI.2.4.2. dargestellten Protokolls.

### **2.3. Bestimmung der Konzentration von IL1B in bovinen Uterussekretproben**

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die IL1B-Konzentration in US-Proben aus Schlachtorganen gemessen. Dazu wurde ein kommerziell erhältliches AlphaLISA-Kit für bovines IL1B und 384-Well-AlphaPlates verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben (siehe XI.2.4.3.). Der Background wurde sechsfach, die Standardpunkte dreifach und die Proben doppelt pipettiert. Betrag der Variationskoeffizient der Mehrfachansätze mehr als 10 %, wurde die Untersuchung der Proben wiederholt.

Die Messung von IL1B in *in vivo* gewonnenen US-Proben war bereits von HELFRICH (2018) durchgeführt worden.

### **2.4. Rechnerische Korrekturen**

Zur Ermittlung der tatsächlichen IL1RA- und IL1B-Konzentrationen im US erfolgten nach der Durchführung der AlphaLISA rechnerische Korrekturen, die nachfolgend beschrieben werden.

#### **2.4.1. Rechnerische Korrektur der Verdünnung des Uterussekrets durch Extraktionspuffer**

Für den Transport des US sowie für die Extraktion aus dem Merocel-Schwämmchen wurden je Probe insgesamt 600 µl Extraktionspuffer eingesetzt (siehe III.2.1.2. und III.2.1.3.). Daher entsprachen die mittels AlphaLISA gemessenen Analytkonzentrationen nicht denen in unverdünntem US. Da aus jedem Uterus ein individuelles Volumen an US über das Merocel-Schwämmchen gewonnen wurde, musste zur exakten Bestimmung der Analytkonzentration im US ein probenindividueller Verdünnungsfaktor  $F$  berücksichtigt werden. Dieser wur-

de unter Berücksichtigung der Masse von Filterröhrchen, Schwämmchen vor und nach der Beprobung und Extraktionspuffer für jede Probe berechnet. Die dabei verwendeten Formeln werden in XI.2.4.4. erläutert. Die in unverdünntem US vorliegende Analytkonzentration wurde durch Multiplikation der mittels AlphaLISA ermittelten Konzentration jeder Probe mit dem probenspezifischen Verdünnungsfaktor  $F$  berechnet. Im Fall von sehr stark verdünntem US ( $F \geq 50$ ) wurde die betroffene Probe von der Auswertung der Ergebnisse ausgeschlossen.

#### **2.4.2. Rechnerische Korrektur der Blutkontamination von *in vivo* gewonnenem Uterussekret**

Da insbesondere bei der US-Gewinnung *in vivo* nicht auszuschließen war, dass kleine Schleimhautverletzungen eine Blutkontamination des gewonnenen US herbeiführen (HELFRICH, 2018), musste mit einer daraus resultierenden potenziellen Verfälschung der Analytkonzentration im US gerechnet werden. Falls die Analytkonzentration im Blut die Analytkonzentration im US unter- oder übersteigt, führt dies möglicherweise zu einer Unter- oder Überschätzung der Analytkonzentration im US. Daher wurde zunächst mittels photometrischer Messung die Blutkontamination der US-Proben quantifiziert. Für die Quantifizierung der Blutproben war von HELFRICH (2018) eine Standardkurve mit zwölf Standardpunkten unterschiedlichen Blutkontaminationsgrades erstellt und bei 570 nm photometrisch gemessen worden. Die sich ergebende Formel zur Berechnung der Blutkontamination der US-Proben ist in XI.2.4.5. dargestellt. Die Blutkontamination der *in vivo* gewonnenen US-Proben war bereits quantifiziert worden (HELFRICH, 2018). Die Blutkontamination der US-Proben aus Schlachtorganen wurde nach dem gleichen Prinzip durchgeführt.

Während im Fall der US-Proben aus Schlachtorganen die Blutkontamination vernachlässigbar niedrig war, war dies bei den *in vivo* gewonnenen US-Proben nicht der Fall (siehe IV.1.3.2.). Entsprechend war bei den *in vivo* gewonnenen US-Proben eine rechnerische Korrektur der mittels AlphaLISA gemessenen Proteinkonzentrationen von IL1B und IL1RA notwendig. Dafür war unmittelbar bei der Gewinnung von US bei jedem beprobten Tier zusätzlich eine Blutprobe aus der Schwanzvene (*Vena caudalis mediana*) genommen und anschließend mittels Zentrifugation eine Plasmaprobe hergestellt worden (HELFRICH, 2018). Mittels der in III.2.3. und III.2.2.2. beschriebenen AlphaLISA wurde die Konzentration von IL1B (HELFRICH, 2018) bzw. IL1RA in den Plasmaproben gemessen. Die

Formeln zur rechnerischen Korrektur der Analytkonzentration im US um die Analytkonzentration im Plasma werden in XI.2.4.5. dargestellt. Ab einer prozentualen Blutkontamination von 33 % wurden Proben von der Auswertung der Ergebnisse ausgeschlossen.

### **2.5. Berechnung des IL1RA/IL1B-Verhältnisses auf Proteinebene in bovinen Uterussekretproben**

Zur Berechnung des IL1RA/IL1B-Verhältnisses wurde je Tier die ermittelte IL1RA-Konzentration durch die ermittelte IL1B-Konzentration dividiert. Da die Ergebnisse des AlphaLISA für IL1RA in der Einheit ng/ml und die Ergebnisse des AlphaLISA für IL1B in der Einheit pg/ml vorlagen, wurden die IL1RA-Konzentrationen in pg/ml umgerechnet.

## **3. Statistische Analyse**

Für die statistische Auswertung wurde die Programmiersprache und -umgebung R (Version 4.1.1 (2021-08-10)) und die Benutzeroberfläche R-Studio (Version 1.4.1717 © 2009-2021 RStudio, PBS) genutzt.

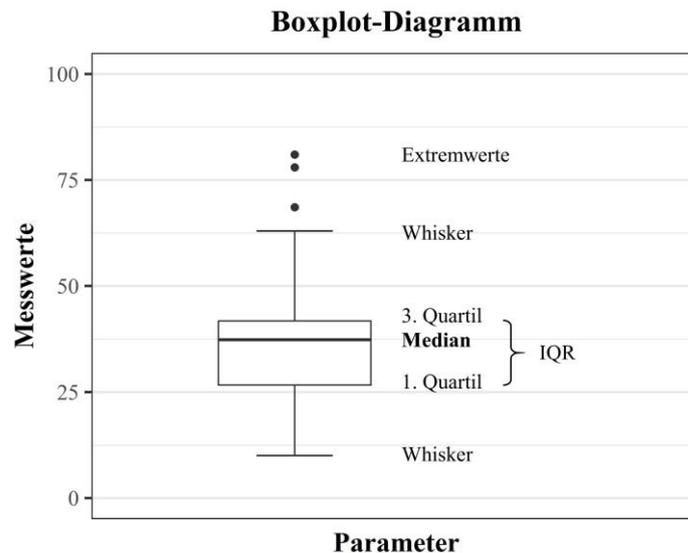
### **3.1. Deskriptive statistische Analyse**

Im Rahmen der deskriptiven Statistik erfolgte die Berechnung von Mittelwert oder Median (je nach Vorhandensein von Extremwerten) sowie von Standardabweichung, 1. und 3. Quartil und die Erstellung von Diagrammen. Zur Visualisierung wurden in dieser Arbeit hauptsächlich Boxplot-Diagramme genutzt. Deren Aufbau ist in Abbildung 7 exemplarisch dargestellt.

### **3.2. Induktive statistische Analyse**

Die Ergebnisse der Untersuchung der Regulation der Genexpression von IL1B und IL1RA in bovinen endometrialen Explants sowie der Untersuchung der Konzentration von IL1B und IL1RA in bovinen Uterussekretproben wurden mittels Verfahren der induktiven Statistik ausgewertet.

Die ermittelten p-Werte der nachfolgend beschriebenen statistischen Tests finden sich tabellarisch zusammengefasst im Anhang dieser Arbeit (siehe XI.3.).



**Abbildung 7: Beispielhafte Darstellung eines Boxplot-Diagramms.**

In der Box sind 50 % der Messwerte umschrieben (Interquartilsabstand (IQR)). Sie wird nach unten durch das 1. Quartil und nach oben durch das 3. Quartil begrenzt. Der Median wird durch einen verdickt dargestellten horizontalen Strich innerhalb der Box dargestellt. Oberhalb und unterhalb der Box zeigen Whiskers nach der Definition von John W. Tukey die maximalen bzw. minimalen Messwerte an, die jeweils innerhalb einer Entfernung von  $1,5 \times \text{IQR}$  von der Box entfernt liegen. Außerhalb liegende Extremwerte sind als • dargestellt.

### 3.2.1. Auswertung der Daten aus der Explantkultur

Zur Untersuchung der Regulation der endometrialen Genexpression von IL1B und IL1RA in bovinen endometrialen Explants unter dem Einfluss verschiedener Koinkubationsansätze wurden die mittels Reverse Transkriptase qPCR gewonnenen Daten unter Einsatz von multivariaten gemischten Modellen verglichen. Dabei wurden die verwendeten Koinkubationsansätze in bakterielle Komponenten (*E. coli*, *B. pumilus* und *L. buchneri*) und Interleukine (IL1B, IL17A, IL10) untergliedert und die Daten innerhalb dieser Gruppen sowie mit der entsprechenden Kontrolle verglichen. Dabei wurden jeweils einzeln die Genexpressionen von IL1B und IL1RA sowie das IL1RA/IL1B-Verhältnis auf Genexpressionsebene betrachtet.

Zunächst wurde jeweils die Verteilung der Daten mittels graphischer Visualisierung betrachtet. Aufgrund der starken Streuung wurden die Daten vor der Durchführung der nachfolgend beschriebenen statistischen Tests logarithmiert. Zur Auswahl des korrekten gemischten Modells wurden folgende Annahmen getestet:

- Normalverteilung der Daten mittels Shapiro-Wilk-Test und zusätzlicher graphischer Darstellung (Nullhypothese ( $H_0$ ): ‚Die Daten sind normalverteilt‘)
- Heteroskedastizität der Varianzen mittels Breusch-Pagan-Test
- Homogenität der Varianzen mittels Bartlett-Test
- Detektierung von Extremwerten

Bei Erfüllung der Annahmen wurde für die vergleichende Untersuchung des Einflusses der verschiedenen Koinkubationen ein lineares gemischtes Modell (linear mixed-effects model, R-Funktion `lme4::lmer`) für die Daten berechnet. Wurden die Annahmen nicht erfüllt, wurde stattdessen ein robustes gemischtes Modell (R-Funktion `robustlmm::rlmer`) berechnet. Anschließend wurde mit dem errechneten Modell mittels Multiplem paarweisen Vergleich (R-Funktion `emmeans::emmeans`) auf  $H_0$ : ‚Die zu vergleichenden Gruppen unterschieden sich nicht voneinander‘ getestet. Die Berechnung der p-Werte erfolgte für beide Modelle unter Anwendung der Tukey-Korrektur für multiple Vergleiche.

### 3.2.2. Auswertung der Daten der Uterussekretproben

Zur Untersuchung der AlphaLISA-Ergebnisse zur IL1B- und IL1RA-Konzentration im Uterussekret in Abhängigkeit von der Gebärmuttergesundheit wurden die beprobten Tiere in zwei Gruppen eingeteilt. Entscheidend war hierbei der PMN-Anteil in der zytologischen Untersuchung (siehe III.2.1.4.2.). Bei einem PMN-Anteil  $< 5\%$  wurde das Spendertier der Gruppe  $SE_{neg}$  zugewiesen, einem PMN-Anteil von  $5\%$  der Gruppen keine  $SE_{pos}$ .

Die Auswertung erfolgte mittels einfachem paarweisen Vergleich dieser beiden Gruppen jeweils einzeln für die Konzentration von IL1B und IL1RA sowie deren Konzentrationsverhältnis IL1RA/IL1B. Dabei wurde nach Gewinnungsart der Proben (*in vivo* oder am Schlachtorgan) getrennt. Aufgrund der starken Streuung wurden die Daten für die nachfolgende induktive Statistik logarithmiert. Die Überprüfung der Daten auf Normalverteilung ( $H_0$ : ‚Die Daten sind normalverteilt‘) erfolgte mittels Shapiro-Wilk-Test und zusätzlicher graphischer Darstellung.

Im Fall einer Normalverteilung der Daten wurde im nächsten Schritt die Homogenität der Varianzen mittels Levene-Test überprüft. Da in allen betroffenen Fäl-

len die Varianzen homogen verteilt waren, wurde hier der paarweise Vergleich mittels Student's t-Test durchgeführt ( $H_0$ : ‚Die Mittelwerte beider Gruppen unterscheiden sich nicht voneinander‘).

Waren die Daten nicht normalverteilt, wurde der paarweise Vergleich mit dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt ( $H_0$ : ‚Die Mediane beider Gruppen unterscheiden sich nicht voneinander‘).

Die AlphaLISA-Ergebnisse wurden zudem auf Unterschiede zwischen den *in vivo* und den am Schlachtorgan gewonnenen Proben untersucht. Hierbei wurden, diesmal getrennt nach den Gruppen  $SE_{neg}$  und  $SE_{pos}$ , die Konzentrationen von IL1B und IL1RA sowie deren Konzentrationsverhältnis für die beiden Arten der Probengewinnung paarweise miteinander verglichen. Das statistische Vorgehen wurde dabei analog zum vorausgehend beschriebenen Verfahren beim Vergleich der Gruppen  $SE_{neg}$  und  $SE_{pos}$  durchgeführt.

Ein multipler paarweiser Vergleich, der Gebärmuttergesundheit und Gewinnungsart kombiniert, wurde als nicht sinnvoll erachtet und daher nicht durchgeführt.

### 3.2.3. Einordnung der Ergebnisse und Kategorisierung der p-Werte

Für die beschriebenen multiplen bzw. einfachen paarweisen Vergleiche wurde das Signifikanzniveau  $\alpha$ , bei dessen Unterschreiten  $H_0$  abgelehnt wird, auf 5 % festgelegt. Die p-Werte als Ergebnisse der durchgeführten statistischen Tests wurden wie folgt kategorisiert:

- $0,05 \leq p\text{-Wert} < 0,1$ : Tendenz (Kennzeichnung °)
- $0,01 \leq p\text{-Wert} < 0,05$ : Signifikantes Ergebnis (\*)
- $0,001 \leq p\text{-Wert} < 0,01$ : Hochsignifikantes Ergebnis (\*\*)
- $p\text{-Wert} < 0,001$ : Höchstsignifikantes Ergebnis (\*\*\*)

Die angeführten Kennzeichnungen des Signifikanzniveaus werden in den Boxplot-Diagrammen im Falle von beim Vergleich festgestellter signifikanter Unterschiede zwischen Gruppen zur graphischen Verdeutlichung mit angegeben.

## **IV. ERGEBNISSE**

Im Folgenden wird zunächst auf die Qualität der eingesetzten Methoden eingegangen (Explantkultur, Reverse Transkriptase-qPCR, Gewinnung von Uterussekret (US) mit dem verwendeten Probeentnahmegesäß, AlphaLISA). Anschließend werden die Ergebnisse der Untersuchungen zur Uterusgesundheit der Spendertiere von Explants und US-Proben aufgeführt. Schließlich werden die Ergebnisse zur Regulation der Genexpression von IL1B und IL1RA in endometrialen Explants sowie die Proteinkonzentration von IL1B und IL1RA in bovinen US-Proben in Abhängigkeit von Uterusgesundheit und Gewinnungsart (am lebenden Tier (*in vivo*)/Schlachtorgan) dargestellt.

### **1. Methodische Vorarbeiten**

#### **1.1. Evaluierung der Explantkultur**

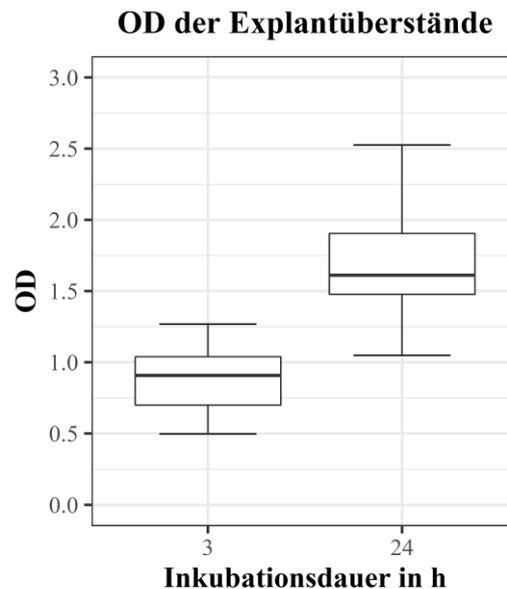
Um die Aussagekraft der Ergebnisse des Explantkulturversuchs beurteilen zu können, wurden ausgewählte, nachfolgend aufgeführte Parameter untersucht.

##### **1.1.1. Untersuchung der Stoffwechselaktivität**

Um die Vitalität der Explants nach 24 h Inkubation beurteilen zu können, wurde die Stoffwechselaktivität der Explants begleitend untersucht. Je höher die Stoffwechselaktivität der Zellen im Explant ist, desto mehr WST-8 wird zu Formazan reduziert und desto höher ist die optische Dichte (OD) der Explantüberstände bei photometrischer Messung (560 nm).

##### **1.1.1.1. Vergleich der Stoffwechselaktivität nach 3 h und 24 h Inkubation**

Um zu überprüfen, ob sich die Stoffwechselaktivität der Explants zwischen Inkubationsbeginn und -ende veränderte, wurde die OD von Überständen von Explants untersucht, die ausschließlich mit Inkubationsmedium sowie in den jeweils letzten drei Inkubationsstunden mit WST-8 inkubiert wurden. Dabei wurden die OD der Überstände nach 3 h Inkubation (OD<sub>3</sub>) und nach 24 h Inkubation (OD<sub>24</sub>) verglichen. Nach Abzug des Leerwertes (siehe III.1.4.) betrug OD<sub>3</sub> im Mittel 0,88 (SD = 0,23) und OD<sub>24</sub> im Mittel 1,66 (SD = 0,37). Die photometrisch gemessenen Werte aller beprobten Tiere ( $n = 26$ ) sind für beide Zeitpunkte in Abbildung 8 zusammengefasst.



**Abbildung 8: Analyse der Stoffwechselaktivität der Explants mittels WST-8-Reduktionsmessung.**

Die Stoffwechselaktivität der Explants nach 3 h und nach 24 h Inkubation wurde in Form der Reduktion von WST-8 zu Formazan ermittelt. Dabei wurde jeweils 3 h vor Inkubationsende WST-8 zugegeben und die OD mittels photometrischer Messung bei 560 nm gemessen. Je Tier ( $n = 26$ ) wurden dafür zwei Explants je Inkubationsdauer verwendet.

#### **1.1.1.2. Einfluss der Koinkubationsansätze auf die Stoffwechselaktivität**

Des Weiteren wurde an Explants von einem Spendertier exemplarisch überprüft, ob die eingesetzten Koinkubationsansätze die Stoffwechselaktivität der Explants im Verlauf der Inkubation beeinflussen. Die OD von Explantüberständen wurde nach 3 h sowie nach 24 h Koinkubation mit jeweils einem der in III.1.3. aufgeführten Ansätzen untersucht (zwei Explants je Koinkubationsansatz und Zeitpunkt). Ähnlich wie beim Vergleich der Stoffwechselaktivität nach 3 h und nach 24 h Inkubation mit ausschließlich Inkubationsmedium, wurde auch nach Inkubation mit den verwendeten Koinkubationsansätzen in allen Fällen  $OD_3$  von  $OD_{24}$  überstiegen.

#### **1.1.2. Einfluss der Kultivierung auf die Genexpression von IL1B und IL1RA**

Zur Detektion von quantitativen Veränderungen der Genexpression von IL1B und IL1RA im Verlauf der Inkubation wurden die qPCR-Ergebnisse der Kontrollen (nur Medium) nach 3, 14 und 24 h Inkubation verglichen. Dabei zeigte sich ein signifikantes bzw. höchstsignifikantes Absinken der IL1B-Expression zwischen 3 und 14 h bzw. zwischen 3 und 24 h Inkubation ( $p = 0,024$  bzw.  $p < 0,001$ ). Bei der IL1RA-Expression stellte sich ein hochsignifikanter bzw. signifikanter An-

stieg zwischen 3 und 14 h bzw. 3 und 24 h Inkubation dar ( $p = 0,001$  bzw.  $p = 0,011$ ). Das Verhältnis der IL1RA-Expression zur IL1B-Expression stieg zwischen 3 und 14 h sowie zwischen 3 und 24 h höchstsignifikant an (jeweils  $p < 0,001$ ). Zwischen 14 h und 24 h konnten jeweils keine signifikanten Veränderungen festgestellt werden.

## **1.2. Qualität der Reverse Transkriptase-qPCR**

Bei der molekularbiologischen Untersuchung der Explants wurden folgende Qualitätskontrollen durchgeführt, um die Aussagekraft der Ergebnisse beurteilen zu können: Qualität der aus den Explants extrahierten RNA, Konzentration der synthetisierten cDNA, Qualität der qPCR-Läufe und Targetspezifität der Fluoreszenz in der qPCR.

### **1.2.1. RNA-Qualität**

Zur Detektion von degradierter RNA wurde im Anschluss an die RNA-Extraktion aus den Explants aus jeder RNA-Probe 1  $\mu$ l in eine automatisierte Kapillarelektrophorese eingesetzt. Der dabei berechnete RNA Quality Index (RQI) drückt die RNA-Qualität aus, wobei eine gute RNA-Qualität ab  $RQI > 5$  angenommen werden kann (FLEIGE & PFAFFL, 2006). Der RQI betrug im Median 9,1. Bei einer Probe wurde ein RQI von 2,5 festgestellt. Diese Probe wurde daher von der weiteren Auswertung ausgeschlossen. Die Spannweite des RQI der übrigen Proben reichte von 6,5 bis 9,9 mit einem Mittelwert von 9,0 ( $SD = 0,57$ ).

### **1.2.2. cDNA-Konzentration**

Die cDNA-Konzentration der synthetisierten cDNA betrug im Mittel 662,6 ng/ $\mu$ l ( $SD = 117,7$  ng/ $\mu$ l). Sie wurde anschließend durch die Zugabe des entsprechenden Volumens an RNase-freiem H<sub>2</sub>O einheitlich auf 200 ng/ $\mu$ l eingestellt.

### **1.2.3. Qualität der qPCR-Läufe**

Zur Beurteilung der Qualität der qPCR und der Vergleichbarkeit der verschiedenen qPCR-Läufe je Gen wurden zu jedem qPCR-Lauf Effizienz und Bestimmtheitsmaß der Standardkurve erfasst. Anzustreben ist eine Effizienz zwischen 90 % und 110 % und ein Bestimmtheitsmaß von mindestens 0,985. Für IL1B betrug die Effizienz der Standardkurve im Mittel 89,0 % ( $SD = 3,3$  %), das Bestimmtheitsmaß 0,99 ( $SD = 0,00$ ). Für IL1RA betrug die Effizienz der Standardkurve im Mittel 96,6 % ( $SD = 7,1$  %), das Bestimmtheitsmaß 0,99 ( $SD = 0,01$ ).

#### **1.2.4. Überprüfung der qPCR-Ergebnisse auf Targetspezifität**

Um mögliche nicht-targetspezifische Fluoreszenz als solche zu detektieren und somit eine Fehlinterpretation der Ergebnisse zu vermeiden, wurden Negativkontrollen und –RT-Kontrollen eingesetzt sowie die Schmelztemperatur der qPCR-Produkte kontrolliert.

##### **1.2.4.1. Ergebnisse der Negativkontrollen**

Die Negativkontrollen enthielten statt einer Probe nukleasefreies H<sub>2</sub>O und wurden auf jede Platte vier- bis sechsfach pipettiert. Dabei wurde nur im Fall eines qPCR-Laufes für IL1B bei einer der sechs mitgeführten Negativkontrollen ein C<sub>t</sub> innerhalb der 40 durchgeführten qPCR-Zyklen detektiert (zugehörige Konzentration = 6,8 Kopien/μl). Die zugehörige Schmelztemperatur stimmte jedoch nicht mit der targetspezifischen Schmelztemperatur überein. Daher ist in diesem Fall von einer unspezifischen Fluoreszenz auszugehen. Für alle übrigen Negativkontrollen konnte innerhalb von 40 qPCR-Zyklen kein C<sub>t</sub> detektiert werden.

##### **1.2.4.2. Ergebnisse der –RT-Kontrollen**

Die mitgeführten –RT-Kontrollen wurden bei der vorausgegangenen cDNA-Synthese erstellt, indem bei ihnen keine Reverse Transkriptase eingesetzt wurde. Daher sollten die –RT-Kontrollen ausschließlich RNA, aber keine DNA enthalten und somit kein C<sub>t</sub> detektierbar sein. Im Ergebnis blieb sowohl für IL1B als auch für IL1RA nur ein Teil der –RT-Kontrollen während der 40 qPCR-Zyklen gänzlich ohne C<sub>t</sub>. Die prozentualen Anteile der –RT-Kontrollen mit und ohne detektierten C<sub>t</sub> sind in Tabelle 2 dargestellt. Die Schmelztemperaturen der qPCR-Produkte aus den –RT-Kontrollen mit detektiertem C<sub>t</sub> lagen jeweils im Bereich der Schmelztemperaturen der Zielsequenzen (vervielfältigte Genabschnitte von IL1B und IL1RA). Daher war anhand der Schmelztemperatur keine Abgrenzung zwischen den qPCR-Produkten aus den –RT-Kontrollen und den Zielsequenzen möglich. Jedoch kann es sich in solchen Fällen auch um eine unspezifische Fluoreszenz durch andere Sequenzen mit gleicher Schmelztemperatur handeln. Die berechneten mittleren Konzentrationen der betroffenen –RT-Kontrollen lagen deutlich unterhalb der Konzentrationen der niedrigsten Standardpunkte und der regulären Proben. Zur Verdeutlichung ist daher die mittlere Konzentration des niedrigsten Standardpunktes ebenfalls mit angegeben.

**Tabelle 2: Verteilung der qPCR-Ergebnisse der –RT-Kontrollen und mittlere Konzentrationen von –RT-Kontrollen und niedrigstem Standardpunkt.**

qPCR-Ergebnis der –RT-Kontrollen	IL1B	IL1RA
<b>Beide Ansätze des Doppelansatzes ohne C<sub>t</sub> oder niedriges unspezifisches Signal <sup>*)</sup></b>	43,9 %	73,2 %
<b>Ein Ansatz des Doppelansatzes mit C<sub>t</sub></b>	31,7 %	14,6 %
<b>Beide Ansätze des Doppelansatzes mit C<sub>t</sub></b>	24,4 %	12,2 %
<b>Mittlere Konzentration der –RT-Kontrollen in Kopien/μl (SD)</b>	18,3 (5,2)	0,8 (0,4)
<b>Mittlere Konzentration des niedrigsten Standardpunktes in Kopien/μl (SD)</b>	79,9 (9,5)	85,4 (15,5)

Aufgeführt sind die prozentualen Anteile der –RT-Kontrollen mit und ohne innerhalb von 40 qPCR-Zyklen detektiertem C<sub>t</sub> an der Gesamtheit der –RT-Kontrollen ( $n = 41$  je Gen). Wurde ein C<sub>t</sub> detektiert, befand sich die zugehörige Konzentration in einem in Relation zu den Standardpunkten und regulären Proben niedrigen Bereich.

<sup>\*)</sup> In einigen wenigen Fällen wurde ein C<sub>t</sub> detektiert, jedoch ist aufgrund der dazugehörigen Schmelztemperatur hier von unspezifischer Fluoreszenz auszugehen.

Um auszuschließen, dass es sich bei den qPCR-Produkten aus den –RT-Kontrollen mit detektiertem C<sub>t</sub> um targetspezifische DNA handelt, wurde nachträglich sowohl für IL1B, als auch für IL1RA eine zusätzliche, konventionelle PCR durchgeführt.

In diese wurden jeweils –RT-Kontrollen mit detektiertem C<sub>t</sub> und solche ohne innerhalb von 40 Zyklen detektierbarem C<sub>t</sub> eingesetzt. Zusätzlich wurden jeweils reguläre Proben eingesetzt, in denen mittels qPCR ein Produkt mit passender Schmelztemperatur nachgewiesen worden war. Das Protokoll für die konventionelle PCR findet sich in XI.2.3.5.1., wobei in diesem Fall statt 30 Zyklen 40 Zyklen durchgeführt wurden. Die Produkte der konventionellen PCR wurden in eine Kapillar-Elektrophorese eingesetzt, für die ein handelsübliches Kit nach Herstellerangaben eingesetzt wurde. Dabei zeigte sich im Fall der regulären Proben das jeweils erwartete targetspezifische Bandenmuster. Die entsprechenden Produkte der konventionellen PCR wurden mit einem handelsüblichen Kit nach Herstellerangaben aufgereinigt und zur Sequenzierung gegeben (Eurofins

Genomic – Life Science Services, Ebersberg). Dabei ergab sich für alle ermittelten Sequenzen eine Übereinstimmung mit der Zielsequenz von 95 % bis 98 %. In keinem PCR-Produkt aus –RT-Kontrollen konnte ein targetspezifisches Bandenmuster detektiert werden. Daher ist davon auszugehen, dass es sich bei den –RT-Kontrollen mit detektiertem  $C_i$  um unspezifische Fluoreszenzen handelt, deren Ursache im Rahmen dieser Arbeit nicht abschließend ermittelt werden konnte.

Da die qPCR in der Regel für die regulären Proben weit höhere Konzentrationen ergab (siehe IV.2.), ist davon auszugehen, dass die Auswertbarkeit der qPCR-Ergebnisse nicht beeinträchtigt wird. Die wenigen regulären Proben, deren qPCR-Ergebnisse im Konzentrationsbereich der –RT-Kontrollen lagen, wurden von der Auswertung ausgeschlossen.

#### **1.2.4.3. Schmelztemperatur der qPCR-Produkte**

Nach allen Läufen der qPCR wurden jeweils targetspezifische Schmelztemperaturen der qPCR-Produkte detektiert.

### **1.3. Evaluierung der Untersuchung von Uterussekretproben**

Um mögliche Verfälschungen der Proteinkonzentrationen von IL1B und IL1RA im US durch die Probengewinnung zu korrigieren, wurde die Verdünnung des US durch den Extraktionspuffer sowie im Fall der *in vivo* gewonnenen Proben die Kontamination durch Blut berücksichtigt und rechnerisch korrigiert.

#### **1.3.1. Verdünnung des Uterussekrets**

Da aus jedem Uterus ein individuelles Volumen an US über das Merocel-Schwämmchen gewonnen wurde, musste zur exakten Bestimmung der Analytkonzentration im US ein probenindividueller Verdünnungsfaktor berücksichtigt werden. Dieser wurde für jede Probe mittels der Masse des vom Schwämmchen aufgenommenen US berechnet. Eine starke Verdünnung des US (Verdünnungsfaktor über 50) wurde als Ausschlusskriterium der Probe für die Auswertung der Analytkonzentration festgelegt.

Bei den aus Schlachtororganen gewonnenen US-Proben ( $n = 37$ ) reichte die Spanne des berechneten Verdünnungsfaktors von 1,4 bis 32,1 und betrug im Median 4,5. Somit musste keine Probe aufgrund eines zu hohen Verdünnungsfaktors ausgeschlossen werden.

Bei den ausgewählten *in vivo* gewonnenen US-Proben ( $n = 26$ ) reichte die Spanne des von HELFRICH (2018) berechneten Verdünnungsfaktors von 2,7 bis 41,0 und betrug im Median 9,0.

### 1.3.2. Blutkontamination der Uterussekretproben

Der Grad der Blutkontamination der US-Proben konnte mittels einer photometrischen Messung und einer erstellten Standardkurve berechnet werden (siehe III.2.4.2. und XI.2.4.5.).

Im Fall der Schlachtorganproben reichte die Spanne der berechneten Blutkonzentration von 0,2 % bis 33,5 % und betrug im Median 1,0 % (Nachweisgrenze von Blutkontamination: 2,18 % (HELFRICH, 2018)). Nach Ausschluss der US-Probe mit einer Blutkontamination von 33,5 % von der weiteren Auswertung betrug die maximale Blutkontamination 2,7 %. Daher war im Fall der Schlachtorganproben der Einfluss von potenziellen Blutkontaminationen vernachlässigbar.

Bei den ausgewählten *in vivo* gewonnenen US-Proben reichte die Spanne der von HELFRICH (2018) berechneten Blutkontamination von 2,2 % bis 22,4 % und betrug im Median 3,9 %. Bis zu einer Blutkontamination  $< 33$  % wurde die rechnerische Korrektur der Blutkontamination (siehe III.2.4.2.) und der Einbezug der Probe in die weitere Auswertung als sinnvoll erachtet (HELFRICH, 2018).

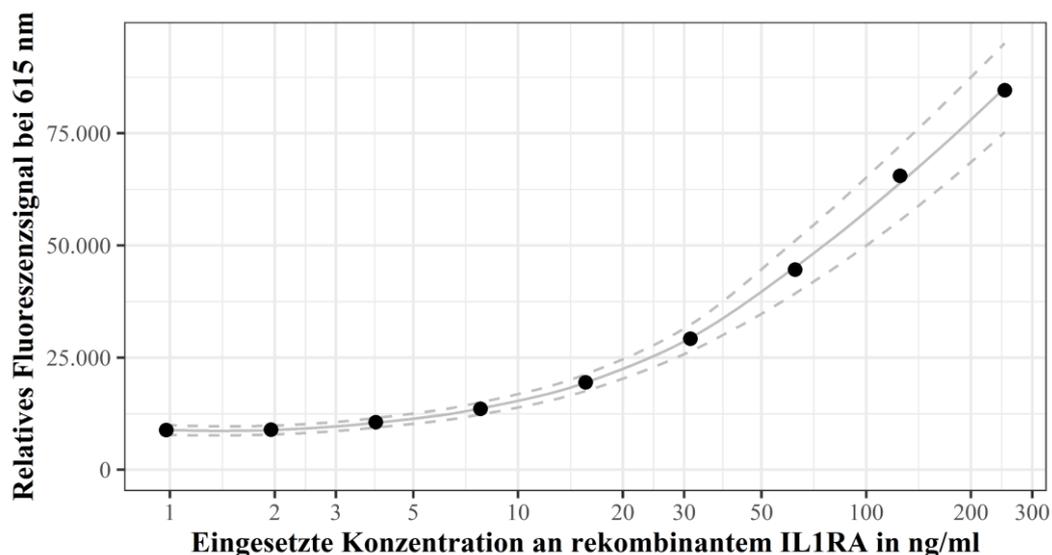
Für alle *in vivo* beprobten Tiere stand dafür zusätzlich zur US-Probe eine aus Vollblut gewonnene Plasmaprobe zur Verfügung, die ebenfalls in die AlphaLISA für IL1B und IL1RA eingesetzt wurde (siehe III.2.4.2.). IL1RA war nur in einer Plasmaprobe mittels AlphaLISA detektierbar. Die darin gemessene IL1RA-Konzentration betrug 42,9 ng/ml. IL1B war nur in den Plasmaproben von drei Tieren mittels AlphaLISA detektierbar. Davon lag in zwei Fällen die gemessene IL1B-Konzentration unter dem LDL von 2,26 pg/ml, in einem Fall bei 73,2 pg/ml (HELFRICH, 2018). Ergab die Bestimmung von IL1B bzw. IL1RA in der Plasmaprobe eine Konzentration unter dem jeweiligen LDL, wurde für die rechnerische Korrektur die Konzentration des jeweiligen niedrigsten Standardpunktes angenommen.

### 1.4. Evaluierung des AlphaLISA für bovines IL1RA

Zur Detektion von bovinem IL1RA wurde ein AlphaLISA entwickelt und wie nachfolgend beschrieben evaluiert.

### 1.4.1. Durchführung des AlphaLISA mit definierten Standardkonzentrationen

Der entwickelte AlphaLISA wurde zunächst mit definierten Standardkonzentrationen an rekombinanten bovines IL1RA durchgeführt. Dabei zeigte sich nach Anregung der Donor-Beads ein Anstieg des emittierten Signals mit zunehmender Standardkonzentration. Ein näherungsweise linearer Verlauf der Standardkurve wurde in einem IL1RA-Konzentrationsbereich von 31,25 ng/ml bis 250 ng/ml festgestellt (vgl. Abbildung 9).



**Abbildung 9: Verlauf der Standardkurve des etablierten AlphaLISA für IL1RA mit 95 %-Konfidenzintervall.**

Beim Einsatz von rekombinantem bovines IL1RA als Standard mit Konzentrationen zwischen 0,975 ng/ml und 250 ng/ml zeigte sich ein Anstieg des gemessenen Signals mit zunehmender Standardkonzentration.

### 1.4.2. Evaluierung des AlphaLISA

Nachfolgend werden die Ergebnisse der Evaluierung des AlphaLISA für IL1RA aufgeführt.

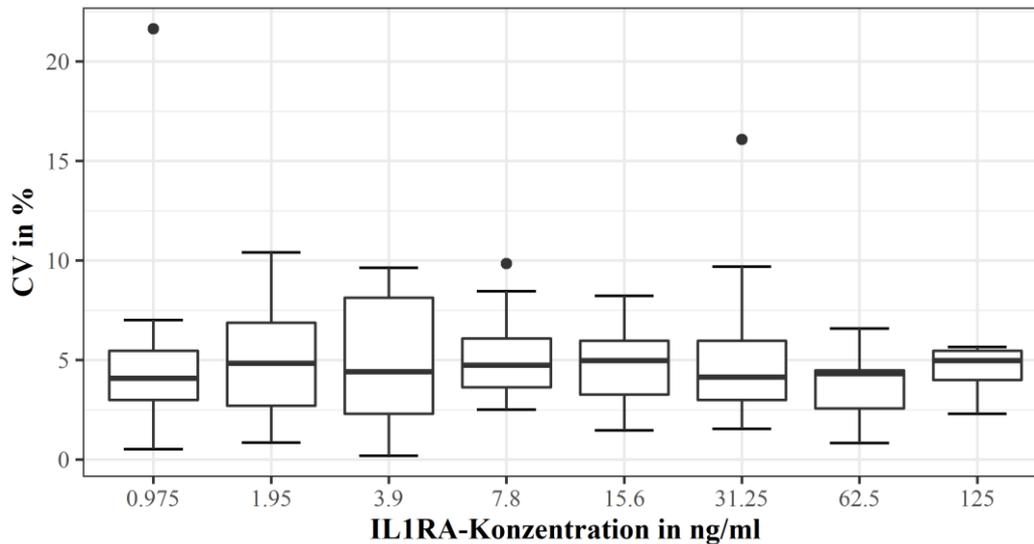
#### 1.4.2.1. Bestimmung des Lower Detection Limits (LDL)

Das LDL stellt die untere Nachweisgrenze dar, ab der eine in einer Probe vorhandene IL1RA-Konzentration vom Hintergrundrauschen abgrenzbar ist. Der entwickelte AlphaLISA wies ein LDL von 15.750 relativen Fluoreszenzeinheiten auf.

#### 1.4.2.2. Untersuchung der Intra-Assay-Variation

Für die Ermittlung der Intra-Assay-Variation wurden die Variationskoeffizienten (CV) der jeweils dreifach pipettierten Standardpunkte aus 18 durchgeführten Al-

phaLISA herangezogen. Dabei ergaben sich für 97,6 % der Messpunkte ein CV von  $< 10\%$ . Ein Anteil von 0,8 % der Messpunkte erreichte einen CV von  $10\% - 15\%$  und ein Anteil von 1,6 % der Messpunkte einen CV von  $> 15\%$ . Im Mittel betrug der CV 4,9 % (SD = 2,9 %). Die Verteilung der Ergebnisse auf die eingesetzten IL1RA-Konzentrationen sind in Abbildung 10 dargestellt.



**Abbildung 10: Darstellung der Intra-Assay-Variation des etablierten AlphaLISA für IL1RA anhand der eingesetzten Standardpunkte.**

Boxplot-Diagramm der Variationskoeffizienten (CV) der Standardpunkte aus 18 Wiederholungen des AlphaLISA. Dabei wurde je Durchgang jeder Standardpunkt dreifach pipettiert und aus den erhaltenen Signalthöhen der drei Ansätze der CV je Standardpunkt und Durchgang berechnet. Im Mittel über alle Konzentration betrug der CV 4,9 % (SD = 2,9 %).

#### 1.4.2.3. Untersuchung der Inter-Assay-Variation

Zur Beurteilung der Inter-Assay-Variation wurde der Assay drei Mal mit US-Proben von drei Tieren durchgeführt, wobei jeweils Dreifachansätze pipettiert wurden. Anschließend wurde je Tier der CV über alle drei Assays berechnet. Diese CVs lagen zwischen 4 % und 7 %.

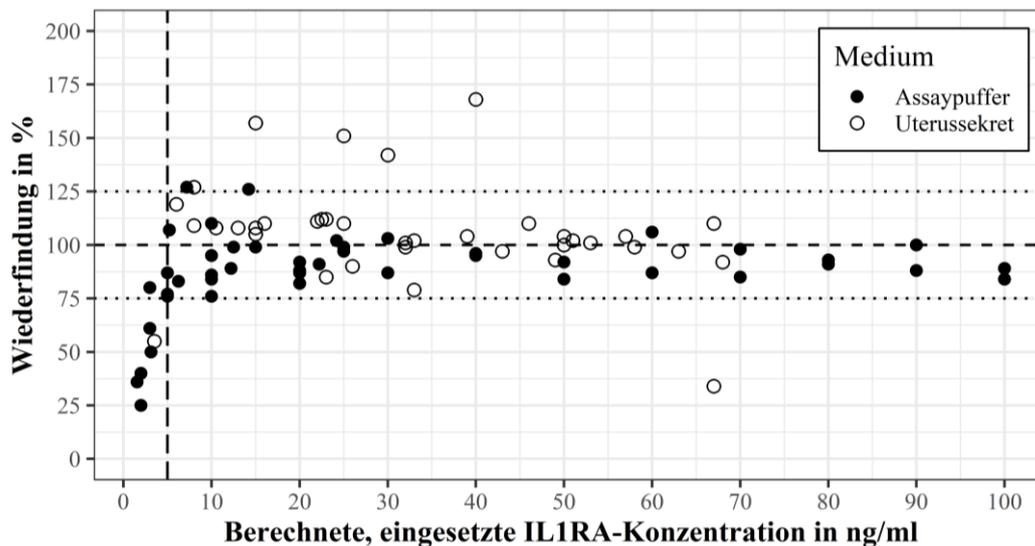
#### 1.4.2.4. Bestimmung des Hook Points

Zur Erfassung des Hook Points wurde die Standardkurve bis zu einer IL1RA-Konzentration von 2.000 ng/ml erweitert. Dabei zeigte sich ein Hook Effect ab einer IL1RA-Konzentration von 500 ng/ml.

#### 1.4.2.5. Untersuchung der Wiederfindungsrate

Zur Untersuchung der Wiederfindung von zugegebenem IL1RA in AlphaLISA HiBlock Buffer ( $n = 45$ ) sowie in US-Proben ( $n = 38$ ) wurde die vorab berechnete

IL1RA-Konzentration mit der im Assay gemessenen Konzentration verglichen. Bei IL1RA-Konzentrationen  $> 5$  ng/ml lag die Wiederfindungsrate größtenteils in einem Bereich zwischen 75 % und 125 %.



**Abbildung 11: Darstellung der Wiederfindungsrate des etablierten AlphaLISA für IL1RA.**

Die Wiederfindungsrate gibt an, wieviel einer vorab berechneten, eingesetzten Konzentration an rekombinantem bovines IL1RA in einer Probe mit Assaypuffer ( $n = 45$ ) oder Uterussekret ( $n = 38$ ) wiedergefunden wurde. Im Konzentrationsbereich  $\geq 5$  ng/ml lagen die Ergebnisse größtenteils in einem Bereich zwischen 75 % und 125 % Wiederfindung.

## 2. Uterusgesundheit der Spendertiere

Um die Gesundheit der beprobten Uteri beurteilen zu können, wurde für jeden beprobten Uterus eine bakteriologische und eine zytologische Untersuchung sowie ein LE-Test durchgeführt. Für die Beurteilung der Uterusgesundheit der ausgewählten *in vivo* beprobten US-Spendertiere wurde auf die von HELFRICH (2018) erhobenen Daten zurückgegriffen.

### 2.1. Bakteriologische Untersuchung

Das für die bakteriologische Untersuchung gewonnene Material wurde auf Agarplatten für insgesamt 48 h inkubiert. Bakteriologisch positive Proben wurden zur Speziesdifferenzierung mittels MALDI-TOF an den Lehrstuhl für Bakteriologie und Mykologie der Ludwig-Maximilians-Universität München gesendet.

#### 2.1.1. Bakteriologische Untersuchung der Spendertiere für die Explantkultur

Im Rahmen der Untersuchung der bakteriologischen Proben der Explantspender-

tiere konnte kein Keimwachstum nachgewiesen werden. Die beprobten Uteri ( $n = 26$ ) wurden somit alle als bakteriologisch negativ eingestuft.

### **2.1.2. Bakteriologische Untersuchung der Spendertiere für die Uterussekretproben**

#### Schlachtorganproben

Im Rahmen der Untersuchung der bakteriologischen Proben aus den beprobten Schlachtorganen ( $n = 37$ ) konnte in fünf Fällen Keimwachstum nachgewiesen werden. Bei einem Tier, welches in der zytologischen Untersuchung und im Leukozyten-Esterase- (LE-)Test positiv beurteilt wurde, konnte *E. coli* nachgewiesen werden. Bei einem weiteren Tier, welches ausschließlich im LE-Test einen auffälligen Befund gezeigt hatte, konnte *Trueperella pyogenes* detektiert werden. Die drei weiteren Tiere mit bakteriologisch positivem Befund waren sowohl in der zytologischen Untersuchung als auch beim LE-Test unauffällig. Bei diesen Tieren wurde je Tier ein Erreger nachgewiesen, und zwar entweder *E. coli*, *Enterococcus faecium* oder *Actinobacillus seminis*.

#### In vivo gewonnene Proben

Bei den Proben der *in vivo* beprobten US-Spendertieren ( $n = 26$ ) war eine Probe als bakteriologisch positiv zu werten, wobei die Differenzierung mittels MALDI-TOF *Streptococcus uberis* und *E. coli* ergab. Das betroffene Tier hatte bei der klinischen gynäkologischen Untersuchung unauffällige Befunde gezeigt, erhielt jedoch in der späteren zytologischen Untersuchung die Diagnose SE (HELFRICH, 2018).

## **2.2. Zytologische Untersuchung**

Jeder beprobte Uterus wurde zytologisch mittels Cytobrush untersucht. Die Diagnose der subklinischen Endometritis wurde ab einem PMN Anteil von 5 % gestellt. Alle angefertigten Objektträger waren auswertbar.

### **2.2.1. Zytologische Untersuchung der Spendertiere für die Explantkultur**

Bei den Proben der 26 Explantspendertiere reichte die Spanne der ermittelten prozentualen PMN-Anteile von 0 % bis 3,2 % und betrug im Mittel 0,4 % (SD = 0,6 %). Somit wurde bei keinem Explantspendertier die Diagnose SE gestellt.

### **2.2.2. Zytologische Untersuchung der Spendertiere für die Uterussekretproben**

#### Schlachtorganproben

Bei den Proben der 37 am Schlachtorgan beprobten US-Spendertiere reichte die Spanne der ermittelten prozentualen PMN-Anteile von 0 % bis 43,9 % und betrug im Median 0,1 %.

#### In vivo gewonnene Proben

Bei den Proben der 26 *in vivo* beprobten US-Spendertiere reichte die Spanne der von HELFRICH (2018) ermittelten prozentualen PMN-Anteile von 0 % bis 26,8 % und betrug im Median 0,7 %. Bei sechs klinisch unauffälligen Tieren wurde ein PMN-Anteil > 5 % ermittelt, die somit die Diagnose SE erhielten.

### **2.3. Leukozyten-Esterase-Test**

Für den LE-Test wurde nach Durchführung der Cytobrush-Probe für die zytologische Untersuchung das am Bürstchen verbliebene Zellmaterial mit H<sub>2</sub>O ausgespült. Die erhaltene Flüssigkeit wurde auf einen Teststreifen aufgetragen, der die Einteilung des Ergebnisses in die Kategorien negativ, Spuren, klein, moderat und groß ermöglichte.

Für alle 26 Explantspendertiere ergab der LE-Test ein negatives Ergebnis.

Bei den 37 am Schlachtorgan beprobten US-Spendertieren ergab der LE-Test bei vier Tieren ein positives Ergebnis. Bei zwei Tieren, bei denen bakteriologische und zytologische Untersuchung negative Befunde ergeben hatten, detektierte der LE-Test Spuren von LE. Bei einem Tier mit sowohl in der bakteriologischen als auch in der zytologischen Untersuchung positivem Ergebnis ergab der LE-Test das Ergebnis klein bis moderat. Bei einem Tier mit nur bakteriologisch positivem Befund ergab der LE-Test das Ergebnis klein.

## **3. Regulation der Genexpression von IL1B und IL1RA in der endometrialen Explantkultur**

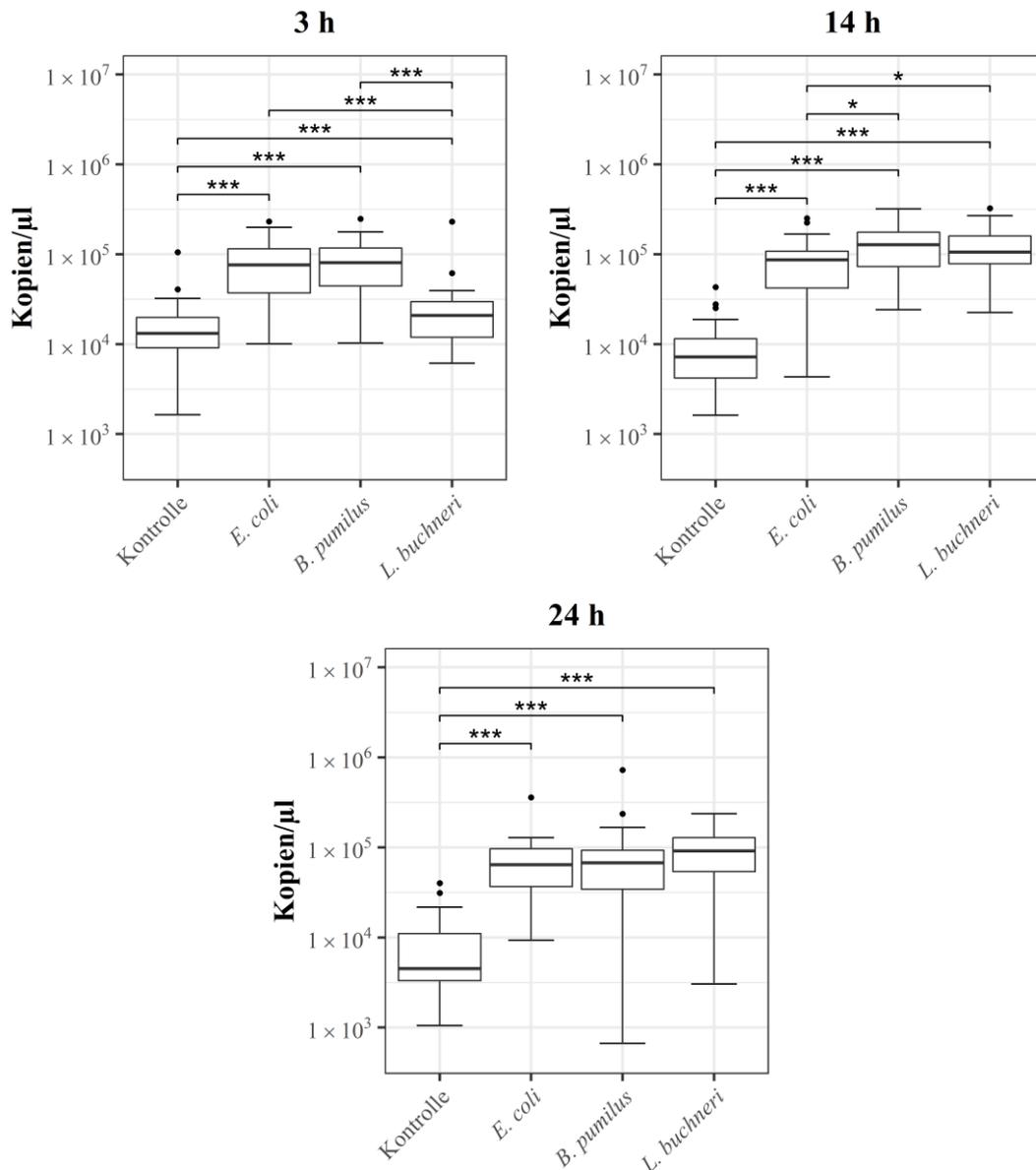
Für die Untersuchung der Regulation der Genexpression von IL1B und IL1RA im bovinen Endometrium wurden Explants aus 26 Spendertieren gewonnen. Nach Koinkubation mit Bakterien oder Zytokinen über 3, 14 und 24 h wurde mittels Reverse Transkriptase-qPCR die Genexpression von IL1B und IL1RA untersucht

sowie das IL1RA/IL1B-Verhältnis auf Genexpressionsebene analysiert.

### **3.1. Einfluss der Koinkubation mit ausgewählten Bakterien auf die Genexpression von IL1B und IL1RA sowie auf das IL1B/IL1RA-Verhältnis**

Um den Einfluss der ausgewählten Bakterien auf die Genexpression von IL1B und IL1RA beurteilen zu können, wurde zunächst die Kontrolle für *E. coli* und *L. buchneri* mit der Kontrolle für *B. pumilus* verglichen. Die Kontrolle für *B. pumilus* zeichnete sich durch einen Glycerinzusatz aus, da die Koinkubation mit *B. pumilus* ebenfalls unter Anwesenheit von Glycerin durchgeführt wurde (siehe III.1.1.2.2.). Dabei war für keine der drei Inkubationszeiten ein statistisch signifikanter Unterschied in der Genexpression von IL1B oder IL1RA detektierbar ( $p > 0,1$ ). Daher wird nachfolgend der Einfluss aller ausgewählten bakteriellen Komponenten vergleichend beschrieben, ohne den Glycerin-Anteil im Fall der Koinkubation mit *B. pumilus* zu berücksichtigen. Ausgewählte Ergebnisse werden in den folgenden Abschnitten erläutert. Alle ermittelten p-Werte des Vergleichs der bakteriellen Koinkubationsansätze sind in Tabelle 4 aufgelistet (siehe XI.3.1.).

Für IL1B zeigte sich bei der Koinkubation mit bakteriellen Komponenten bei allen drei ausgewählten Bakterienspezies und allen untersuchten Inkubationsdauern (3, 14 und 24 h) eine im Vergleich zur Kontrolle höchstsignifikant gesteigerte Genexpression ( $p < 0,001$ ). Dabei konnte bei der Koinkubation sowohl mit *E. coli* als auch mit *B. pumilus* über 3 h eine noch stärkere Stimulation der Genexpression von IL1B detektiert werden als unter Zugabe von *L. buchneri* ( $p < 0,001$ ). Bei der Koinkubation über 14 h übten sowohl *B. pumilus* ( $p = 0,030$ ) als auch *L. buchneri* ( $p = 0,043$ ) gegenüber *E. coli* einen signifikant stärker stimulierenden Einfluss aus. Bei der Koinkubation über 24 h bestanden keine signifikanten Unterschiede im Einfluss auf die Genexpression von IL1B zwischen den eingesetzten Bakterien ( $p > 0,1$ ). Die Ergebnisse der vergleichenden Betrachtung der Genexpression von IL1B werden in Abbildung 12 als Boxplot-Diagramme dargestellt.

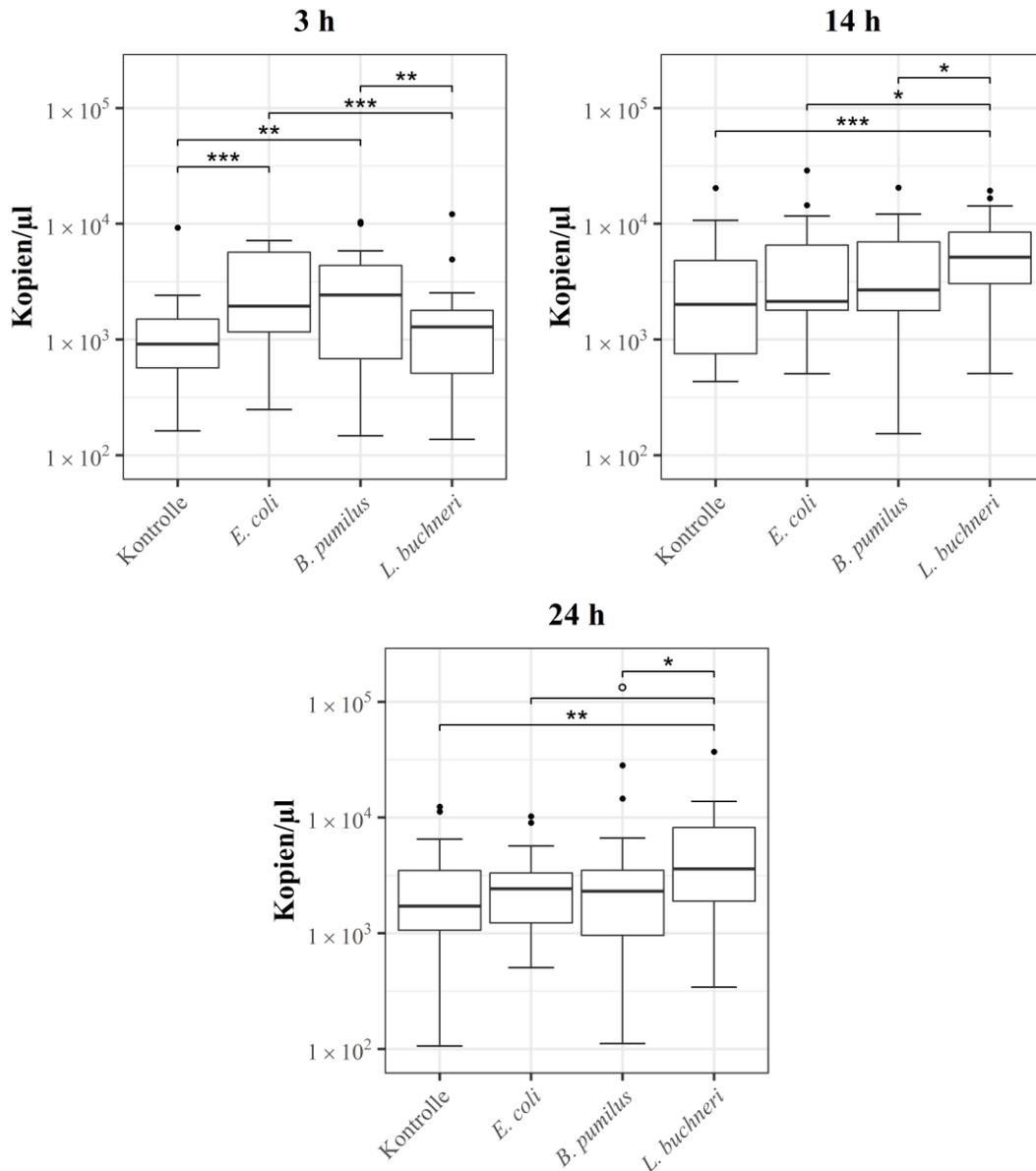


**Abbildung 12: Genexpression von IL1B in endometrialen Explants nach Koinkubation mit hitzeinaktivierten Bakterien.**

Dargestellt ist die Expression der mRNA in Kopien je 200 ng cDNA für IL1B in endometrialen Explants aus jeweils 26 Schlachtorganen nach Koinkubation mit bakteriellen Komponenten über 3, 14 oder 24 h. Zusätzlich wurde eine Medium-Kontrolle mitgeführt. Kennzeichnung statistisch signifikanter Unterschiede: \* = signifikant ( $p < 0,05$ ), \*\* = hochsignifikant ( $p < 0,01$ ), \*\*\* = höchstsignifikant ( $p < 0,001$ ).

Für IL1RA zeigte sich bei der Koinkubation mit *E. coli* bzw. *B. pumilus* über 3 h eine im Vergleich zur Kontrolle höchst- bzw. hochsignifikant gesteigerte Genexpression ( $p < 0,001$  bzw.  $p = 0,001$ ). Nach 14 und 24 h Koinkubation mit *E. coli* bzw. *B. pumilus* ließen sich jedoch im Vergleich zur Kontrolle keine signifikanten Unterschiede mehr darstellen ( $p > 0,1$ ). Dagegen führte die Koinkubation mit *L. buchneri* nur über 14 und 24 h zu einer verglichen mit der Kontrolle höchst- bzw. hochsignifikant gesteigerten Genexpression von IL1RA ( $p < 0,001$  bzw.

$p = 0,0098$ ). Die Ergebnisse der vergleichenden Betrachtung der Genexpression von IL1RA werden in Abbildung 13 als Boxplot-Diagramme dargestellt.

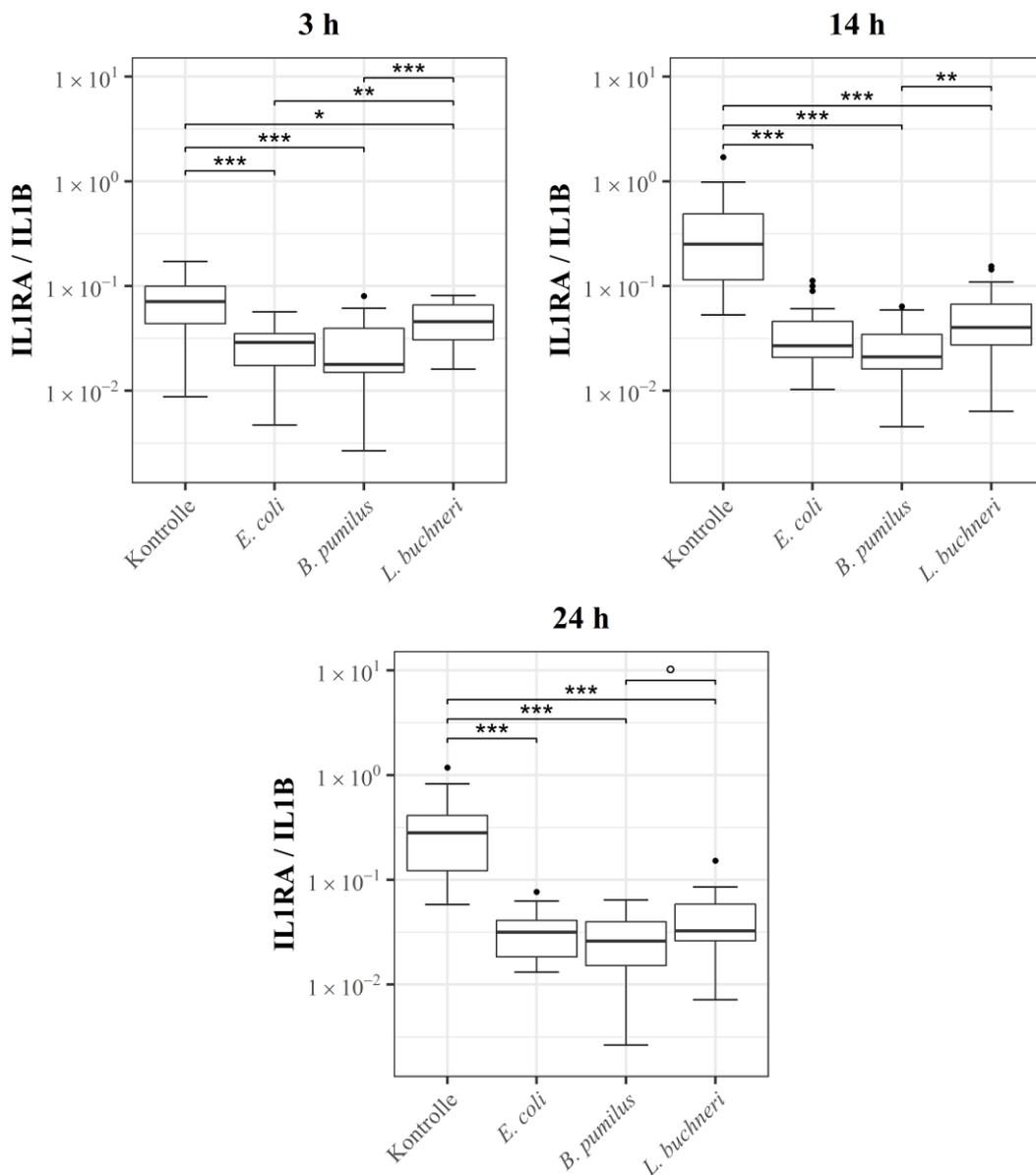


**Abbildung 13: Genexpression von IL1RA in endometrialen Explants nach Koinkubation mit hitzeinaktivierten Bakterien.**

Dargestellt ist die Expression der mRNA in Kopien je 200 ng cDNA für IL1RA in endometrialen Explants aus jeweils 26 Schlachtorganen nach Koinkubation mit bakteriellen Komponenten über 3, 14 oder 24 h. Zusätzlich wurde eine Medium-Kontrolle mitgeführt. Kennzeichnung statistisch signifikanter Unterschiede: ° = Tendenz ( $p < 0,1$ ), \* = signifikant ( $p < 0,05$ ), \*\* = hochsignifikant ( $p < 0,01$ ), \*\*\* = höchstsignifikant ( $p < 0,001$ ).

Eine Koinkubation mit *E. coli* bzw. *B. pumilus* bewirkte bei allen untersuchten Inkubationsdauern ein im Vergleich zur Kontrolle höchstsignifikant niedrigeres IL1RA/IL1B-Verhältnis auf Genexpressionsebene ( $p < 0,001$ ). Die Koinkubation mit *L. buchneri* über 3 h führte zu einem im Vergleich zur Kontrolle signifikant ( $p = 0,015$ ) und über 14 und 24 h zu einem höchstsignifikant ( $p < 0,001$ ) niedrige-

rem IL1RA/IL1B-Verhältnis auf Genexpressionsebene. Die Veränderung des IL1RA/IL1B-Verhältnisses nach Koinkubation mit *L. buchneri* über 14 bzw. 24 h war jedoch hochsignifikant bzw. tendenziell schwächer als die Veränderung des IL1RA/IL1B-Verhältnisses nach Koinkubation mit *B. pumilus* ( $p = 0,002$  bzw.  $p = 0,073$ ). Die Ergebnisse der vergleichenden Betrachtung des IL1RA/IL1B-Verhältnisses auf Genexpressionsebene werden in Abbildung 14 dargestellt.



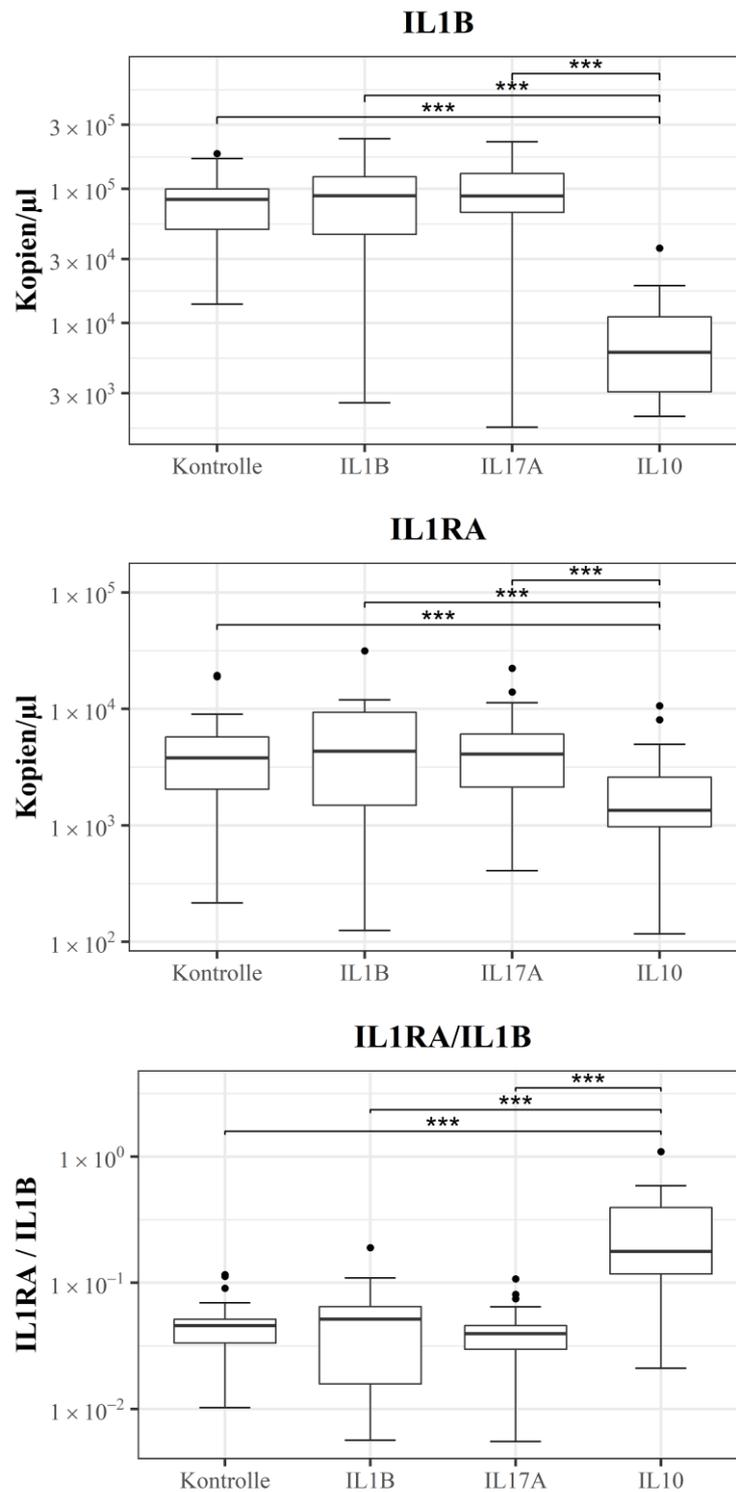
**Abbildung 14: IL1RA/IL1B-Verhältnis auf Genexpressionsebene in endometrialen Explants nach Koinkubation mit hitzeinaktivierten Bakterien.**

Dargestellt ist das IL1RA/IL1B-Verhältnis auf Genexpressionsebene in endometrialen Explants aus jeweils 26 Schlachtorganen nach Koinkubation mit bakteriellen Komponenten über 3, 14 oder 24 h. Zusätzlich wurde eine Medium-Kontrolle mitgeführt. Kennzeichnung statistisch signifikanter Unterschiede: ° = Tendenz ( $p < 0,1$ ), \* = signifikant ( $p < 0,05$ ), \*\* = hochsignifikant ( $p < 0,01$ ), \*\*\* = höchstsignifikant ( $p < 0,001$ ).

### **3.2. Einfluss der Koinkubation mit rekombinanten bovinen Zytokinen**

Des Weiteren wurde die Genexpression von IL1B und IL1RA sowie das IL1RA/IL1B-Verhältnis auf Genexpressionsebene nach Koinkubation mit den rekombinanten bovinen Zytokinen IL1B, IL17A und IL10 über 24 h untersucht. Zum Vergleich wurde eine Kontrolle mit Medium herangezogen, der wie den ausgewählten Zytokinen BSA zugesetzt worden war (siehe III.1.1.3.).

Nach Koinkubation mit IL1B bzw. IL17A konnten im Vergleich zur Kontrolle keine signifikanten Unterschiede in der Genexpression von IL1B und IL1RA sowie im IL1RA/IL1B-Verhältnis auf Genexpressionsebene dargestellt werden ( $p > 0,1$ ). Nach Koinkubation mit IL10 zeigte sich jedoch ein im Vergleich zur Kontrolle höchstsignifikant erhöhtes IL1RA/IL1B-Verhältnis, welches durch eine höchstsignifikant verringerte Genexpression von IL1B bedingt wurde. Jedoch wurde unter dem Einfluss von IL10 auch eine höchstsignifikant verringerte Genexpression von IL1RA festgestellt (jeweils  $p < 0,001$ ). Die Ergebnisse der vergleichenden Betrachtung der Genexpression von IL1B und IL1RA sowie des IL1RA/IL1B-Verhältnisses auf Genexpressionsebene werden in Abbildung 15 als Boxplot-Diagramme dargestellt. Alle p-Werte dieses Vergleichs sind in Tabelle 5 (siehe XI.3.1.) aufgelistet.



**Abbildung 15: Genexpression von IL1B und IL1RA sowie IL1RA/IL1B-Verhältnis auf Genexpressionsebene in endometrialen Explants nach Koinkubation mit rekombinanten bovinen Zytokinen.**

Dargestellt ist die Expression der mRNA in Kopien je 200 ng cDNA für IL1B und IL1RA sowie das IL1RA/IL1B-Verhältnis auf Genexpressionsebene in endometrialen Explants aus 26 Schlachtorganen nach Koinkubation mit den Zytokinen IL1B, IL17A und IL10 über 24 h. Zusätzlich wurde eine Medium-Kontrolle mitgeführt. Kennzeichnung statistisch signifikanter Unterschiede:  $\circ$  = Tendenz ( $p < 0,1$ ), \* = signifikant ( $p < 0,05$ ), \*\* = hochsignifikant ( $p < 0,01$ ), \*\*\* = höchstsignifikant ( $p < 0,001$ ).

#### **4. Proteinkonzentration von IL1B und IL1RA sowie IL1RA/IL1B-Verhältnis in bovinen Uterussekretproben**

Die Proteinkonzentration von IL1B und IL1RA wurde mittels AlphaLISA in US-Proben untersucht, die aus Schlachtorganen ( $n = 37$ ) oder *in vivo* ( $n = 26$ ) gewonnen wurden. Weiter wurde für jede Probe das Verhältnis der Konzentration von IL1RA zur Konzentration von IL1B auf Proteinebene berechnet. Ausgewählte Ergebnisse werden in den folgenden Abschnitten erläutert. Alle ermittelten 1. Quartile, Mediane, und 3. Quartile sind in Tabelle 6, die p-Werte der Vergleiche in Tabelle 7 (siehe XI.3.2.) aufgelistet.

##### **4.1. Proteinkonzentration von IL1B und IL1RA sowie IL1RA/IL1B-Verhältnis in Uterussekret in Abhängigkeit von der Gebärmuttergesundheit**

Für die Untersuchung der Proteinkonzentration von IL1B und IL1RA in Abhängigkeit von der Gebärmuttergesundheit wurden die US-Spendertiere in die Gruppen  $SE_{neg}$  und  $SE_{pos}$  eingeteilt. Entscheidend war dabei das Ergebnis der zytologischen Untersuchung, wobei die Diagnose der SE ab einem PMN-Anteil von 5 % gestellt wurde. Anschließend wurden die bestimmten IL1B- und IL1RA-Konzentrationen sowie deren Verhältnis zueinander in den US-Proben in Abhängigkeit von der Gebärmuttergesundheit der US-Spendertiere verglichen.

##### Schlachtorganproben

Im US aus Schlachtorganen von Tieren der Gruppe  $SE_{pos}$  ( $n = 3$ ) konnten eine signifikant höhere IL1B- und eine tendenziell höhere IL1RA-Konzentration im Vergleich zu US aus Schlachtorganen von Tieren der Gruppe  $SE_{neg}$  bestimmt werden ( $p = 0,027$  bzw.  $p = 0,071$ ). Dabei standen in der Gruppe  $SE_{neg}$  für IL1B Ergebnisse von 34 Tieren zur Verfügung, für IL1RA und entsprechend das IL1RA/IL1B-Verhältnis aufgrund von wiederholt hohem Variationskoeffizienten zweier Proben das Ergebnis von 32 Tieren. Das IL1RA/IL1B-Verhältnis war im US aus Schlachtorganen von Tieren der Gruppe  $SE_{pos}$  tendenziell niedriger als im US aus Schlachtorganen von Tieren der Gruppe  $SE_{neg}$  ( $p = 0,082$ ).

##### In vivo gewonnene Proben

In *in vivo* gewonnenem US von Tieren der Gruppe  $SE_{pos}$  ( $n = 5$ ) konnte eine höchstsignifikant höhere IL1B-Konzentration im Vergleich zu US von Tieren der

Gruppe SE<sub>neg</sub> ( $n = 21$ ) bestimmt werden ( $p < 0,001$ ). Bei der Konzentration von IL1RA gab es zwischen den beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede ( $p > 0,1$ ). Das IL1RA/IL1B-Verhältnis war im US von Tieren der Gruppe SE<sub>pos</sub> hochsignifikant niedriger als im US von Tieren der Gruppe SE<sub>neg</sub> ( $p = 0,002$ ).

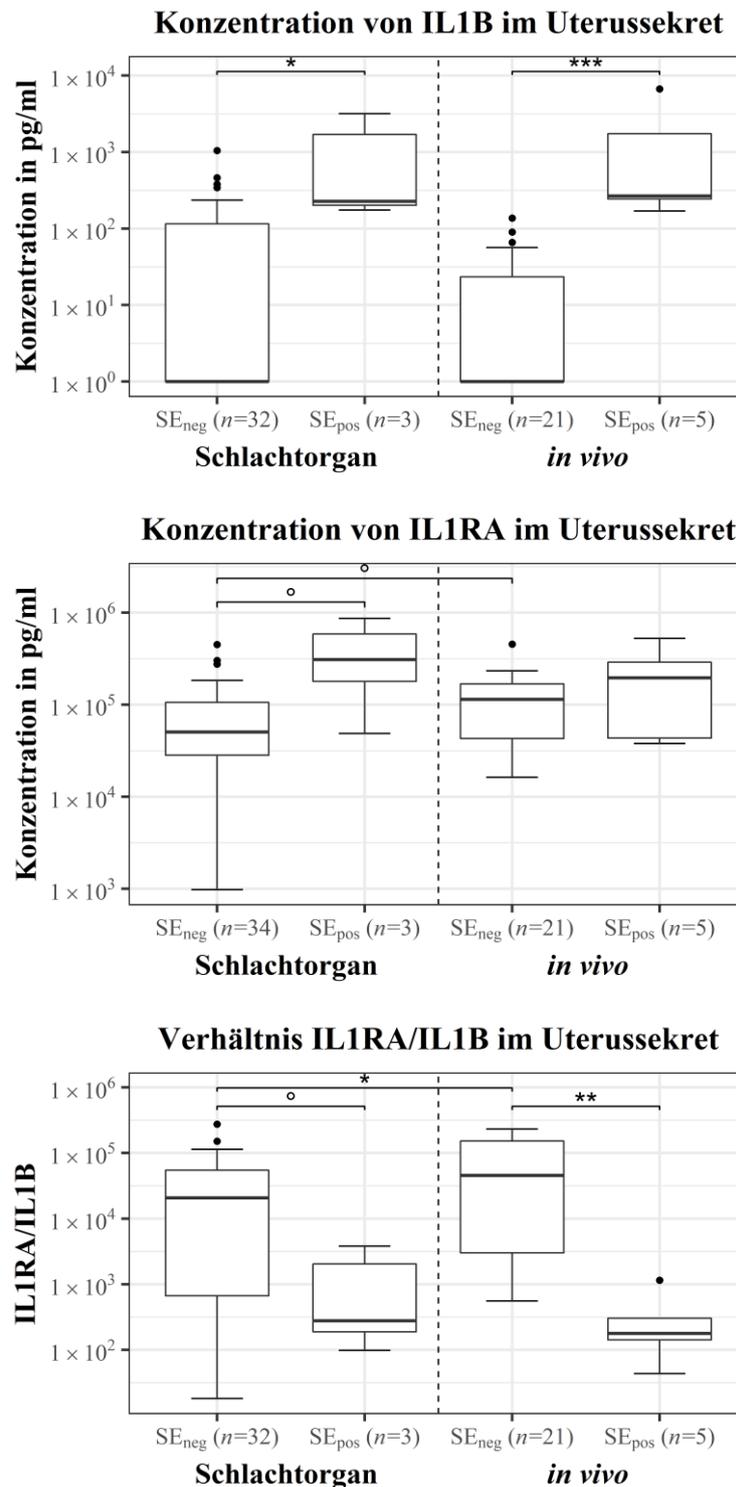
Die Ergebnisse des Vergleichs der IL1B- und IL1RA-Konzentration sowie des IL1B/IL1RA-Verhältnisses in Abhängigkeit von der Gebärmuttergesundheit der Spendertiere sind in Abbildung 16 graphisch dargestellt.

#### **4.2. Proteinkonzentration von IL1B und IL1RA sowie IL1RA/IL1B-Verhältnis in Uterussektret in Abhängigkeit von der Herkunft der Uterussektretproben**

Wie im vorherigen Abschnitt erläutert, wurden die US-Proben nach der Art ihrer Gewinnung eingeteilt (Schlachtorgan oder *in vivo*) und zunächst getrennt verglichen. Anschließend wurden getrennt nach den Gruppen SE<sub>neg</sub> und SE<sub>pos</sub> die Konzentrationen von IL1B und IL1RA sowie deren Konzentrationsverhältnis im US für beide Arten der Gewinnung miteinander verglichen.

Bei Tieren der Gruppe SE<sub>neg</sub> konnte kein signifikanter Unterschied bezüglich der IL1B-Konzentration im US aus Schlachtorganen und US aus Gewinnung *in vivo* festgestellt werden ( $p > 0,1$ ). Dagegen war die IL1RA-Konzentration tendenziell sowie das IL1RA/IL1B-Verhältnis signifikant niedriger im US aus Schlachtorganen als im US aus Gewinnung *in vivo* ( $p = 0,070$  bzw.  $p = 0,019$ ).

Bei Tieren der Gruppe SE<sub>pos</sub> waren keine signifikanten Unterschiede zwischen US aus Schlachtorganen und US aus Gewinnung *in vivo* feststellbar ( $p > 0,1$ , siehe Abbildung 16).



**Abbildung 16: Proteinkonzentration von IL1B und IL1RA sowie das IL1RA/IL1B-Verhältnis in bovinen Uterussekreten.**

Dargestellt ist die Konzentration von IL1B und IL1RA in pg/ml sowie das IL1RA/IL1B-Verhältnis in Uterussekreten. Es wurden nach Gewinnungsart getrennt (Schlachtorgan/*in vivo*) paarweise Vergleiche zwischen Tieren ohne (SE<sub>neg</sub>) und mit (SE<sub>pos</sub>) subklinischer Endometritis (PMN-Anteil in Zytologie  $\geq 5\%$ ) durchgeführt. Weiter wurden getrennt nach Uterusgesundheit paarweise Vergleiche zwischen den Gewinnungsarten durchgeführt. *n*: Anzahl der in die statistische Auswertung einbezogener Proben. Kennzeichnung statistisch signifikanter Unterschiede: ° = Tendenz ( $p < 0,1$ ), \* = signifikant ( $p < 0,05$ ), \*\* = hochsignifikant ( $p < 0,01$ ), \*\*\* = höchstsignifikant ( $p < 0,001$ ).

## V. DISKUSSION

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die Regulation der Genexpression von IL1B und IL1RA im bovinen Endometrium unter dem Einfluss entzündungsrelevanter Stimulatoren untersucht werden. Hierfür wurde eine Explantkultur angewendet. Ein weiteres Ziel war es, die Proteinkonzentration von IL1B und IL1RA im bovinen Uterussekret (US) in Abhängigkeit von der Gebärmuttergesundheit zu bestimmen. Dafür wurden US-Proben untersucht, die zum einen am Schlachtorgan, zum anderen am lebenden Tier gewonnen wurden. Sowohl auf Genexpressionsebene als auch auf Produktebene wurde zudem das Verhältnis des antiinflammatorischen IL1RA zum proinflammatorischen IL1B betrachtet. Nachfolgend werden die zentralen Ergebnisse diskutiert.

### 1. Die Explantkultur ist zur Darstellung des Einflusses entzündungsrelevanter Komponenten auf das IL1-System geeignet

Die Erforschung von physiologischen und pathologischen Mechanismen entzündlicher Vorgänge im Endometrium des Rindes ist grundsätzlich mittels Experimenten am lebenden Tier (*in vivo*) sowie mit *ex vivo/in vitro* durchgeführten Methoden möglich. Letztere sind von großer Bedeutung im Sinne des 3R-Prinzips nach RUSSELL and BURCH (1959), bei welchem Tierversuche vermieden (Replacement), die Anzahl der in Tierversuchen eingesetzten Tiere reduziert (Reduction) und die Belastung der eingesetzten Tiere auf ein unerlässliches Maß begrenzt (Refinement) werden sollen. Eine häufig verwendete Methode in der Erforschung zellulärer Funktionen ist die zweidimensionale Zellkultur (DUVAL et al., 2017). Für bestimmte Fragestellungen ist allerdings die Verwendung eines dreidimensionalen Zellverbandes mit unterschiedlichen Zelltypen sinnvoll, die den Gegebenheiten *in vivo* näher kommt (CUKIERMAN et al., 2001; VOGEL & SHEETZ, 2006; RAVI et al., 2015). Die Verfügbarkeit von dreidimensionalen Zellkulturen ist gegenwärtig jedoch noch eingeschränkt und ihre Etablierung mit besonderen Herausforderungen verbunden, beispielsweise der Entwicklung von Schnittstellen zwischen verschiedenen Zelltypen (HUH et al., 2011; DUVAL et al., 2017). Dagegen bieten Explantkulturen eine praktikable Möglichkeit, entzündungsassoziierte Vorgänge *ex vivo* im Gewebeverbund zu simulieren und zu untersuchen. Der

erfolgreiche Einsatz von Explantkulturen zur Erforschung von regulatorischen Vorgängen im bovinen Endometrium wurde bereits mehrfach beschrieben (BARROS et al., 1991; HERATH et al., 2006; BORGES et al., 2012; GENIS et al., 2017; MATHEW et al., 2018; SCHABMEYER et al., 2021).

Auch für die Untersuchung der im Rahmen dieser Arbeit definierten Fragestellungen (siehe I.) erwies sich die Explantkultur als geeignete Methode. Unter den verwendeten Kulturbedingungen ließen sich damit regulatorische Effekte von *E. coli*, *B. pumilus*, *L. buchneri* und IL10 auf die Genexpression von IL1B und IL1RA *ex vivo* darstellen und vergleichen. Dabei war die Stoffwechselaktivität der Explants über die gesamte Inkubationsdauer sichergestellt. Folgenden Beobachtungen sollten bei zukünftigen Versuchen besondere Beachtung beigemessen werden:

Große tierindividuelle Varianz der RNA-Konzentrationen: In den Explantkulturversuchen wurden große tierindividuelle Varianzen in der ermittelten RNA-Konzentrationen festgestellt (vgl. Abbildung 12 und Abbildung 13). Auch in der Literatur sind große interindividuelle Varianzen der Genexpression in inkubierten Bioptaten beschrieben (SCHÄFER et al., 2011). Diesem Aspekt sollte bei der Anwendung von Explantkulturen durch eine entsprechend große Anzahl beprobter Tiere Rechnung getragen werden.

Regeneration und Adaptation der Explantate im Verlauf der Inkubation: In der vorliegenden Arbeit konnte dargestellt werden, dass die Genexpression des proinflammatorischen IL1B in mit Medium inkubierten endometrialen Explants zwischen 3 und 14 h Inkubationsdauer abnimmt. Für die gleiche Zeitspanne konnte ein Anstieg der Genexpression des antiinflammatorischen IL1RA detektiert werden. Zudem nahm die Stoffwechselaktivität der Explants zwischen 3 und 24 h Inkubationsdauer zu. Zusammengenommen belegen diese Beobachtungen eine Regenerationsfähigkeit der Explants nach Gewinnung und Präparation. Somit ist die Einplanung einer Regenerations- und Adaptationsphase an die Kulturbedingungen im Versuchsaufbau angezeigt. Im hier beschriebenen Explantkulturversuch wurde nach einer einstündigen Regenerations- und Adaptationsphase ein Wechsel des Mediums durchgeführt und die Koinkubation mit verschiedenen Ansätzen begonnen (siehe III.1.3.). Auch in der Literatur sind einstündige Präinkubationen endometrialer Explants mit anschließendem Wechsel des Mediums beschrieben (SCHÄFER et al., 2011; MATHEW et al., 2018). Für die weitere Opti-

mierung von Explantkulturversuchen sollte jedoch eine längere Regenerationszeit in Erwägung gezogen werden. Dementsprechend wird auch die Inkubationsdauer der Explants von 14 oder 24 h für den gegebenen Versuchsaufbau im Vergleich zu 3 h als besser geeignet angesehen.

Niedriges Verhältnis von IL1RA zu IL1B auf Transkriptionsebene: Um die Wirkung von IL1B zu hemmen, muss IL1RA in einer zehnfach bis tausendfach höheren Konzentration als IL1B vorliegen (DINARELLO, 1996). In der Explantkultur betrug das entsprechende Verhältnis auf Genexpressionsebene jedoch überwiegend  $< 1$ . In diesem Fall ist davon auszugehen, dass zu wenig IL1RA für eine entzündungshemmende Wirkung zur Verfügung steht. In den im Rahmen dieser Arbeit auf Produktebene untersuchten US-Proben entsprach die gemessene IL1RA-Konzentration in Proben von Tieren ohne und mit SE dagegen einem Vielfachen der IL1B-Konzentration (je nach Gruppe im Median Faktor 178 bis 45.522, siehe IV.4.1.). Verschiedene potenzielle Gründe für dieses niedrige IL1RA/IL1B-Verhältnis auf Transkriptionsebene in den Explants sind denkbar: Möglicherweise verschiebt die Verletzung des Gewebes bei der Explantgewinnung das IL1RA/IL1B-Verhältnis in die proinflammatorische Richtung. Auch die Adaptation an die Kulturbedingungen kann für das kultivierte Gewebe zunächst Stress und Entzündungsinduktion bedeuten. So konnten SCHÄFER et al. (2011) in für 6 h kultivierten Biopaten aus humanem Endometrium eine höhere Expression des Entzündungsmediators Cyclooxygenase-2 feststellen als in nicht kultivierten Biopaten. Neben der Erwägung dieser methodenassoziierten Gründe ist jedoch zu beachten, dass zwischen Genexpressionsebene in endometrialen Zellen und Produktebene im US verschiedene, nachfolgend beschriebene Regulationsmechanismen greifen können. Dies kann die Diskrepanz zwischen dem auf Genexpressionsebene im Explant und dem auf Produktebene im US festgestellten IL1RA/IL1B-Verhältnis ebenfalls erklären. So ist die Sekretion von IL1RA und IL1B aus der Zelle unterschiedlich reguliert. Während IL1RA wie die meisten Zytokine eine Signalsequenz für die spontane Sekretion besitzt, ist dies für IL1B nicht der Fall. Für die Sekretion von IL1B werden deshalb verschiedene andere Mechanismen diskutiert (PICCIOLI & RUBARTELLI, 2013; KWAK et al., 2016). Einen weiteren Regulationsmechanismus stellt der Rezeptor IL1R2 dar. IL1R2 neutralisiert sowohl IL1B als auch IL1RA, bindet IL1B aber hundertfach effizienter als IL1RA (COLOTTA et al., 1993; DINARELLO, 2009;

GARLANDA et al., 2013). Es bleibt jedoch unklar, wie sich eine mögliche Bindung von IL1B oder IL1RA an membrangebundenem oder löslichem IL1R2 in den US-Proben auf die Detektion mittels AlphaLISA auswirkt. Die zusätzliche Untersuchung von Explant-Überständen auf Proteinebene erscheint daher als sinnvolle Ergänzung für zukünftige Versuche. Auch die vergleichende Untersuchung des IL1RA/IL1B-Verhältnisses auf Genexpressionsebene in inkubierten und nicht inkubierten, unmittelbar untersuchten Explants kann weitere Erkenntnisse ermöglichen. Ein möglicher Einfluss der Schlachtung kann durch die vergleichende Analyse *in vivo* und am Schlachtorgan gewonnener Biopate untersucht werden.

## **2. Endometriale Genexpression von IL1B und IL1RA nach bakterieller Exposition**

*E. coli* gilt als eines der Hauptpathogene im postpartalen Uterus des Rindes (BONNETT et al., 1991; DOHMEN et al., 2000; WILLIAMS et al., 2005). Die stimulierende Wirkung von *E. coli* auf IL1B und andere proinflammatorischen Faktoren im bovinen Endometrium ist vielfach beschrieben (BORGES et al., 2012; SAUT et al., 2014; LIU et al., 2016; GENIS et al., 2017). Weniger ist über den Effekt von *E. coli* auf den antiinflammatorischen Gegenpart IL1RA bekannt. Die Auswirkung des fakultativ pathogenen Bakteriums *B. pumilus* sowie des potenziell protektiven Bakteriums *L. buchneri* auf das bovine Endometrium allgemein sowie auf das entzündungsrelevante IL1-System im Speziellen wurde bisher ebenfalls in geringem Ausmaß untersucht. Allerdings konnte bereits eine verbesserte Fruchtbarkeit sowie eine verringerte IL1B-Expression im Endometrium von Tieren mit SE nach intrauteriner Anwendung von *L. buchneri* festgestellt werden (PETER et al., 2018).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte daher der Einfluss von *E. coli*, *B. pumilus* und *L. buchneri* auf IL1B und IL1RA im bovinen Endometrium untersucht und verglichen werden. Bei *E. coli* handelte es sich um ein Isolat aus einem klinisch erkrankten Tier, während es sich bei *B. pumilus* und *L. buchneri* um Isolate aus klinisch gesunden Tieren handelte. Nach 3, 14 oder 24 h Koinkubation mit jeweils einem der genannten Bakterien wurde die Genexpression von IL1B und IL1RA in endometrialen Explants quantitativ untersucht. Dabei wurden große Übereinstimmungen zwischen den verwendeten Bakterien hinsichtlich der Gen-

expression von IL1B und IL1RA festgestellt. Zwar gab es einige statistisch gesicherte Unterschiede bei der Intensität oder dem zeitlichen Verlauf, jedoch bewirkten sowohl *E. coli* als auch *B. pumilus* und *L. buchneri* eine inkubationszeitunabhängige Verschiebung des IL1RA/IL1B-Verhältnisses in die proinflammatorische Richtung. Nach 14 h Koinkubation bewirkten *B. pumilus* und *L. buchneri* sogar eine stärkere Steigerung der Genexpression von IL1B als *E. coli* bei identischer Bakterienkonzentration und unter gleichen Versuchsbedingungen.

Möglicherweise werden die entzündungsvermittelnden ‚pattern recognition receptors‘ (PRR) im Endometrium auch durch fakultativ pathogene und potenziell protektive Bakterien aktiviert. Hierzu ist in der Literatur gegenwärtig wenig beschrieben, jedoch detektierten IIDA et al. (2019) eine gesteigerte Genexpression von PRR in porzinen intestinalen Epithelzellen nach Koinkubation mit potenziell protektiven *Bifidobacterii*-Stämmen. Die Aktivierung von PRR führt zu einer gesteigerten Genexpression und Produktion proinflammatorischer Zytokine (ZHANG et al., 2019). Für *B. pumilus* konnten GÄRTNER et al. (2016) *in vitro* ebenfalls eine stimulierende Wirkung auf das IL1-System feststellen, in diesem Fall auf das proinflammatorische Zytokin IL1A. Der Nachweis von *B. pumilus* im bovinen Uterus kann mit einer klinischen Metritis oder Endometritis verbunden sein, ist jedoch auch für klinisch unauffällige Tiere beschrieben (WAGENER et al., 2015). Vermutlich sind neben der bakteriellen Infektion für die Entwicklung einer Metritis oder Endometritis weitere z.B. wirtsseitige Faktoren entscheidend. Hier kommen beispielsweise der Verlauf der vorausgegangenen Kalbung oder die metabolische Gesundheit in Frage (CHEONG et al., 2011; CHANKEAW et al., 2018; PASCAL et al., 2021).

Im vorliegenden Versuch wurde ein stimulierender Einfluss von *L. buchneri* auf die endometriale Genexpression von IL1B und IL1RA festgestellt. Auf die Genexpression von IL1A konnten GÄRTNER et al. (2015) dagegen keinen signifikanten Einfluss durch *L. buchneri* nachweisen. Jedoch ist zu beachten, dass in der zitierten Studie eine zweidimensionale Zellkultur verwendet wurde. Diese spiegelt die Vorgänge in bovinen endometrialen Epithelzellen wider, während sich das Explant aus Epithel- und Stromazellen sowie weiteren Zellen wie beispielsweise Fibrozyten oder Mastzellen zusammensetzt (BORGES et al., 2012; BARTELS, 2014). In welchem der genannten Zelltypen die Genexpression von IL1B und IL1RA durch die Koinkubation mit *L. buchneri* in der vorliegenden Arbeit erhöht

wurde, lässt sich mit den verwendeten Methoden nicht genauer feststellen. Hier könnten zukünftig immunhistochemische Untersuchungen Aufschluss geben. PETER et al. (2018) konnten bei Kühen mit SE eine verringerte endometriale Genexpression von IL1B zwei bis vier Wochen nach intrauteriner Anwendung von *L. buchneri* im Vergleich zu einer Placebo-Gruppe detektieren. Dies muss jedoch nicht im Widerspruch zu der in der Explantkultur beobachteten erhöhten IL1B-Expression nach 3, 14 oder 24 h Koinkubation mit *L. buchneri* stehen. Es ist durchaus denkbar, dass auch *in vivo* durch *L. buchneri* zunächst eine Aktivierung des lokalen Immunsystems und folglich auch eine Induktion von IL1B ausgelöst wird. Diese stimulierende Wirkung auf IL1B in einer bovinen endometrialen Explantkultur wurde bereits auch für *Lactobacillus rhamnosus* und *Lactobacillus reuteri* beschrieben (GENIS et al., 2017).

Insgesamt erscheint die weitere Erforschung von *Lactobacilli* für neue Erkenntnisse zu Pathogenese und Prophylaxe von Metritiden und Endometritiden beim Rind vielversprechend. Hier sollte sowohl deren Interaktion mit pathogenen Keimen als auch der unmittelbare Einfluss von *Lactobacilli* auf die lokale Immunfunktion Beachtung finden.

### **3. IL10 ist ein potenter Modulator der lokalen Immunantwort im bovinen Endometrium**

Für die Gesunderhaltung von Geweben ist ein Gleichgewicht zwischen pro- und antiinflammatorischen Zytokinen entscheidend (DINARELLO, 2000). Welche Bedeutung das antiinflammatorische Zytokin IL10 bei der Entwicklung von Gebärmutterentzündungen beim Rind hat, wird in der Literatur jedoch kontrovers diskutiert. Sowohl für zu niedrige, als auch für zu hohe Konzentrationen von IL10 im Endometrium während des frühen Puerperiums gibt es Hinweise auf ein erhöhtes Risiko für eine spätere Entwicklung von subklinischer Endometritis (SE). Ersteres könnte ein Überschießen von inflammatorischen Vorgängen begünstigen (HERATH et al., 2009), letzteres zu einer ineffizienten Reaktion der lokalen Immunmechanismen auf eingedrungene Keime führen (BRODZKI et al., 2015b). Auch in einem größeren zeitlichen Abstand zur vorausgegangenen Geburt konnten HELFRICH et al. (2020) bei Kühen mit SE eine höhere endometriale Genexpression von IL10 feststellen als bei uterusgesunden Kühen.

Aufgrund der daher zu vermutenden großen Relevanz von IL10 bei entzündlichen

Vorgängen im bovinen Endometrium wurde in der vorliegenden Arbeit dessen Wirkung auf das IL1-System untersucht. Hierfür wurden endometriale Explants für 24 h mit IL10 kokultiviert und anschließend die Genexpression von IL1B und IL1RA quantitativ bestimmt. Dabei konnte unter Zugabe von IL10 eine klare Verschiebung des IL1-Systems auf Genexpressionsebene in die antiinflammatorische Richtung festgestellt werden, welche durch die starke Senkung der IL1B-Expression begründet ist.

Die beobachtete Suppression von IL1B durch IL10 wurde bereits in anderen Kontexten beschrieben (MOORE et al., 2001; FERNANDES et al., 2002; GUARDA et al., 2011). Überraschenderweise wurde in der durchgeführten Explantkultur unter dem Einfluss von IL10 auch die Genexpression von IL1RA gehemmt. Untersuchungen zum Einfluss von IL10 auf IL1RA sind in der Literatur bisher kaum beschrieben. JENKINS et al. (1994) konnten im Gegensatz zu den hier vorgestellten Ergebnissen eine Induktion der IL1RA-Expression in kultivierten humanen Monozyten unter IL10-Einfluss feststellen. Daher sind weitere Untersuchungen zum Einfluss von IL10 auf IL1RA von Interesse.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit verdeutlichen, wie potent sich IL10 auf das bovine Endometrium auswirken und das Milieu in die antiinflammatorische Richtung verschieben kann. Dies unterstreicht die Relevanz einer physiologischen Regulation von IL10 und dessen Bedeutung für die Entwicklung oder Verhinderung einer Gebärmutterentzündung beim Rind. Weitere Untersuchungen zu IL10 in Zusammenhang mit entzündlichen Vorgängen im bovinen Endometrium sind von großem Interesse. Da in der Literatur zudem Hinweise auf die Bedeutung von Mutationen des IL10-Rezeptors bei chronischen Entzündungen der Darmschleimhaut beschrieben sind (GLOCKER et al., 2009), scheinen auch qualitative und quantitative Untersuchungen des IL10-Rezeptors im bovinen Endometrium sinnvoll.

#### **4. Kühe mit subklinischer Endometritis zeigen eine Verschiebung des IL1RA/IL1B-Verhältnisses im Uterussekret**

US hat sich als vielversprechendes Medium zur Pathogeneseforschung der SE beim Rind erwiesen (HELFRICH et al., 2020; HILLMER et al., 2020). Dabei konnte im US von Tieren mit zytologisch detektierter SE eine höhere IL1B-Konzentration nachgewiesen werden als im US uterusgesunder Tiere

(HELFRICH et al., 2020). Entsprechend stellt sich die Frage, ob sich die Konzentration von IL1RA als antiinflammatorischer Gegenpart zu IL1B im US ebenfalls mit der Uterusgesundheit verändert. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit die Proteinkonzentration von IL1RA im US von Tieren ohne und mit SE untersucht. Dafür wurden sowohl *in vivo* gewonnene Proben verwendet, in denen die IL1B-Konzentration schon bestimmt worden war (HELFRICH, 2018), als auch Proben, die am Schlachtorgan gewonnen wurden. Bei Letzteren wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit zusätzlich zur IL1RA- auch die IL1B-Konzentration mittels AlphaLISA gemessen. In allen Proben wurde das IL1RA/IL1B-Verhältnis bestimmt.

Für die Messung von bovinem IL1RA im US wurde zunächst ein *in house*-AlphaLISA etabliert. Dessen Evaluierung mittels Untersuchung von Lower Detection Limit, Hook Point, Intra- und Inter-Assay Variation sowie Wiederfindungsrate bestätigten die Eignung zur Messung von IL1RA. Beobachtete Ungenauigkeiten der Konzentrationsbestimmung im Bereich  $< 5$  ng/ml konnten für die Verwendung in der vorliegenden Arbeit als unkritisch betrachtet werden, da die im US ermittelten IL1RA-Konzentrationen überwiegend deutlich oberhalb dieses Bereiches lagen (vgl. Tabelle 6). Daher sind die Ergebnisse in diesem Versuch als aussagekräftig zu bewerten.

Bei den am Schlachtorgan gewonnenen Proben lag die Konzentration von IL1B im US wie auch im Fall der *in vivo*-Gewinnung bei Tieren mit SE (PMN-Anteil  $\geq 5$  %) höher als bei uterusgesunden Tieren. Dagegen konnten bei beiden US-Gewinnungsarten keine signifikanten uterusgesundheitsabhängigen Unterschiede in der IL1RA-Konzentration gefunden werden. GABLER et al. (2009) konnten auf Genexpressionsebene ebenfalls keinen signifikanten Unterschied zwischen uterusgesunden Tieren und Tieren mit SE bei der endometrialen IL1RA-Expression feststellen. Sowohl in den *in vivo* gewonnenen US-Proben, als auch in den US-Proben aus Schlachtorganen überstieg unabhängig von der Uterusgesundheit die IL1RA-Konzentration die IL1B-Konzentration deutlich. Im Fall der *in vivo* gewonnenen US-Proben konnte bei Kühen mit SE ein niedrigeres IL1RA/IL1B-Verhältnis als bei uterusgesunden Kühen dargestellt werden. Diese Verschiebung des IL1RA/IL1B-Verhältnisses in die proinflammatorische Richtung wurde durch die starke Erhöhung der IL1B-Konzentration bedingt.

Im Fall der US-Proben aus Schlachtorganen war hier nur eine Tendenz feststell-

bar. Jedoch sind diese Ergebnisse aufgrund der geringen Tierzahl in der SE-Gruppe ( $n = 3$ ) unter Vorbehalt als Hinweise aus einer explorativen Untersuchung zu betrachten. Eine Wiederholung mit größerem Probenumfang wird für beide Probengewinnungsarten als sinnvoll erachtet.

Ob das verschobene IL1RA/IL1B-Verhältnis im US von Kühen mit SE für die Entzündung ursächlich oder aber deren Folge ist, kann anhand der gewonnenen Ergebnisse nicht beurteilt werden. Die beobachtete Verschiebung des IL1RA/IL1B-Verhältnisses kann einerseits eine Dysregulation der lokalen endometrialen Immunmechanismen widerspiegeln, bei der die proinflammatorischen Faktoren in Relation zu den antiinflammatorischen Faktoren überschießen. Ebenso denkbar ist jedoch ein verschobenes IL1RA/IL1B-Verhältnis als Folge einer SE, die durch eine chronische Reizung des Endometriums entstanden ist und aufrechterhalten wird. Diese Reizung kann ursprünglich durch Bakterien oder Viren bedingt worden sein, die infolge ineffizienter Reinigungsmechanismen im Uterus persistierten (GHANEM et al., 2015).

In beiden Fällen ist eine Beeinträchtigung der Fruchtbarkeit durch die Verschiebung des IL1RA/IL1B-Verhältnisses denkbar, da die adäquate Regulation der Proteine des IL1-Systems von Bedeutung für reproduktionsmedizinische Ereignisse wie die Implantation ist (SIMÓN et al., 1994b; VAN MOURIK et al., 2009). Für ein besseres Verständnis dieser Zusammenhänge sind weitere Untersuchungen erforderlich. Dabei wäre der Einbezug weiterer pro- und antiinflammatorischer Faktoren sowie Verlaufsuntersuchungen, beispielsweise vom klinischen Puerperium bis zur ersten Besamung, sinnvoll. Darüber hinaus sind holistische Analysen (Transkriptom, Proteom, Mikrobiom) von großem Interesse, um weitere potenzielle Biomarker zu identifizieren.

## **5. Proteinkonzentration von IL1B und IL1RA in Uterussekretproben aus Tierversuch und Schlachtorganen**

Wie in V.1. dargestellt, sind im Sinne des 3R-Prinzips Alternativen zu Tierversuchen von Interesse. Eine Möglichkeit zur tierversuchsfreien Gewinnung von biologischen Proben stellt die Beprobung von Schlachtorganen dar. Weitere Vorteile sind dabei ein schneller und einfacher Zugang zum Uterus und eine flexible Handhabbarkeit des Organs bei der Beprobung. Jedoch muss hinterfragt werden, inwieweit der Schlachtprozess die Stärke der zu untersuchenden Genexpression

oder Proteinkonzentration beeinflusst. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden sowohl US-Proben aus *in vivo*-Gewinnung, als auch solche aus Schlachtorganen genutzt. Daher können beide Gewinnungsmethoden im Hinblick auf das gewonnene Volumen an US, die Blutkontamination des US und die Proteinkonzentration von IL1B und IL1RA im US verglichen werden.

Das gewonnene Volumen an US konnte anhand der Wiegung jeder gewonnenen Probe vor der Aufbereitung und der Berechnung des Verdünnungsfaktors  $F$  erfasst werden. Je weniger US vom eingesetzten Merocel-Schwämmchen aufgenommen wurde, desto stärker ist die Verdünnung des US durch den eingesetzten Extraktionspuffer und desto größer fällt  $F$  aus. Für an Schlachtorganen gewonnenen US-Proben wurde eine weniger starke Verdünnung und ein dementsprechend höheres gewonnenes US-Volumen berechnet, als für die verwendeten *in vivo* gewonnenen US-Proben. Eine mögliche Erklärung dafür kann die unterschiedliche Beprobungsdauer sein: In der vorliegenden Arbeit verblieb das Merocel-Schwämmchen für 4 min im Uterus als Schlachtorgan, während diese Zeitspanne im Tierversuch aus Gründen des Tierwohls auf 2 min begrenzt worden war (HELFRICH, 2018). Allerdings können auch Veränderungen im Rahmen des Schlachtprozesses als Ursachen für diese Beobachtung nicht ausgeschlossen werden. Hier sind beispielsweise postmortale Flüssigkeitsansammlungen im Uterus nach der Schlachtung denkbar.

Bei der Gewinnung von US-Proben *in vivo* kam es durch kleine Schleimhautverletzungen in einigen Fällen zu einer messbaren Blutkontamination der US-Probe (Nachweisgrenze 2,18 %), sodass bei der Bestimmung der Proteinkonzentration von IL1B und IL1RA eine entsprechende rechnerische Korrektur durchgeführt werden musste (HELFRICH, 2018). Bei der Gewinnung von US-Proben aus dem Schlachtorgan kam es dagegen nur bei 2 von insgesamt 37 Beprobungen zu einer Blutkontamination oberhalb der Nachweisgrenze. Neben der besseren Kontrolle bei der Einführung des Arbeitskanals am Schlachtorgan sowie die Möglichkeit der festen Fixierung des Uterus während der Probengewinnung ist dies durch die der Organentnahme vorausgegangenen weitestgehenden Entblutung des Spendertiers zu erklären.

Um zu untersuchen, ob der Schlachtprozess einen Einfluss auf die Proteinkonzentrationen von IL1B und IL1RA sowie das IL1RA/IL1B-Verhältnis hat, wurden die entsprechenden Ergebnisse beider Gruppen verglichen. Im Fall der Tiere ohne

SE war das IL1RA/IL1B-Verhältnis in US-Proben aus Schlachtorganen niedriger als in US-Proben aus Gewinnung *in vivo*. Beim Vergleich der US-Proben von Tieren mit SE zwischen den beiden Gewinnungsarten konnten dagegen keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Während bei *in vivo* gewonnenen US-Proben im Hinblick auf das IL1RA/IL1B-Verhältnis ein signifikanter Unterschied zwischen Tieren mit und ohne SE gezeigt werden konnte, war hier in am Schlachtorgan gewonnenen Proben nur eine Tendenz feststellbar. Eine mögliche Erklärung der beschriebenen Unterschiede stellt die potenzielle Beeinflussung entzündungsrelevanter Gene durch den Schlachtprozess dar. Dabei ist insbesondere an den Blutentzug und die daraus resultierende Beeinträchtigung der Sauerstoffversorgung des Gewebes zu denken. In der Literatur sind Zusammenhänge zwischen Ischämie bzw. Hypoxie und entzündlichen Prozessen wie einer erhöhten Serumkonzentration proinflammatorischer Zytokine beschrieben (LINN et al., 2006; ELTZSCHIG & CARMELIET, 2011).

Inwiefern Ergebnisse aus einer Probengewinnung am Schlachtorgan mit einer Probengewinnung *in vivo* vergleichbar sind, kann im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht abschließend beantwortet werden. Die festgestellten Gemeinsamkeiten und Unterschiede sind auch aufgrund der geringen Anzahl an Spendertieren mit SE unter Vorbehalt zu betrachten. Für eine sichere Beurteilung ist eine Untersuchung mit größerem Probenumfang notwendig. Zur Detektion potenzieller Veränderungen der Zusammensetzung des US im Rahmen des Schlachtprozesses sind außerdem umfassende vergleichende proteomische Analysen von Interesse.

## 6. Fazit

Zusammenfassend können die in dieser Arbeit genutzten Methoden nach ihrer Eignung für die durchgeführten Untersuchungen folgendermaßen beurteilt sowie die in I. formulierten Hypothesen abschließend bestätigt oder widerlegt werden:

### Beurteilung der verwendeten Methoden

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Explantkultur zur Darstellung des Einflusses entzündungsrelevanter Komponenten auf das IL1-System geeignet ist und sich damit für die weitere Erforschung endometrialer Entzündungsprozesse anbietet. Zudem wurde mit der Etablierung eines AlphaLISA zur quantitativen Bestimmung von IL1RA eine geeignete Möglichkeit für die

Untersuchung von IL1RA im US entwickelt.

Hypothese 1: Pathogene, potenziell pathogene und potenziell protektive Bakterien unterscheiden sich in ihrem Effekt auf die Genexpression von IL1B und IL1RA im bovinen Endometrium.

Entgegen der Hypothese wurden zwischen den mittels Explantkultur festgestellten Einflüssen des pathogenen *E. coli*, potenziell pathogenen *B. pumilus* und potenziell protektiven *L. buchneri* auf die Expression der analysierten Gene innerhalb der untersuchten Zeitspanne große Übereinstimmungen festgestellt. Dies legt einerseits eine ähnliche Reaktion entzündungsvermittelnder Rezeptoren auf unterschiedlich pathogene Bakterien nahe und unterstreicht andererseits die Bedeutung weiterer Faktoren und Regulatoren, in deren Kontext die Bedeutung bakterieller Infektionen für die Entwicklung von Gebärmutterentzündungen angesehen werden sollte. Hier sind beispielsweise der Zustand des Immunsystems oder metabolische Erkrankungen und eine resultierende Immundysregulation zu nennen.

Hypothese 2: Pro- und antiinflammatorische Zytokine modulieren die Genexpression von IL1B und IL1RA im bovinen Endometrium.

Ein Einfluss der proinflammatorischen Zytokine IL1B und IL17A auf die Expression von IL1B und IL1RA konnte im verwendeten Versuchsdesign mittels Explantkultur nicht gezeigt werden. Dagegen stellt sich das antiinflammatorische Zytokin IL10 als potenter Modulator der entzündungsrelevanten IL1-Gene dar. Dies betont den Bedarf an weiterer Forschung zur Rolle antiinflammatorischer Komponenten in Zusammenhang mit der Gebärmutterentzündung beim Rind.

Hypothese 3: Subklinische Endometritis spiegelt sich im IL1RA/IL1B-Verhältnis im bovinen Uterussekret wider.

Bei der Untersuchung des IL1RA/IL1B-Verhältnisses in bovinem, *in vivo* gewonnenem US konnte die Verschiebung in die proinflammatorische Richtung beim Vorliegen einer SE dargestellt werden. Zur Einordnung dieser Beobachtung als ursächlich für oder Folge der SE bedarf es weiterer Untersuchungen. Zudem deutet sich hier das Potenzial des IL1RA/IL1B-Verhältnisses als Biomarker für ein entzündetes Endometrium an.

## VI. ZUSAMMENFASSUNG

Gebärmutterentzündungen beim Rind gefährden sowohl das Tierwohl als auch die Fruchtbarkeit der erkrankten Kuh und verursachen erhebliche ökonomische Schäden in der Milchviehhaltung. Im Rahmen der Prophylaxe und Therapie von endometrialen Entzündungen spielt die adäquate Regulation pro- und antiinflammatorischer Faktoren, wie der Proteine der Interleukin (IL) 1-Familie, eine zentrale Rolle. Ziel der vorliegenden Arbeit war daher, die Konzentration und Regulation des proinflammatorischen IL1B und seines Antagonisten IL1RA im gesunden sowie im entzündeten bovinen Uterus zu untersuchen.

Zum einen wurde die Regulation der Genexpression von IL1B und IL1RA im bovinen Endometrium unter ausgewählten entzündungsrelevanten Einflussfaktoren in einer Explantkultur untersucht. Dazu wurden endometriale Explants von 26 Kühen am Schlachtorgan gewonnen und aufbereitet. Die Explants wurden mit ausgewählten bakteriellen Komponenten (*Escherichia coli*, *Bacillus pumilus*, *Lactobacillus buchneri*) für 3, 14 und 24 h sowie mit pro- und antiinflammatorischen rekombinanten bovinen Zytokinen (IL1B, IL17A, IL10) für 24 h koinkubiert. Anschließend wurde die Genexpression von IL1RA und IL1B sowie deren Verhältnis in den Explants mittels Reverse Transkriptase-qPCR absolut quantifiziert.

Für jedes Spendertier wurde die Vitalität von Explants über 24 h durch eine Untersuchung der Stoffwechselaktivität mittels WST-8 überprüft. Dabei zeigte sich über diesen Zeitraum eine ausreichende Stoffwechselaktivität der Explants mit einem Anstieg zwischen Inkubationsbeginn und -ende.

Alle ausgewählten Bakterien stimulierten die Genexpression von IL1B inkubationszeitunabhängig ( $p < 0,001$ ) sowie die von IL1RA inkubationszeitabhängig (*Escherichia coli*:  $p = 0,908$  bis  $p < 0,001$ ), *Bacillus pumilus*:  $p = 0,998$  bis  $p = 0,001$ , *Lactobacillus buchneri*:  $p = 0,997$  bis  $p < 0,001$ ). Wegen einer stärkeren Steigerung der Genexpression von IL1B als von IL1RA verschob sich das IL1RA/IL1B-Verhältnis unter dem Einfluss aller ausgewählten Bakterien jeweils in die proinflammatorische Richtung ( $p < 0,001$ ). Aufgrund der großen Übereinstimmung der Einflüsse des pathogenen *Escherichia coli* und des fakultativ pathogenen *Bacillus pumilus* in der Explantkultur sollte zukünftig erforscht werden, in welchem Kontext fakultativ pathogene Bakterien *in vivo* an der Pathogenese

klinischer und subklinischer Endometritiden beteiligt sind. Darüber hinaus sind weitere Untersuchungen zur Wirkweise potenziell protektiver Bakterien wie *Lactobacillus buchneri* von großem Interesse.

Ein Effekt der proinflammatorischen Zytokine IL1B und IL17A auf die Genexpression von IL1B und IL1RA konnte im endometrialen Explantmodell nicht festgestellt werden ( $p > 0,1$ ). Dagegen konnte nach Koinkubation mit IL10 eine verringerte IL1B- und IL1RA-Genexpression sowie eine Verschiebung des IL1RA/IL1B-Verhältnisses in die antiinflammatorische Richtung ( $IL1RA > IL1B$ ) dargestellt werden ( $p < 0,001$ ). Somit erwies sich IL10 im vorliegenden Versuch als potenter Modulator der endometrialen Regulation von IL1B und IL1RA und sollte Gegenstand weiterer Forschung zur Gebärmuttergesundheit des Rindes sein. Insgesamt ist die Explantkultur als geeignete Methode zur Untersuchung der Regulation der Genexpression von IL1B und IL1RA im bovinen Endometrium einzustufen.

Zum anderen wurden Untersuchungen zu IL1B und IL1RA auf Proteinebene durchgeführt. Dafür wurde von 37 Spendertieren Uterussekret (US) am Schlachtorgan gewonnen. Zusätzlich wurden US-Proben, die in einem Vorgängerprojekt am lebenden Tier gewonnen worden waren ( $n = 26$ ), ebenfalls auf die Konzentration von IL1B und IL1RA untersucht. Basierend auf den Ergebnissen der zytologischen Untersuchung wurden die US-Proben in die Gruppen SE<sub>neg</sub> (Anteil polymorphkerniger neutrophiler Granulozyten (PMN)  $< 5\%$ ) und SE<sub>pos</sub> (Tiere mit subklinischer Endometritis, PMN-Anteil  $\geq 5\%$ ) unterteilt.

Mittels eines kommerziellen AlphaLISA-Kits für IL1B und eines im Rahmen dieser Arbeit entwickelten *in house*-AlphaLISA für IL1RA wurden die entsprechenden Proteinkonzentrationen sowie deren Verhältnis zueinander in den US-Proben bestimmt. Die Evaluierung des *in house*-AlphaLISA für IL1RA zeigte, dass damit aussagekräftige Ergebnisse gewonnen werden konnten. Unabhängig von der Beprobungsart (Schlachtorgan/am lebenden Tier) konnte in Proben der Gruppe SE<sub>pos</sub> eine höhere Konzentration von IL1B als in Proben der Gruppe SE<sub>neg</sub> detektiert werden ( $p = 0,027/p < 0,001$ ), während bei der Konzentration von IL1RA keine signifikanten Unterschiede bestanden ( $p > 0,05$ ). Bei US-Proben, die am lebenden Tier gewonnen wurden, konnte in den Proben der Gruppe SE<sub>pos</sub> im Vergleich zu Proben der Gruppe SE<sub>neg</sub> ein in die proinflammatorische Richtung verschobenes IL1RA/IL1B-Verhältnis festgestellt werden ( $p = 0,002$ ). Die bei Tieren mit sub-

klinischer Endometritis (SE) aufgefallene Verschiebung des IL1-Systems kann entweder eine (Teil-) Ursache oder eine Folge der SE sein. Um diesen Sachverhalt aufzuschlüsseln, sind weiterführende Untersuchungen notwendig. Darüber hinaus legen die Ergebnisse dieser Arbeit das Potenzial des IL1RA/IL1B-Verhältnisses als möglicher Biomarker für ein entzündetes Endometrium nahe.

Zusammenfassend kann aus der vorliegenden Arbeit eine wichtige Rolle von IL1B und IL1RA bei der Gebärmutterentzündung des Rindes abgeleitet werden, die in der zukünftigen Forschung, insbesondere zu Pathogenese und Diagnostik, berücksichtigt werden sollte.

## VII. SUMMARY

Bovine uterine inflammation endangers both animal welfare and the fertility of the affected cow and causes considerable economic loss in dairy farming. The adequate regulation of pro- and antiinflammatory factors, such as the proteins of the interleukin 1-family, plays a central role in the prevention and healing of endometrial inflammation. Therefore, this research project targeted on investigating the concentration and regulation of the proinflammatory IL1B and its antagonist IL1RA in samples from bovine uteri under both healthy and inflamed condition.

Therefore, the effect of selected inflammation-related components on the regulation of gene expression of IL1B and IL1RA in the bovine endometrium was investigated in an explant culture. Endometrial explants were taken from uteri of 26 donor cows at the abattoir. The explants were coincubated for 3, 14 and 24 h with selected bacterial components (*Escherichia coli*, *Bacillus pumilus*, *Lactobacillus buchneri*) as well as with pro- and antiinflammatory recombinant bovine cytokines (IL1B, IL17A, IL10) for 24 h. Afterwards, the gene expression of IL1RA and IL1B in the explants as well as their ratio was quantified via reverse transcription qPCR and standard curve method.

For each donor cow the vitality of explants was analyzed over the incubation period of 24 h by examining the metabolic activity using WST-8. This showed a sufficient metabolic activity of the explants with an increase between the start and end of incubation.

All selected bacteria stimulated the gene expression of IL1B in an incubation time-independent manner ( $p < 0.001$ ), whereas the gene expression of IL1RA was stimulated in an incubation time-dependent manner (*Escherichia coli*:  $p = 0.908$  to  $p < 0.001$ ), *Bacillus pumilus*:  $p = 0.998$  to  $p = 0.001$ , *Lactobacillus buchneri*:  $p = 0.997$  to  $p < 0.001$ ). Due to a higher stimulation of the gene expression of IL1B than of IL1RA, the IL1RA/IL1B ratio in the explants coincubated with any of the selected bacteria shifted in proinflammatory direction ( $p < 0.001$ ). Accordingly, in this study the influence of pathogenic *Escherichia coli*, facultative pathogenic *Bacillus pumilus*, as well as apathogenic and potentially protective *Lactobacillus buchneri* on the regulation of IL1B and IL1RA gene expression in endometrial explants were quite similar. The observed high degree of consistency be-

tween the influence of pathogenic *Escherichia coli* and facultative pathogenic *Bacillus pumilus* in explant culture highlights the importance of further research to determine the context in which facultative pathogenic bacteria are involved in the pathogenesis of clinical and subclinical endometritis *in vivo*. In addition, further studies on the mode of action of potentially protective bacteria like *Lactobacillus buchneri* are of great interest.

An effect of the proinflammatory cytokines IL1B and IL17A on the gene expression of IL1B and IL1RA was not detected in the endometrial explant culture ( $p > 0.1$ ). In contrast, a reduced gene expression of both IL1B and IL1RA as well as a shift of the IL1RA/IL1B ratio in the antiinflammatory direction (IL1RA  $>$  IL1B) was observed after co-incubation with IL10 ( $p < 0.001$ ). Thus, IL10 was proven to be a potent modulator of the endometrial regulation of IL1B and IL1RA in the present experiment. The role of IL10 should be subject of further research on bovine uterine health. Based on the study's results, explant culture can be classified as an appropriate experimental method for analyzing influences of inflammation-related factors on gene expression of IL1B and IL1RA in the bovine endometrium.

Furthermore, this study investigated IL1B and IL1RA concentrations at protein level using uterine secretion (US). US was taken from uteri of 37 cows at the abattoir. Additionally, IL1B and IL1RA concentration was measured in US samples originating from a previous research project ( $n = 26$ ). Based on cytological examination, the US samples were divided into the two groups of SE<sub>neg</sub> (polymorphonuclear neutrophil granulocyte (PMN) percentage  $< 5\%$ ) and SE<sub>pos</sub> (animals with subclinical endometritis, PMN percentage  $\geq 5\%$ ).

Using a commercial AlphaLISA kit for IL1B and an *in house*-AlphaLISA for IL1RA, which was developed in this study, the respective protein concentrations in the US samples as well as their ratio were determined. The methodological evaluation of the *in house*-AlphaLISA for IL1RA proofed, that reliable results were generated with this assay. Independent of the type of sampling (abattoir organ/live animal), a higher concentration of IL1B was detected in samples of group SE<sub>pos</sub> compared to those of group SE<sub>neg</sub> ( $p = 0.027/p < 0.001$ ), whereas no significant differences in the concentration of IL1RA were observed ( $p > 0.05$ ). In US samples retrieved from live animals a more proinflammatory IL1RA/IL1B ratio was detected in samples of group SE<sub>pos</sub> compared to samples of group SE<sub>neg</sub>

( $p = 0.002$ ). Whether this shift in the IL1RA/IL1B ratio observed for animals with diagnosed subclinical endometritis (SE) reflects either a (partial) cause for or a consequence of SE has to be examined in further studies. Furthermore, the results of this study suggest the potential of the IL1RA/IL1B ratio as a possible biomarker for an inflamed endometrium.

In conclusion, the results of this research project highlight the important role of IL1B and IL1RA in context of bovine uterine inflammation and thereby recommend its consideration for future research, especially on pathogenesis and diagnostics.

## VIII. LITERATURVERZEICHNIS

Agrawal S, Singh AP, Singh R, Saikia R, Choudhury S, Shukla A, Prabhu SN, Agrawal J. *Molecular characterization of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Escherichia coli isolated from postpartum uterine infection in dairy cattle in India.* Vet World 2021; 14: 200-9.

Aleri JW, Hine BC, Pyman MF, Mansell PD, Wales WJ, Mallard B, Fisher AD. *Periparturient immunosuppression and strategies to improve dairy cow health during the periparturient period.* Res Vet Sci 2016; 108: 8-17.

Arend WP, Welgus HG, Thompson RC, Eisenberg SP. *Biological properties of recombinant human monocyte-derived interleukin 1 receptor antagonist.* J Clin Invest 1990; 85: 1694-7.

Armengol R, Fraile L. *Descriptive study for culling and mortality in five high-producing Spanish dairy cattle farms (2006-2016).* Acta Vet Scand 2018; 60: 45.

Atassi F, Brassart D, Grob P, Graf F, Servin AL. *Lactobacillus strains isolated from the vaginal microbiota of healthy women inhibit Prevotella bivia and Gardnerella vaginalis in coculture and cell culture.* FEMS Immunol Med Microbiol 2006; 48: 424-32.

Avila-Vergara MA, Peraza-Garay FJ, Meraz-Cruz N, Hernandez-Guerrero C, Palacios-Gonzalez B, Vadillo-Ortega F. *Association of Intron-2 Variable Numbers of an 86-bp Tandem Repeat-Polymorphisms of Interleukin-1 Receptor Antagonist Gene and Idiopathic Recurrent Spontaneous Abortion.* Rev Invest Clin 2018; 70: 96-102.

Barański W, Podhalicz-Dzięgielewska M, Zduńczyk S, Janowski T. *The diagnosis and prevalence of subclinical endometritis in cows evaluated by different cytologic thresholds.* Theriogenology 2012; 78: 1939-47.

Barlund CS, Carruthers TD, Waldner CL, Palmer CW. *A comparison of diagnostic techniques for postpartum endometritis in dairy cattle.* Theriogenology 2008; 69: 714-23.

- Barros CM, Plante C, Thatcher WW, Hansen PJ. *Regulation of bovine endometrial secretion of prostaglandins and synthesis of 2',5'-oligoadenylate synthetase by interferon-alpha molecules*. Am J Reprod Immunol 1991; 25: 146-52.
- Bartels JJ (2014), *Charakterisierung des gesunden und entzündeten Uterus des Rindes*. Tierärztliche Fakultät, Ludwig-Maximilians-Universität München Diss. med. vet., <https://edoc.ub.uni-muenchen.de/17184/>.
- Bauernfeind F, Ablasser A, Bartok E, Kim S, Schmid-Burgk J, Cavlar T, Hornung V. *Inflammasomes: current understanding and open questions*. Cell Mol Life Sci 2011; 68: 765-83.
- Becker C, Riedmaier I, Pfaffl MW. *RNA-Qualitätskontrolle in der Genexpressionsanalytik*. BIOSpektrum 2009; 15: 512-5.
- Bellehumeur C, Blanchet J, Fontaine JY, Bourcier N, Akoum A. *Interleukin 1 regulates its own receptors in human endometrial cells via distinct mechanisms*. Hum Reprod 2009; 24: 2193-204.
- Benzaquen ME, Risco CA, Archbald LF, Melendez P, Thatcher MJ, Thatcher WW. *Rectal temperature, calving-related factors, and the incidence of puerperal metritis in postpartum dairy cows*. J Dairy Sci 2007; 90: 2804-14.
- Bicalho MLS, Machado VS, Higgins CH, Lima FS, Bicalho RC. *Genetic and functional analysis of the bovine uterine microbiota. Part I: Metritis versus healthy cows*. J Dairy Sci 2017; 100: 3850-62.
- Bierbaum G, Sahl HG. *Induction of autolysis of staphylococci by the basic peptide antibiotics Pep 5 and nisin and their influence on the activity of autolytic enzymes*. Arch Microbiol 1985; 141: 249-54.
- Black RA, Kronheim SR, Cantrell M, Deeley MC, March CJ, Prickett KS, Wignall J, Conlon PJ, Cosman D, Hopp TP. *Generation of biologically active interleukin-1 beta by proteolytic cleavage of the inactive precursor*. Journal of Biological Chemistry 1988; 263: 9437-42.

Bondurant RH. *Inflammation in the bovine female reproductive tract*. J Anim Sci 1999; 77 Suppl 2: 101-10.

Bonnett BN, Martin SW, Gannon VP, Miller RB, Etherington WG. *Endometrial biopsy in Holstein-Friesian dairy cows. III. Bacteriological analysis and correlations with histological findings*. Can J Vet Res 1991; 55: 168-73.

Borges AM, Healey GD, Sheldon IM. *Explants of intact endometrium to model bovine innate immunity and inflammation ex vivo*. Am J Reprod Immunol 2012; 67: 526-39.

Bourdic A, Martel V, Akoum A. *Synchronous regulation of the determinants of endometrial receptivity to interleukin 1 at key stages of early embryo implantation in vivo*. Fertil Steril 2014; 101: 1183-93.

Brayman M, Thathiah A, Carson DD. *MUC1: a multifunctional cell surface component of reproductive tissue epithelia*. Reprod Biol Endocrinol 2004; 2: 4.

Brodzki P, Kostro K, Krakowski L, Marczuk J. *Inflammatory cytokine and acute phase protein concentrations in the peripheral blood and uterine washings of cows with subclinical endometritis in the late postpartum period*. Vet Res Commun 2015a; 39: 143-9.

Brodzki P, Kostro K, Brodzki A, Wawron W, Marczuk J, Kurek L. *Inflammatory cytokines and acute-phase proteins concentrations in the peripheral blood and uterus of cows that developed endometritis during early postpartum*. Theriogenology 2015b; 84: 11-8.

Bröker BS, Schütt C; Fleischer B (2019), *Grundwissen Immunologie*. 4. Auflage, Springer Spektrum, Berlin.

Butler JE. *Bovine immunoglobulins: an augmented review*. Vet Immunol Immunopathol 1983; 4: 43-152.

Butt BM, Besser TE, Senger PL, Widders PR. *Specific antibody to Haemophilus somnus in the bovine uterus following intramuscular immunization*. Infect Immun 1993; 61: 2558-62.

Cengiz M, Altun S, Comakli S, Ozkaraca M, Cengiz S, Hayirli A (2016) *Sensitivity and specificity of endometrial cytopathological diagnosis in slaughtered cows*. *Reproduction in Domestic Animals* 2016; 51 (Suppl. 2): 82.

Chankeaw W, Guo YZ, Båge R, Svensson A, Andersson G, Humblot P. *Elevated non-esterified fatty acids impair survival and promote lipid accumulation and pro-inflammatory cytokine production in bovine endometrial epithelial cells*. *Reprod Fertil Dev* 2018; 30: 1770-84.

Chapwanya A, Meade KG, Doherty ML, Callanan JJ, Mee JF, O'Farrelly C. *Histopathological and molecular evaluation of Holstein-Friesian cows postpartum: toward an improved understanding of uterine innate immunity*. *Theriogenology* 2009; 71: 1396-407.

Chapwanya A, Meade KG, Foley C, Narciandi F, Evans AC, Doherty ML, Callanan JJ, O'Farrelly C. *The postpartum endometrial inflammatory response: a normal physiological event with potential implications for bovine fertility*. *Reprod Fertil Dev* 2012; 24: 1028-39.

Chapwanya A, Meade KG, Doherty ML, Callanan JJ, O'Farrelly C. *Endometrial epithelial cells are potent producers of tracheal antimicrobial peptide and serum amyloid A3 gene expression in response to E. coli stimulation*. *Vet Immunol Immunopathol* 2013; 151: 157-62.

Chen CJ, Kono H, Golenbock D, Reed G, Akira S, Rock KL. *Identification of a key pathway required for the sterile inflammatory response triggered by dying cells*. *Nat Med* 2007; 13: 851-6.

Chenault JR, McAllister JF, Chester ST, Jr., Dame KJ, Kausche FM, Robb EJ. *Efficacy of ceftiofur hydrochloride sterile suspension administered parenterally for the treatment of acute postpartum metritis in dairy cows*. *J Am Vet Med Assoc* 2004; 224: 1634-9.

Cheng Z, Chauhan L, Barry AT, Abudureyimu A, Oguejiofor CF, Chen X, Wathes DC. *Acute bovine viral diarrhea virus infection inhibits expression of interferon tau-stimulated genes in bovine endometrium*. *Biol Reprod* 2017; 96: 1142-53.

Cheong SH, Nydam DV, Galvão KN, Crosier BM, Gilbert RO. *Cow-level and herd-level risk factors for subclinical endometritis in lactating Holstein cows*. J Dairy Sci 2011; 94: 762-70.

Cheong SH, Nydam DV, Galvão KN, Crosier BM, Ricci A, Caixeta LS, Sper RB, Fraga M, Gilbert RO. *Use of reagent test strips for diagnosis of endometritis in dairy cows*. Theriogenology 2012; 77: 858-64.

Chevillard G, Derjuga A, Devost D, Zingg HH, Blank V. *Identification of interleukin-1beta regulated genes in uterine smooth muscle cells*. Reproduction 2007; 134: 811-22.

Christoffersen M, Woodward E, Bojesen AM, Jacobsen S, Petersen MR, Troedsson MH, Lehn-Jensen H. *Inflammatory responses to induced infectious endometritis in mares resistant or susceptible to persistent endometritis*. BMC Vet Res 2012; 8: 41.

Clemmons BA, Reese ST, Dantas FG, Franco GA, Smith TPL, Adeyosoye OI, Pohler KG, Myer PR. *Vaginal and Uterine Bacterial Communities in Postpartum Lactating Cows*. Front Microbiol 2017; 8: 1047.

Colotta F, Re F, Muzio M, Bertini R, Polentarutti N, Sironi M, Giri JG, Dower SK, Sims JE, Mantovani A. *Interleukin-1 type II receptor: a decoy target for IL-1 that is regulated by IL-4*. Science 1993; 261: 472-5.

Corbeil LB, Schurig GD, Duncan JR, Corbeil RR, Winter AJ. *Immunoglobulin classes and biological functions of Campylobacter (Vibrio) fetus antibodies in serum and cervicovaginal mucus*. Infect Immun 1974; 10: 422-9.

Corbeil LB, Campero CM, Rhyan JC, Anderson ML, Gershwin LJ, Agnew DW, Munson L, Bondurant RH. *Uterine mast cells and immunoglobulin-E antibody responses during clearance of Tritrichomonas foetus*. Vet Pathol 2005; 42: 282-90.

Corbin BD, Seeley EH, Raab A, Feldmann J, Miller MR, Torres VJ, Anderson KL, Dattilo BM, Dunman PM, Gerads R, Caprioli RM, Nacken W, Chazin WJ, Skaar EP. *Metal chelation and inhibition of bacterial growth in tissue abscesses*. Science 2008; 319: 962-5.

Cukierman E, Pankov R, Stevens DR, Yamada KM. *Taking cell-matrix adhesions to the third dimension*. Science 2001; 294: 1708-12.

D'Occhio MJ, Campanile G, Baruselli PS. *Transforming growth factor- $\beta$  superfamily and interferon- $\tau$  in ovarian function and embryo development in female cattle: review of biology and application*. Reprod Fertil Dev 2020; 32: 539-52.

Dadarwal D, Palmer C, Griebel P. *Mucosal immunity of the postpartum bovine genital tract*. Theriogenology 2017; 104: 62-71.

Dadarwal D, González-Cano P, Dickinson R, Griebel P, Palmer C. *Characterization of cytokine gene expression in uterine cytobrush samples of non-endometritic versus endometritic postpartum dairy cows*. Theriogenology 2019; 126: 128-39.

Danesh Mesgaran S, Gärtner MA, Wagener K, Drillich M, Ehling-Schulz M, Einspanier R, Gabler C. *Different inflammatory responses of bovine oviductal epithelial cells in vitro to bacterial species with distinct pathogenicity characteristics and passage number*. Theriogenology 2018; 106: 237-46.

Danet-Desnoyers G, Wetzels C, Thatcher WW. *Natural and recombinant bovine interferon tau regulate basal and oxytocin-induced secretion of prostaglandins F2 alpha and E2 by epithelial cells and stromal cells in the endometrium*. Reprod Fertil Dev 1994; 6: 193-202.

Davidson JA, Tiemann U, Betts JG, Hansen PJ. *DNA synthesis and prostaglandin secretion by bovine endometrial cells as regulated by interleukin-1*. Reprod Fertil Dev 1995; 7: 1037-43.

Davies D, Meade KG, Herath S, Eckersall PD, Gonzalez D, White JO, Conlan RS, O'Farrelly C, Sheldon IM. *Toll-like receptor and antimicrobial peptide expression in the bovine endometrium*. Reprod Biol Endocrinol 2008; 6: 53.

de Boer MW, LeBlanc SJ, Dubuc J, Meier S, Heuwieser W, Arlt S, Gilbert RO, McDougall S. *Invited review: Systematic review of diagnostic tests for reproductive-tract infection and inflammation in dairy cows*. J Dairy Sci 2014; 97: 3983-99.

De los Santos MJ, Mercader A, Francés A, Portolés E, Remohí J, Pellicer A, Simón C. *Role of endometrial factors in regulating secretion of components of the immunoreactive human embryonic interleukin-1 system during embryonic development.* Biol Reprod 1996; 54: 563-74.

de Moraes AA, Paula-Lopes FF, Chegini N, Hansen PJ. *Localization of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in the bovine reproductive tract.* J Reprod Immunol 1999; 42: 135-45.

Dessing MC, Tammaro A, Pulskens WP, Teske GJ, Butter LM, Claessen N, van Eijk M, van der Poll T, Vogl T, Roth J, Florquin S, Leemans JC. *The calcium-binding protein complex S100A8/A9 has a crucial role in controlling macrophage-mediated renal repair following ischemia/reperfusion.* Kidney Int 2015; 87: 85-94.

Dhaliwal GS, Murray RD, Dobson H, Montgomery J, Ellis WA, Baker JR. *Presence of antigen and antibodies in serum and genital discharges of heifers after experimental intrauterine inoculation with Leptospira interrogans serovar hardjo.* Res Vet Sci 1996; 60: 157-62.

Dinarello CA, Ikejima T, Warner SJ, Orencole SF, Lonnemann G, Cannon JG, Libby P. *Interleukin 1 induces interleukin 1. I. Induction of circulating interleukin 1 in rabbits in vivo and in human mononuclear cells in vitro.* J Immunol 1987; 139: 1902-10.

Dinarello CA. *Biologic basis for interleukin-1 in disease.* Blood 1996; 87: 2095-147.

Dinarello CA. *Proinflammatory cytokines.* Chest 2000; 118: 503-8.

Dinarello CA. *Interleukin-1beta.* Crit Care Med 2005a; 33: S460-2.

Dinarello CA. *Blocking IL-1 in systemic inflammation.* J Exp Med 2005b; 201: 1355-9.

Dinarello CA. *Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family.* Annu Rev Immunol 2009; 27: 519-50.

Dinarello CA. *Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity*. Immunol Rev 2018; 281: 8-27.

Dohmen MJ, Joop K, Sturk A, Bols PE, Lohuis JA. *Relationship between intra-uterine bacterial contamination, endotoxin levels and the development of endometritis in postpartum cows with dystocia or retained placenta*. Theriogenology 2000; 54: 1019-32.

Donato R, Cannon BR, Sorci G, Riuzzi F, Hsu K, Weber DJ, Geczy CL. *Functions of S100 proteins*. Curr Mol Med 2013; 13: 24-57.

Donofrio G, Ravanetti L, Cavirani S, Herath S, Capocéfalo A, Sheldon IM. *Bacterial infection of endometrial stromal cells influences bovine herpesvirus 4 immediate early gene activation: a new insight into bacterial and viral interaction for uterine disease*. Reproduction 2008; 136: 361-6.

Dorniak P, Bazer FW, Spencer TE. *Physiology and Endocrinology Symposium: biological role of interferon tau in endometrial function and conceptus elongation*. J Anim Sci 2013; 91: 1627-38.

Drillich M, Beetz O, Pfützner A, Sabin M, Sabin HJ, Kutzer P, Nattermann H, Heuwieser W. *Evaluation of a systemic antibiotic treatment of toxic puerperal metritis in dairy cows*. J Dairy Sci 2001; 84: 2010-7.

Dubuc J, Duffield TF, Leslie KE, Walton JS, Leblanc SJ. *Randomized clinical trial of antibiotic and prostaglandin treatments for uterine health and reproductive performance in dairy cows*. J Dairy Sci 2011; 94: 1325-38.

Duncan JR, Wilkie BN, Hiestand F, Winter AJ. *The serum and secretory immunoglobulins of cattle: characterization and quantitation*. J Immunol 1972; 108: 965-76.

Duval K, Grover H, Han LH, Mou Y, Pegoraro AF, Fredberg J, Chen Z. *Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture*. Physiology (Bethesda) 2017; 32: 266-77.

Eltzschig HK, Carmeliet P. *Hypoxia and inflammation*. N Engl J Med 2011; 364: 656-65.

Esposito G, Raffrenato E, Lukamba SD, Adnane M, Irons PC, Cormican P, Tasara T, Chapwanya A. *Characterization of metabolic and inflammatory profiles of transition dairy cows fed an energy-restricted diet.* J Anim Sci 2020; 98: 391.

Evans RJ, Bray J, Childs JD, Vigers GP, Brandhuber BJ, Skalicky JJ, Thompson RC, Eisenberg SP. *Mapping receptor binding sites in interleukin (IL)-1 receptor antagonist and IL-1 beta by site-directed mutagenesis. Identification of a single site in IL-1ra and two sites in IL-1 beta.* J Biol Chem 1995; 270: 11477-83.

Fernandes JC, Martel-Pelletier J, Pelletier JP. *The role of cytokines in osteoarthritis pathophysiology.* Biorheology 2002; 39: 237-46.

Fischer C, Drillich M, Odau S, Heuwieser W, Einspanier R, Gabler C. *Selected pro-inflammatory factor transcripts in bovine endometrial epithelial cells are regulated during the oestrous cycle and elevated in case of subclinical or clinical endometritis.* Reprod Fertil Dev 2010; 22: 818-29.

Fitzgerald AA, Leclercq SA, Yan A, Homik JE, Dinarello CA. *Rapid responses to anakinra in patients with refractory adult-onset Still's disease.* Arthritis Rheum 2005; 52: 1794-803.

Fleige S, Pfaffl MW. *RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance.* Mol Aspects Med 2006; 27: 126-39.

Földi J, Kulcsár M, Pécsi A, Huyghe B, de Sa C, Lohuis JA, Cox P, Huszenicza G. *Bacterial complications of postpartum uterine involution in cattle.* Anim Reprod Sci 2006; 96: 265-81.

Foley C, Chapwanya A, Callanan JJ, Whiston R, Miranda-CasoLuengo R, Lu J, Meijer WG, Lynn DJ, O' Farrelly C, Meade KG. *Integrated analysis of the local and systemic changes preceding the development of post-partum cytological endometritis.* BMC Genomics 2015; 16: 811.

Funeshima N, Tanikawa N, Yaginuma H, Watanabe H, Iwata H, Kuwayama T, Hamano S, Shirasuna K. *Adverse reproductive effects of S100A9 on bovine sperm and early embryonic development in vitro.* PLoS One 2020; 15: e0227885.

Gabay C, Lamacchia C, Palmer G. *IL-1 pathways in inflammation and human diseases.* Nat Rev Rheumatol 2010; 6: 232-41.

Gabler C, Drillich M, Fischer C, Holder C, Heuwieser W, Einspanier R. *Endometrial expression of selected transcripts involved in prostaglandin synthesis in cows with endometritis*. Theriogenology 2009; 71: 993-1004.

Gabler C, Fischer C, Drillich M, Einspanier R, Heuwieser W. *Time-dependent mRNA expression of selected pro-inflammatory factors in the endometrium of primiparous cows postpartum*. Reprod Biol Endocrinol 2010; 8: 152.

Galvão KN, Frajblat M, Brittin SB, Butler WR, Guard CL, Gilbert RO. *Effect of prostaglandin F2alpha on subclinical endometritis and fertility in dairy cows*. J Dairy Sci 2009a; 92: 4906-13.

Galvão KN, Greco LF, Vilela JM, MF SF, Santos JE. *Effect of intrauterine infusion of ceftiofur on uterine health and fertility in dairy cows*. J Dairy Sci 2009b; 92: 1532-42.

Galvão KN, Santos NR, Galvão JS, Gilbert RO. *Association between endometritis and endometrial cytokine expression in postpartum Holstein cows*. Theriogenology 2011; 76: 290-9.

Garlanda C, Dinarello CA, Mantovani A. *The interleukin-1 family: back to the future*. Immunity 2013; 39: 1003-18.

Gärtner MA, Bondzio A, Braun N, Jung M, Einspanier R, Gabler C. *Detection and characterisation of Lactobacillus spp. in the bovine uterus and their influence on bovine endometrial epithelial cells in vitro*. PLoS One 2015; 10: e0119793.

Gärtner MA, Peter S, Jung M, Drillich M, Einspanier R, Gabler C. *Increased mRNA expression of selected pro-inflammatory factors in inflamed bovine endometrium in vivo as well as in endometrial epithelial cells exposed to Bacillus pumilus in vitro*. Reprod Fertil Dev 2016; 28: 982-94.

Genis S, Sanchez-Chardi A, Bach A, Fabregas F, Aris A. *A combination of lactic acid bacteria regulates Escherichia coli infection and inflammation of the bovine endometrium*. J Dairy Sci 2017; 100: 479-92.

Ghanem ME, Tezuka E, Devkota B, Izaike Y, Osawa T. *Persistence of uterine bacterial infection, and its associations with endometritis and ovarian function in postpartum dairy cows*. J Reprod Dev 2015; 61: 54-60.

Ghasemi F, Gonzalez-Cano P, Griebel PJ, Palmer C. *Proinflammatory cytokine gene expression in endometrial cytobrush samples harvested from cows with and without subclinical endometritis*. Theriogenology 2012; 78: 1538-47.

Gilbert R, Santos N, Galvão K, Brittin S, Roman H. *The relationship between postpartum uterine bacterial infection (BI) and subclinical endometritis (SE)*. J Dairy Sci. 2007; 90 (Suppl 1): 469-70.

Gilbert RO, Shin ST, Guard CL, Erb HN, Frajblat M. *Prevalence of endometritis and its effects on reproductive performance of dairy cows*. Theriogenology 2005; 64: 1879-88.

Glasel JA. *Validity of nucleic acid purities monitored by 260nm/280nm absorbance ratios*. Biotechniques 1995; 18: 62-3.

Glocker EO, Kotlarz D, Boztug K, Gertz EM, Schäffer AA, Noyan F, Perro M, Diestelhorst J, Allroth A, Murugan D, Hätscher N, Pfeifer D, Sykora KW, Sauer M, Kreipe H, Lacher M, Nustede R, Woellner C, Baumann U, Salzer U, Koletzko S, Shah N, Segal AW, Sauerbrey A, Buderus S, Snapper SB, Grimbacher B, Klein C. *Inflammatory bowel disease and mutations affecting the interleukin-10 receptor*. N Engl J Med 2009; 361: 2033-45.

Griffin JF, Hartigan PJ, Nunn WR. *Non-specific uterine infection and bovine fertility. I. Infection patterns and endometritis during the first seven weeks postpartum*. Theriogenology 1974; 1: 91-106.

Guarda G, Braun M, Staehli F, Tardivel A, Mattmann C, Förster I, Farlik M, Decker T, Du Pasquier RA, Romero P, Tschopp J. *Type I interferon inhibits interleukin-1 production and inflammasome activation*. Immunity 2011; 34: 213-23.

Gür S, Doğan N. *The possible role of bovine herpesvirus type-4 infection in cow infertility*. Anim Sci J 2010; 81: 304-8.

Haneda S, Nagaoka K, Nambo Y, Kikuchi M, Nakano Y, Matsui M, Miyake Y, Macleod JN, Imakawa K. *Interleukin-1 receptor antagonist expression in the equine endometrium during the peri-implantation period*. Domest Anim Endocrinol 2009; 36: 209-18.

Hannum CH, Wilcox CJ, Arend WP, Joslin FG, Dripps DJ, Heimdal PL, Armes LG, Sommer A, Eisenberg SP, Thompson RC. *Interleukin-1 receptor antagonist activity of a human interleukin-1 inhibitor*. Nature 1990; 343: 336-40.

Hawkins PN, Lachmann HJ, McDermott MF. *Interleukin-1-receptor antagonist in the Muckle-Wells syndrome*. N Engl J Med 2003; 348: 2583-4.

Helfrich AL (2018) *Uterussektret zur Diagnose der subklinischen Endometritis beim Rind*. Tierärztliche Fakultät, Ludwig-Maximilians-Universität München: Diss. med. vet., <https://edoc.ub.uni-muenchen.de/22816/>.

Helfrich AL, Reichenbach HD, Meyerholz MM, Schoon HA, Arnold GJ, Fröhlich T, Weber F, Zerbe H. *Novel sampling procedure to characterize bovine subclinical endometritis by uterine secretions and tissue*. Theriogenology 2020; 141: 186-96.

Herath S, Fischer DP, Werling D, Williams EJ, Lilly ST, Dobson H, Bryant CE, Sheldon IM. *Expression and function of Toll-like receptor 4 in the endometrial cells of the uterus*. Endocrinology 2006; 147: 562-70.

Herath S, Lilly ST, Santos NR, Gilbert RO, Goetze L, Bryant CE, White JO, Cronin J, Sheldon IM. *Expression of genes associated with immunity in the endometrium of cattle with disparate postpartum uterine disease and fertility*. Reprod Biol Endocrinol 2009; 7: 55.

Hillmer M (2018) *Uterussektret zur Diagnostik und Pathogeneseforschung der chronischen Endometritis beim Rind*. Tierärztliche Fakultät, Ludwig-Maximilians-Universität München: Diss. med. vet., <https://edoc.ub.uni-muenchen.de/22337/>.

Hillmer M, Marth CD, Meyerholz MM, Klaus-Halla D, Schoon HA, Weber F, Schuberth HJ, Zerbe H. *Gene expression in bovine endometrial cells and blood-derived neutrophils stimulated by uterine secretions*. Theriogenology 2020; 157: 458-66.

Hoshino H, Laan M, Sjöstrand M, Lötvall J, Skoogh BE, Linden A. *Increased elastase and myeloperoxidase activity associated with neutrophil recruitment by IL-17 in airways in vivo*. J Allergy Clin Immunol 2000; 105: 143-9.

Huang HY, Krüssel JS, Wen Y, Polan ML. *Use of reverse transcription-polymerase chain reaction to detect embryonic interleukin-1 system messenger RNA in individual preimplantation mouse embryos co-cultured with Vero cells.* Hum Reprod 1997; 12: 1537-44.

Huh D, Hamilton GA, Ingber DE. *From 3D cell culture to organs-on-chips.* Trends Cell Biol 2011; 21: 745-54.

Hurst SM, Wilkinson TS, McLoughlin RM, Jones S, Horiuchi S, Yamamoto N, Rose-John S, Fuller GM, Topley N, Jones SA. *Il-6 and its soluble receptor orchestrate a temporal switch in the pattern of leukocyte recruitment seen during acute inflammation.* Immunity 2001; 14: 705-14.

Hussain AM, Daniel RC, O'Boyle D. *Postpartum uterine flora following normal and abnormal puerperium in cows.* Theriogenology 1990; 34: 291-302.

Ibrahim M, Peter S, Gartner MA, Michel G, Jung M, Einspanier R, Gabler C. *Increased mRNA expression of selected antimicrobial peptides around ovulation and during inflammatory processes in the bovine endometrium postpartum.* Theriogenology 2016; 86: 2040-53.

Iida H, Tohno M, Islam MA, Sato N, Kobayashi H, Albarracin L, Kober AH, Ikeda-Ohtsubo W, Suda Y, Aso H, Nochi T, Miyazaki A, Uenishi H, Iwabuchi N, Xiao JZ, Villena J, Kitazawa H. *Paraimmunobiotic Bifidobacteria Modulate the Expression Patterns of Peptidoglycan Recognition Proteins in Porcine Intestinal Epitheliocytes and Antigen Presenting Cells.* Cells 2019; 8: 891.

Ikemoto M, Murayama H, Itoh H, Totani M, Fujita M. *Intrinsic function of S100A8/A9 complex as an anti-inflammatory protein in liver injury induced by lipopolysaccharide in rats.* Clin Chim Acta 2007; 376: 197-204.

Inchaisri C, Jorritsma R, Vos PL, van der Weijden GC, Hogeveen H. *Economic consequences of reproductive performance in dairy cattle.* Theriogenology 2010; 74: 835-46.

Isailovic N, Daigo K, Mantovani A, Selmi C. *Interleukin-17 and innate immunity in infections and chronic inflammation.* J Autoimmun 2015; 60: 1-11.

Ishigame H, Kakuta S, Nagai T, Kadoki M, Nambu A, Komiyama Y, Fujikado N, Tanahashi Y, Akitsu A, Kotaki H, Sudo K, Nakae S, Sasakawa C, Iwakura Y. *Differential roles of interleukin-17A and -17F in host defense against mucoc epithelial bacterial infection and allergic responses*. Immunity 2009; 30: 108-19.

Jenkins JK, Malyak M, Arend WP. *The effects of interleukin-10 on interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-1 beta production in human monocytes and neutrophils*. Lymphokine Cytokine Res 1994; 13: 47-54.

Jiang K, Chen X, Zhao G, Wu H, Mi J, Qiu C, Peng X, Deng G. *IFN- $\tau$  Plays an Anti-Inflammatory Role in Staphylococcus aureus-Induced Endometritis in Mice Through the Suppression of NF- $\kappa$ B Pathway and MMP9 Expression*. J Interferon Cytokine Res 2017; 37: 81-9.

Jordan M, Otterness IG, Ng R, Gessner A, Röllinghoff M, Beuscher HU. *Neutralization of endogenous IL-6 suppresses induction of IL-1 receptor antagonist*. J Immunol 1995; 154: 4081-90.

Kasimanickam R, Duffield TF, Foster RA, Gartley CJ, Leslie KE, Walton JS, Johnson WH. *Endometrial cytology and ultrasonography for the detection of subclinical endometritis in postpartum dairy cows*. Theriogenology 2004; 62: 9-23.

Kasimanickam RK, Kasimanickam VR, Olsen JR, Jeffress EJ, Moore DA, Kastelic JP. *Associations among serum pro- and anti-inflammatory cytokines, metabolic mediators, body condition, and uterine disease in postpartum dairy cows*. Reprod Biol Endocrinol 2013; 11: 103.

Kaufmann TB, Drillich M, Tenhagen BA, Forderung D, Heuwieser W. *Prevalence of bovine subclinical endometritis 4h after insemination and its effects on first service conception rate*. Theriogenology 2009; 71: 385-91.

Kehl-Fie TE, Chitayat S, Hood MI, Damo S, Restrepo N, Garcia C, Munro KA, Chazin WJ, Skaar EP. *Nutrient metal sequestration by calprotectin inhibits bacterial superoxide defense, enhancing neutrophil killing of Staphylococcus aureus*. Cell Host Microbe 2011; 10: 158-64.

King AE, Fleming DC, Critchley HO, Kelly RW. *Regulation of natural antibiotic expression by inflammatory mediators and mimics of infection in human endometrial epithelial cells*. Mol Hum Reprod 2002; 8: 341-9.

Koujan A, Eissa HM, Hussein MA, Ayoub MM, Afiefy MM. *Therapeutic efficacy of povidone-iodine (Betadine) and dichloroxylenol (Septocid) in Holstein cows affected with endometritis and/or cervicitis*. Acta Vet Hung 1996; 44: 111-9.

Kreines FM, Nasioudis D, Minis E, Irani M, Witkin SS, Spandorfer S. *IL-1 $\beta$  predicts IVF outcome: a prospective study*. J Assist Reprod Genet 2018; 35: 2031-5.

Kwak A, Lee Y, Kim H, Kim S. *Intracellular interleukin (IL)-1 family cytokine processing enzyme*. Arch Pharm Res 2016; 39: 1556-64.

Laan M, Cui ZH, Hoshino H, Lötvall J, Sjöstrand M, Gruenert DC, Skoogh BE, Lindén A. *Neutrophil recruitment by human IL-17 via C-X-C chemokine release in the airways*. J Immunol 1999; 162: 2347-52.

Lackmann M, Cornish CJ, Simpson RJ, Moritz RL, Geczy CL. *Purification and structural analysis of a murine chemotactic cytokine (CP-10) with sequence homology to S100 proteins*. J Biol Chem 1992; 267: 7499-504.

LeBlanc SJ, Duffield TF, Leslie KE, Bateman KG, Keefe GP, Walton JS, Johnson WH. *Defining and diagnosing postpartum clinical endometritis and its impact on reproductive performance in dairy cows*. J Dairy Sci 2002a; 85: 2223-36.

LeBlanc SJ, Duffield TF, Leslie KE, Bateman KG, Keefe GP, Walton JS, Johnson WH. *The effect of treatment of clinical endometritis on reproductive performance in dairy cows*. J Dairy Sci 2002b; 85: 2237-49.

LeBlanc SJ. *Reproductive tract inflammatory disease in postpartum dairy cows*. Animal 2014; 8 Suppl 1: 54-63.

Ledgard AM, Smolenski GA, Henderson H, Lee RS. *Influence of pathogenic bacteria species present in the postpartum bovine uterus on proteome profiles*. Reprod Fertil Dev 2015; 27: 395-406.

Lee SC, Jeong JK, Choi IS, Kang HG, Jung YH, Park SB, Kim IH. *Cytological endometritis in dairy cows: diagnostic threshold, risk factors, and impact on reproductive performance*. J Vet Sci 2018; 19: 301-8.

Lefebvre RC, Stock AE. *Therapeutic efficiency of antibiotics and prostaglandin F2 $\alpha$  in postpartum dairy cows with clinical endometritis: an evidence-based evaluation*. Vet Clin North Am Food Anim Pract 2012; 28: 79-96, ix.

Li B, Smith TJ. *Divergent expression of IL-1 receptor antagonists in CD34<sup>+</sup> fibrocytes and orbital fibroblasts in thyroid-associated ophthalmopathy: contribution of fibrocytes to orbital inflammation*. J Clin Endocrinol Metab 2013; 98: 2783-90.

Lietaer L, Bogado Pascottini O, Hernandez-Sanabria E, Kerckhof FM, Lacoere T, Boon N, Vlaminck L, Opsomer G, Van de Wiele T. *Low microbial biomass within the reproductive tract of mid-lactation dairy cows: A study approach*. J Dairy Sci 2021; 104: 6159-74.

Linn T, Schmitz J, Hauck-Schmalenberger I, Lai Y, Bretzel RG, Brandhorst H, Brandhorst D. *Ischaemia is linked to inflammation and induction of angiogenesis in pancreatic islets*. Clin Exp Immunol 2006; 144: 179-87.

Liu M, Wu Q, Wang M, Fu Y, Wang J. *Lactobacillus rhamnosus GR-1 Limits Escherichia coli-Induced Inflammatory Responses via Attenuating MyD88-Dependent and MyD88-Independent Pathway Activation in Bovine Endometrial Epithelial Cells*. Inflammation 2016; 39: 1483-94.

MacKintosh SB, Schuberth HJ, Healy LL, Sheldon IM. *Polarised bovine endometrial epithelial cells vectorially secrete prostaglandins and chemotactic factors under physiological and pathological conditions*. Reproduction 2013; 145: 57-72.

Madoz LV, Giuliadori MJ, Jaureguiberry M, Plöntzke J, Drillich M, de la Sota RL. *The relationship between endometrial cytology during estrous cycle and cutoff points for the diagnosis of subclinical endometritis in grazing dairy cows*. J Dairy Sci 2013; 96: 4333-9.

- Madoz LV, Giuliadori MJ, Migliorisi AL, Jaureguiberry M, de la Sota RL. *Endometrial cytology, biopsy, and bacteriology for the diagnosis of subclinical endometritis in grazing dairy cows*. J Dairy Sci 2014; 97: 195-201.
- Malinowski E, Lassa H, Markiewicz H, Kaptur M, Nadolny M, Niewitecki W, Ziętara J. *Sensitivity to antibiotics of Arcanobacterium pyogenes and Escherichia coli from the uteri of cows with metritis/endometritis*. Vet J 2011; 187: 234-8.
- Manríquez D, Velez J, Pinedo PJ. *Incidence and risk factors for reproductive disorders in organic certified dairies*. J Dairy Sci 2020; 103: 10797-808.
- Masera J, Gustafsson BK, Afiefy MM, Stowe CM, Bergt GP. *Disposition of oxytetracycline in the bovine genital tract: systemic vs intrauterine administration*. J Am Vet Med Assoc 1980; 176: 1099-102.
- Mathew DJ, Sanchez JM, Passaro C, Charpigny G, Behura SK, Spencer TE, Lonergan P. *Interferon tau-dependent and independent effects of the bovine conceptus on the endometrial transcriptome*. Biol Reprod 2018; 100: 365-380.
- McGroarty JA, Reid G. *Detection of a Lactobacillus substance that inhibits Escherichia coli*. Can J Microbiol 1988; 34: 974-8.
- Melcher Y, Prunner I, Drillich M. *Degree of variation and reproducibility of different methods for the diagnosis of subclinical endometritis*. Theriogenology 2014; 82: 57-63.
- Melendez P, McHale J, Bartolome J, Archbald LF, Donovan GA. *Uterine involution and fertility of holstein cows subsequent to early postpartum PGF2alpha treatment for acute puerperal metritis*. J Dairy Sci 2004; 87: 3238-46.
- Mido S, Murata N, Rawy MS, Kitahara G, Osawa T. *Effects of intrauterine infusion of povidone-iodine on endometrial cytology and bacteriology in dairy cows with clinical endometritis*. J Vet Med Sci 2016; 78: 551-6.
- Miller HV, Kimsey PB, Kendrick JW, Darien B, Doering L, Franti C, Horton J. *Endometritis of dairy cattle*. The Bovine Practitioner 1980; 15: 13-23.

Molteni M, Rossetti C. *Toll-Like Receptor 4 Activation by Damage-Associated Molecular Patterns (DAMPs)*. In: *The Role of Toll-Like Receptor 4 in Infectious and Non Infectious Inflammation*: Springer 2021: 93-103.

Montazeri M, Sanchez-Lopez JA, Caballero I, Maslehat Lay N, Elliott S, Fazeli A. *Interleukin-1 receptor antagonist mediates toll-like receptor 3-induced inhibition of trophoblast adhesion to endometrial cells in vitro*. *Hum Reprod* 2016; 31: 2098-107.

Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. *Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor*. *Annu Rev Immunol* 2001; 19: 683-765.

Nadeau-Vallée M, Obari D, Palacios J, Brien M, Duval C, Chemtob S, Girard S. *Sterile inflammation and pregnancy complications: a review*. *Reproduction* 2016; 152: R277-r92.

Nair RR, Khanna A, Singh K. *Association of interleukin 1 receptor antagonist (IL1RN) gene polymorphism with recurrent pregnancy loss risk in the North Indian Population and a meta-analysis*. *Mol Biol Rep* 2014; 41: 5719-27.

Nair RR, Khanna A, Singh K. *Association of increased S100A8 serum protein with early pregnancy loss*. *Am J Reprod Immunol* 2015; 73: 91-4.

Nak Y, Dagalp SB, Cetin C, Nak D, Alkan F, Borum E, Tuna B. *Course and severity of postpartum metritis cases following antibiotic and PGF2 $\alpha$  administration in postpartum metritis cows infected with BoHV-4*. *Transbound Emerg Dis* 2011; 58: 31-6.

Neuvians TP, Schams D, Berisha B, Pfaffl MW. *Involvement of pro-inflammatory cytokines, mediators of inflammation, and basic fibroblast growth factor in prostaglandin F2 $\alpha$ -induced luteolysis in bovine corpus luteum*. *Biol Reprod* 2004; 70: 473-80.

Oliveira LJ, Mansouri-Attia N, Fahey AG, Browne J, Forde N, Roche JF, Lonergan P, Fair T. *Characterization of the Th profile of the bovine endometrium during the oestrous cycle and early pregnancy*. *PLoS One* 2013; 8: e75571.

Park JS, Gamboni-Robertson F, He Q, Svetkauskaite D, Kim JY, Strassheim D, Sohn JW, Yamada S, Maruyama I, Banerjee A, Ishizaka A, Abraham E. *High mobility group box 1 protein interacts with multiple Toll-like receptors*. Am J Physiol Cell Physiol 2006; 290: C917-24.

Pascal N, Olivier Basole K, Claire d'Andre H, Bockline Omedo B. *Risk factors associated with endometritis in zero-grazed dairy cows on smallholder farms in Rwanda*. Prev Vet Med 2021; 188: 105252.

Pascottini OB, Dini P, Hostens M, Ducatelle R, Opsomer G. *A novel cytologic sampling technique to diagnose subclinical endometritis and comparison of staining methods for endometrial cytology samples in dairy cows*. Theriogenology 2015; 84: 1438-46.

Pascottini OB, Hostens M, Dini P, Vandepitte J, Ducatelle R, Opsomer G. *Comparison between cytology and histopathology to evaluate subclinical endometritis in dairy cows*. Theriogenology 2016; 86: 1550-6.

Pascottini OB, Hostens M, Sys P, Vercauteren P, Opsomer G. *Cytological endometritis at artificial insemination in dairy cows: Prevalence and effect on pregnancy outcome*. J Dairy Sci 2017a; 100: 588-97.

Pascottini OB, Hostens M, Sys P, Vercauteren P, Opsomer G. *Risk factors associated with cytological endometritis diagnosed at artificial insemination in dairy cows*. Theriogenology 2017b; 92: 1-5.

Pascottini OBA, Opsomer G. *Postpartum uterine diseases in dairy cows: a review with emphasis on subclinical endometritis*. Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift 2016; 85: 378-85.

Pascual V, Allantaz F, Arce E, Punaro M, Banchereau J. *Role of interleukin-1 (IL-1) in the pathogenesis of systemic onset juvenile idiopathic arthritis and clinical response to IL-1 blockade*. J Exp Med 2005; 201: 1479-86.

Paula-Lopes FF, de Moraes AA, Hansen PJ. *The presence of interleukin-1beta in the bovine reproductive tract*. J Interferon Cytokine Res 1999; 19: 279-85.

Peng Y, Wang Y, Hang S, Zhu W. *Microbial diversity in uterus of healthy and metritic postpartum Holstein dairy cows*. Folia Microbiol (Praha) 2013; 58: 593-600.

Peter S, Gartner MA, Michel G, Ibrahim M, Klopffleisch R, Lubke-Becker A, Jung M, Einspanier R, Gabler C. *Influence of intrauterine administration of Lactobacillus buchneri on reproductive performance and pro-inflammatory endometrial mRNA expression of cows with subclinical endometritis*. Sci Rep 2018; 8: 5473.

Piccioli P, Rubartelli A. *The secretion of IL-1 $\beta$  and options for release*. Semin Immunol 2013; 25: 425-9.

Pleticha S, Drillich M, Heuwieser W. *Evaluation of the Metrichheck device and the gloved hand for the diagnosis of clinical endometritis in dairy cows*. J Dairy Sci 2009; 92: 5429-35.

Plöntzke J, Madoz LV, De la Sota RL, Drillich M, Heuwieser W. *Subclinical endometritis and its impact on reproductive performance in grazing dairy cattle in Argentina*. Anim Reprod Sci 2010; 122: 52-7.

Pluta K, McGettigan PA, Reid CJ, Browne JA, Irwin JA, Tharmalingam T, Corfield A, Baird A, Loftus BJ, Evans AC, Carrington SD. *Molecular aspects of mucin biosynthesis and mucus formation in the bovine cervix during the periestrus period*. Physiol Genomics 2012; 44: 1165-78.

Polat B, Cengiz M, Cannazik O, Colak A, Oruc E, Altun S, Salar S, Bastan A. *Endometrial echotexture variables in postpartum cows with subclinical endometritis*. Anim Reprod Sci 2015; 155: 50-5.

Priest NV, McDougall S, Burke CR, Roche JR, Mitchell M, McLeod KL, Greenwood SL, Meier S. *The responsiveness of subclinical endometritis to a nonsteroidal antiinflammatory drug in pasture-grazed dairy cows*. J Dairy Sci 2013; 96: 4323-32.

Raheel I, Hassan WH, Salem SSR, Salam HSH. *Biofilm forming potentiality of Escherichia coli isolated from bovine endometritis and their antibiotic resistance profiles*. J Adv Vet Anim Res 2020; 7: 442-51.

Ramirez-Garzon HO (2017), *Effect of endometrial biopsy on uterine health in tropically adapted beef cattle*. School of Veterinary Science, The University of Queensland Australia: Diss. med. vet., <https://espace.library.uq.edu.au/view/UQ:692887>.

Ravi M, Paramesh V, Kaviya SR, Anuradha E, Solomon FD. *3D cell culture systems: advantages and applications*. J Cell Physiol 2015; 230: 16-26.

Rilanto T, Reimus K, Orro T, Emanuelson U, Viltrop A, Mõtus K. *Culling reasons and risk factors in Estonian dairy cows*. BMC Vet Res 2020; 16: 173.

Roberts RM, Ealy AD, Alexenko AP, Han CS, Ezashi T. *Trophoblast interferons*. Placenta 1999; 20: 259-64.

Roberts RM. *Interferon-tau, a Type I interferon involved in maternal recognition of pregnancy*. Cytokine Growth Factor Rev 2007; 18: 403-8.

Roelofs MF, Boelens WC, Joosten LA, Abdollahi-Roodsaz S, Geurts J, Wunderink LU, Schreurs BW, van den Berg WB, Radstake TR. *Identification of small heat shock protein B8 (HSP22) as a novel TLR4 ligand and potential involvement in the pathogenesis of rheumatoid arthritis*. J Immunol 2006; 176: 7021-7.

Rohan LC, Edwards RP, Kelly LA, Colenello KA, Bowman FP, Crowley-Nowick PA. *Optimization of the weck-Cel collection method for quantitation of cytokines in mucosal secretions*. Clin Diagn Lab Immunol 2000; 7: 45-8.

Romero R, Brody DT, Oyarzun E, Mazor M, Wu YK, Hobbins JC, Durum SK. *Infection and labor. III. Interleukin-1: a signal for the onset of parturition*. Am J Obstet Gynecol 1989; 160: 1117-23.

Runciman DJ, Anderson GA, Malmo J. *Comparison of two methods of detecting purulent vaginal discharge in postpartum dairy cows and effect of intrauterine cephalosporin on reproductive performance*. Aust Vet J 2009; 87: 369-78.

Russell WMS, Burch RL (1959) *The principles of humane experimental technique*. Methuen & CO LTD, London.

Ryckman C, Vandal K, Rouleau P, Talbot M, Tessier PA. *Proinflammatory activities of S100: proteins S100A8, S100A9, and S100A8/A9 induce neutrophil chemotaxis and adhesion*. J Immunol 2003; 170: 3233-42.

Sahl HG, Pag U, Bonness S, Wagner S, Antcheva N, Tossi A. *Mammalian defensins: structures and mechanism of antibiotic activity*. J Leukoc Biol 2005; 77: 466-75.

Salasel B, Mokhtari A, Taktaz T. *Prevalence, risk factors for and impact of subclinical endometritis in repeat breeder dairy cows*. Theriogenology 2010; 74: 1271-8.

Salvi V, Vaira X, Gianello V, Vermi W, Bugatti M, Sozzani S, Bosisio D. *TLR Signalling Pathways Diverge in Their Ability to Induce PGE2*. Mediators Inflamm 2016; 2016: 5678046.

Samuel CE. *Antiviral actions of interferons*. Clin Microbiol Rev 2001; 14: 778-809.

Santos N. *The use of leukocyte esterase reagent strips for diagnosis of subclinical endometritis in dairy cows*. Theriogenology 2006; 66: 666-7.

Saut JP, Healey GD, Borges AM, Sheldon IM. *Ovarian steroids do not affect bovine endometrial cytokine or chemokine responses to Escherichia coli or LPS in vitro*. Reproduction 2014; 148: 593-606.

Schabmeyer ST, Kneidl AM, Schneider JK, Kirsch S, Zablotzki Y, Petzl W, Weber F, Zerbe H, Meyerholz MM. *Concentration-Dependent Type 1 Interferon-Induced Regulation of MX1 and FABP3 in Bovine Endometrial Explants*. Animals (Basel) 2021; 11: 262.

Schäfer WR, Fischer L, Roth K, Jüllig AK, Stuckenschneider JE, Schwartz P, Weimer M, Orłowska-Volk M, Hanjalic-Beck A, Kranz I, Deppert WR, Zahradnik HP. *Critical evaluation of human endometrial explants as an ex vivo model system: a molecular approach*. Mol Hum Reprod 2011; 17: 255-65.

Shalloo L, Cromie A, McHugh N. *Effect of fertility on the economics of pasture-based dairy systems*. Animal 2014; 8 Suppl 1: 222-31.

Sheldon IM, Lewis GS, LeBlanc S, Gilbert RO. *Defining postpartum uterine disease in cattle*. Theriogenology 2006; 65: 1516-30.

Sheldon IM, Cronin J, Goetze L, Donofrio G, Schuberth HJ. *Defining postpartum uterine disease and the mechanisms of infection and immunity in the female reproductive tract in cattle*. Biol Reprod 2009a; 81: 1025-32.

Sheldon IM, Price SB, Cronin J, Gilbert RO, Gadsby JE. *Mechanisms of infertility associated with clinical and subclinical endometritis in high producing dairy cattle*. Reprod Domest Anim 2009b; 44 Suppl 3: 1-9.

Sheldon IM, Cronin JG, Healey GD, Gabler C, Heuwieser W, Strey D, Bromfield JJ, Miyamoto A, Fergani C, Dobson H. *Innate immunity and inflammation of the bovine female reproductive tract in health and disease*. Reproduction 2014; 148: R41-51.

Sheldon IM, Cronin JG, Bromfield JJ. *Tolerance and Innate Immunity Shape the Development of Postpartum Uterine Disease and the Impact of Endometritis in Dairy Cattle*. Annu Rev Anim Biosci 2019; 7: 361-84.

Sheth KV, Roca GL, al-Sedairy ST, Parhar RS, Hamilton CJ, al-Abdul Jabbar F. *Prediction of successful embryo implantation by measuring interleukin-1-alpha and immunosuppressive factor(s) in preimplantation embryo culture fluid*. Fertil Steril 1991; 55: 952-7.

Simón C, Frances A, Piquette G, Hendrickson M, Milki A, Polan ML. *Interleukin-1 system in the materno-trophoblast unit in human implantation: immunohistochemical evidence for autocrine/paracrine function*. J Clin Endocrinol Metab 1994a; 78: 847-54.

Simón C, Frances A, Piquette GN, el Danasouri I, Zurawski G, Dang W, Polan ML. *Embryonic implantation in mice is blocked by interleukin-1 receptor antagonist*. Endocrinology 1994b; 134: 521-8.

Simón C, Valbuena D, Krüssel J, Bernal A, Murphy CR, Shaw T, Pellicer A, Polan ML. *Interleukin-1 receptor antagonist prevents embryonic implantation by a direct effect on the endometrial epithelium*. Fertil Steril 1998; 70: 896-906.

Sims JE, March CJ, Cosman D, Widmer MB, MacDonald HR, McMahan CJ, Grubin CE, Wignall JM, Jackson JL, Call SM, et al. *cDNA expression cloning of the IL-1 receptor, a member of the immunoglobulin superfamily*. Science 1988; 241: 585-9.

Singh J, Murray RD, Mshelia G, Woldehiwet Z. *The immune status of the bovine uterus during the peripartum period*. Vet J 2008; 175: 301-9.

Smeeckens SP, Gresnigt MS, Becker KL, Cheng SC, Netea SA, Jacobs L, Jansen T, van de Veerdonk FL, Williams DL, Joosten LA, Dinarello CA, Netea MG. *An anti-inflammatory property of Candida albicans  $\beta$ -glucan: Induction of high levels of interleukin-1 receptor antagonist via a Dectin-1/CR3 independent mechanism*. Cytokine 2015; 71: 215-22.

Smith BI, Risco C. *Predisposing factors and potential causes of postpartum metritis in dairy cattle*. COMPEL 2002; 24: 74-80.

Sroussi HY, Berline J, Palefsky JM. *Oxidation of methionine 63 and 83 regulates the effect of S100A9 on the migration of neutrophils in vitro*. J Leukoc Biol 2007; 81: 818-24.

Stojkov J, von Keyserlingk MA, Marchant-Forde JN, Weary DM. *Assessment of visceral pain associated with metritis in dairy cows*. J Dairy Sci 2015; 98: 5352-61.

Sunahori K, Yamamura M, Yamana J, Takasugi K, Kawashima M, Yamamoto H, Chazin WJ, Nakatani Y, Yui S, Makino H. *The S100A8/A9 heterodimer amplifies proinflammatory cytokine production by macrophages via activation of nuclear factor kappa B and p38 mitogen-activated protein kinase in rheumatoid arthritis*. Arthritis Res Ther 2006; 8: R69.

Swangchan-Uthai T, Lavender CR, Cheng Z, Fouladi-Nashta AA, Wathes DC. *Time course of defense mechanisms in bovine endometrium in response to lipopolysaccharide*. Biol Reprod 2012; 87: 135.

Swangchan-Uthai T, Chen Q, Kirton SE, Fenwick MA, Cheng Z, Patton J, Fouladi-Nashta AA, Wathes DC. *Influence of energy balance on the antimicrobial peptides S100A8 and S100A9 in the endometrium of the post-partum dairy cow.* *Reproduction* 2013; 145: 527-39.

Tanai S, Endo N, Tanaka T. *Quantifying the C-reactive protein concentrations of uterine lavage samples in postpartum dairy cows.* *Anim Reprod Sci* 2020; 217: 106455.

Tarlow JK, Blakemore AI, Lennard A, Solari R, Hughes HN, Steinkasserer A, Duff GW. *Polymorphism in human IL-1 receptor antagonist gene intron 2 is caused by variable numbers of an 86-bp tandem repeat.* *Hum Genet* 1993; 91: 403-4.

Thornberry NA, Bull HG, Calaycay JR, Chapman KT, Howard AD, Kostura MJ, Miller DK, Molineaux SM, Weidner JR, Aunins J, et al. *A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes.* *Nature* 1992; 356: 768-74.

Tidbury FD, Langhart A, Weidlinger S, Stute P. *Non-antibiotic treatment of bacterial vaginosis-a systematic review.* *Arch Gynecol Obstet* 2021; 303: 37-45.

Tominaga H, Ishiyama M, Ohseto F, Sasamoto K, Hamamoto T, Suzuki K, Watanabe M. *A water-soluble tetrazolium salt useful for colorimetric cell viability assay.* *Analytical Communications* 1999; 36: 47-50.

Towne JE, Renshaw BR, Douangpanya J, Lipsky BP, Shen M, Gabel CA, Sims JE. *Interleukin-36 (IL-36) ligands require processing for full agonist (IL-36 $\alpha$ , IL-36 $\beta$ , and IL-36 $\gamma$ ) or antagonist (IL-36Ra) activity.* *J Biol Chem* 2011; 286: 42594-602.

Tribe RM, Moriarty P, Dalrymple A, Hassoni AA, Poston L. *Interleukin-1beta induces calcium transients and enhances basal and store operated calcium entry in human myometrial smooth muscle.* *Biol Reprod* 2003; 68: 1842-9.

Turner ML, Cronin JG, Healey GD, Sheldon IM. *Epithelial and stromal cells of bovine endometrium have roles in innate immunity and initiate inflammatory responses to bacterial lipopeptides in vitro via Toll-like receptors TLR2, TLR1, and TLR6.* Endocrinology 2014; 155: 1453-65.

van de Veerdonk FL, Stoeckman AK, Wu G, Boeckermann AN, Azam T, Netea MG, Joosten LA, van der Meer JW, Hao R, Kalabokis V, Dinarello CA. *IL-38 binds to the IL-36 receptor and has biological effects on immune cells similar to IL-36 receptor antagonist.* Proc Natl Acad Sci U S A 2012; 109: 3001-5.

van Lent PL, Grevers LC, Schelbergen R, Blom A, Geurts J, Sloetjes A, Vogl T, Roth J, van den Berg WB. *S100A8 causes a shift toward expression of activatory Fcγ receptors on macrophages via toll-like receptor 4 and regulates Fcγ receptor expression in synovium during chronic experimental arthritis.* Arthritis Rheum 2010; 62: 3353-64.

van Mourik MS, Macklon NS, Heijnen CJ. *Embryonic implantation: cytokines, adhesion molecules, and immune cells in establishing an implantation environment.* J Leukoc Biol 2009; 85: 4-19.

Van Schyndel SJ, Bogado Pascottini O, LeBlanc SJ. *Comparison of cow-side diagnostic techniques for subclinical endometritis in dairy cows.* Theriogenology 2018; 120: 117-22.

Velraeds MM, van de Belt-Gritter B, van der Mei HC, Reid G, Busscher HJ. *Interference in initial adhesion of uropathogenic bacteria and yeasts to silicone rubber by a Lactobacillus acidophilus biosurfactant.* J Med Microbiol 1998; 47: 1081-5.

Vogel V, Sheetz M. *Local force and geometry sensing regulate cell functions.* Nat Rev Mol Cell Biol 2006; 7: 265-75.

Vogl T, Tenbrock K, Ludwig S, Leukert N, Ehrhardt C, van Zoelen MA, Nacken W, Foell D, van der Poll T, Sorg C, Roth J. *Mrp8 and Mrp14 are endogenous activators of Toll-like receptor 4, promoting lethal, endotoxin-induced shock.* Nat Med 2007; 13: 1042-9.

- Wagener K, Prunner I, Pothmann H, Drillich M, Ehling-Schulz M. *Diversity and health status specific fluctuations of intrauterine microbial communities in postpartum dairy cows*. Vet Microbiol 2015; 175: 286-93.
- Wagener K, Gabler C, Drillich M. *A review of the ongoing discussion about definition, diagnosis and pathomechanism of subclinical endometritis in dairy cows*. Theriogenology 2017a; 94: 21-30.
- Wagener K, Pothmann H, Prunner I, Peter S, Erber R, Aurich C, Drillich M, Gabler C. *Endometrial mRNA expression of selected pro-inflammatory factors and mucins in repeat breeder cows with and without subclinical endometritis*. Theriogenology 2017b; 90: 237-44.
- Wang H, Dey SK. *Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models*. Nat Rev Genet 2006; 7: 185-99.
- Wathes DC, Cheng Z, Chowdhury W, Fenwick MA, Fitzpatrick R, Morris DG, Patton J, Murphy JJ. *Negative energy balance alters global gene expression and immune responses in the uterus of postpartum dairy cows*. Physiol Genomics 2009; 39: 1-13.
- Watson ED, Diehl NK, Evans JF. *Antibody response in the bovine genital tract to intrauterine infusion of Actinomyces pyogenes*. Res Vet Sci 1990; 48: 70-5.
- Williams EJ, Fischer DP, Pfeiffer DU, England GC, Noakes DE, Dobson H, Sheldon IM. *Clinical evaluation of postpartum vaginal mucus reflects uterine bacterial infection and the immune response in cattle*. Theriogenology 2005; 63: 102-17.
- Williams TJ. *Prostaglandin E2, prostaglandin I2 and the vascular changes of inflammation*. Br J Pharmacol 1979; 65: 517-24.
- Woodward EM, Christoffersen M, Campos J, Betancourt A, Horohov D, Scoggin KE, Squires EL, Troedsson MH. *Endometrial inflammatory markers of the early immune response in mares susceptible or resistant to persistent breeding-induced endometritis*. Reproduction 2013; 145: 289-96.

Wu X, Kitahara G, Suenaga T, Naramoto K, Sekiguchi S, Goto Y, Osawa T. *Association of intrauterine presence of Lactobacillus spp. with inflammation and pathogenic bacteria in the uterus in postpartum dairy cows.* J Reprod Dev 2021; 67: 340-4.

Yazdi AS, Ghoreschi K. *The Interleukin-1 Family.* Adv Exp Med Biol 2016; 941: 21-9.

Yoshida R, Kitahara G, Osawa T. *Intrauterine infusion of povidone-iodine: Its effect on the endometrium and subsequent fertility in postpartum dairy cows.* J Vet Med Sci 2020; 82: 926-34.

Zerbe H, Schuberth HJ, Engelke F, Frank J, Klug E, Leibold W. *Development and comparison of in vivo and in vitro models for endometritis in cows and mares.* Theriogenology 2003; 60: 209-23.

Zhang H, Wu ZM, Yang YP, Shaikat A, Yang J, Guo YF, Zhang T, Zhu XY, Qiu JX, Deng GZ, Shi DM. *Catalpol ameliorates LPS-induced endometritis by inhibiting inflammation and TLR4/NF- $\kappa$ B signaling.* J Zhejiang Univ Sci B 2019; 20: 816-27.

Zhang S, Yang F, Oguejiofor CF, Wang D, Dong S, Yan Z. *Endometrial expression of the acute phase molecule SAA is more significant than HP in reflecting the severity of endometritis.* Res Vet Sci 2018; 121: 130-3.

Zlatska AV, Rodnichenko AE, Gubar OS, Zubov DO, Novikova SN, Vasyliiev RG. *Endometrial stromal cells: isolation, expansion, morphological and functional properties.* Exp Oncol 2017; 39: 197-202.

## IX. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1:	Darstellung der Explantgewinnung. ....	30
Abbildung 2:	Darstellung des Plattenlayouts für die Explantkultur. ....	33
Abbildung 3:	Darstellung der Elektropherogramme und des virtuellen Gels zweier RNA-Proben. ....	37
Abbildung 4:	Verwendete Bestandteile des „Uterus-Probenentnahmegärts München“.....	42
Abbildung 5:	Schematische Darstellung des Einführens des Merocel- Schwämmchens durch den Arbeitskanal. ....	43
Abbildung 6:	Schematische Darstellung des AlphaLISA-Prinzips. ....	47
Abbildung 7:	Beispielhafte Darstellung eines Boxplot-Diagramms.....	53
Abbildung 8:	Analyse der Stoffwechselaktivität der Explants mittels WST-8- Reduktionsmessung. ....	57
Abbildung 9:	Verlauf der Standardkurve des etablierten AlphaLISA für IL1RA mit 95 %-Konfidenzintervall. ....	63
Abbildung 10:	Darstellung der Intra-Assay-Variation des etablierten AlphaLISA für IL1RA anhand der eingesetzten Standardpunkte.....	64
Abbildung 11:	Darstellung der Wiederfindungsrate des etablierten AlphaLISA für IL1RA. ....	65
Abbildung 12:	Genexpression von IL1B in endometrialen Explants nach Koinkubation mit hitzeinaktivierten Bakterien.....	69
Abbildung 13:	Genexpression von IL1RA in endometrialen Explants nach Koinkubation mit hitzeinaktivierten Bakterien.....	70
Abbildung 14:	IL1RA/IL1B-Verhältnis auf Genexpressionsebene in endometrialen Explants nach Koinkubation mit hitzeinaktivierten Bakterien. ....	71
Abbildung 15:	Genexpression von IL1B und IL1RA sowie IL1RA/IL1B- Verhältnis auf Genexpressionsebene in endometrialen Explants nach Koinkubation mit rekombinanten bovinen Zytokinen. ....	73
Abbildung 16:	Proteinkonzentration von IL1B und IL1RA sowie das IL1RA/IL1B-Verhältnis in bovinen Uterussekretproben. ....	76

---

Abbildung 17: Vorlage zur Dokumentation von Tier- und Organeigenschaften, Uhrzeiten und Arbeitsschritten bei der Gewinnung von Explants und Uterussekret .....	137
--	-----

**X. TABELLENVERZEICHNIS**

Tabelle 1:	Zusammensetzungen bei der Koinkubation der Explants.....	31
Tabelle 2:	Verteilung der qPCR-Ergebnisse der –RT-Kontrollen und mittlere Konzentrationen von –RT-Kontrollen und niedrigstem Standardpunkt. ....	60
Tabelle 3:	Spezifikation der Primer für die qPCR. ....	141
Tabelle 4:	Statistische Auswertung (p-Werte): Vergleich des Einflusses der eingesetzten Bakterien auf die Genexpression von IL1B und IL1RA sowie auf das IL1RA/IL1B-Verhältnis auf Genexpressionsebene in endometrialen Explants aus 26 Schlachtorganen. ....	151
Tabelle 5:	Statistische Auswertung (p-Werte): Vergleich des Einflusses der eingesetzten Zytokine auf die Genexpression von IL1B und IL1RA sowie auf das IL1RA/IL1B-Verhältnis auf Genexpressionsebene in endometrialen Explants aus 26 Schlachtorganen. ....	152
Tabelle 6:	Proteinkonzentrationen von IL1B und IL1RA sowie IL1RA/IL1B-Verhältnis in Uterussekretproben. ....	153
Tabelle 7:	Statistische Auswertung (p-Werte): Vergleich der Proteinkonzentrationen von IL1B und IL1RA sowie deren Konzentrationsverhältnis in bovinen Uterussekretproben. ....	154

## **XI. ANHANG**

### **1. Verwendete Geräte, Instrumente, Materialien und Reagenzien**

#### **1.1. Für verschiedene Untersuchungen verwendete Geräte, Instrumente, Materialien und Reagenzien**

##### **1.1.1. Für verschiedene Untersuchungen verwendete Geräte**

Autoklav D-65	Systemec, Linden
Eismaschine RF0266A	The Manitowoc Company, Manitowoc (USA)
Gefrierzelle Iridium 800 (-80 °C)	Angelantoni Lifescience, Massa Martana (Italien)
Kühl-Gefrier-Kombination KGE58	Robert Bosch Haushaltsge- räte GmbH, München
Magnetrührer M6	Ingenieurbüro CAT, M. Zipperer GmbH, Staufen
Microplate Reader CLARIOstar, Photometer mit Laseraufrüstung für AlphaScreen/AlphaLISA/ AlphaPlex	BMG Labtech, Ortenberg
NanoPhotometer Pearl, ab 0,3 µl Probenvolumen	Implen, München
Pipetten, einstellbar und zugehörige Pipettenspitzen	Brand, Wertheim
Pipettierhilfe accu-jet und serologische Pipetten	Brand, Wertheim
Präzisionswaage SBC22 mit Gehäuse	Scaltec Instruments, Heili- genstadt
Reinstwassersystem GenPure	TKA, Niederelbert
Schüttler RS-VA10	Phoenix Instrument, Garb- sen
Sterilwerkbank Biowizard Golden Line	Kojair, Vilppula (Finnland)

Umluft-Labortiefkühlschrank BioCompact II RF 410	Gram BioLine, Vojens (Dänemark)
Wasserbad WBU45	Memmert, Schwabach
Zentrifuge Biofuge pico (bis 14.000 x g)	Heraeus, Hanau
Zentrifuge myFUGE Mini für 0,2 ml Reaktionsgefäße	Biozym, Hessisch Oldendorf
Zentrifuge Universal 32 R	Hettich, Tuttlingen

### 1.1.2. Für verschiedene Untersuchungen verwendete Instrumente

Pinzetten, anatomisch	Carl Roth, Karlsruhe
Pinzetten, anatomisch, spitz	Carl Roth, Karlsruhe
Pinzetten, chirurgisch	Aesculap, Tuttlingen
Scheren	Carl Roth, Karlsruhe
Skalpellhalter	Carl Roth, Karlsruhe
Skalpellklingen Typ 15	Carl Roth, Karlsruhe

### 1.1.3. Für verschiedene Untersuchungen verwendete Materialien

Aluminiumfolie	Carl Roth, Karlsruhe
Einmal-Kanülen BD Microlance 3, 18G	Becton Dickinson, Drogheda (Irland)
Einmal-Untersuchungshandschuhe Nitril Next Gen	Meditrade, Kiefersfelden
Glasflaschen 100 bis 1.000 ml	Duran Group, Wertheim
Mikro-Schraubröhrchen 0,5 ml Polypropylen	Sarstedt, Nümbrecht
Mikroröhrchen 1,5 ml	4titude, Wotton (UK)
Steriking Sterilisationsverpackungen unterschiedlicher Größen	Wipak Oy, Nastola (Finnland)

Transferpipetten 1 µl – 1.000 µl und zugehörige Pipettenspitzen	Brand, Wertheim
--	-----------------

#### **1.1.4. Für verschiedene Untersuchungen verwendete Reagenzien**

Bovines Serumalbumin, Fraction V	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol 96 %	Carl Roth, Karlsruhe
PBS (Dulbecco)	Merck KGaA, Darmstadt
Steriles NaCl 0,9 %	B. Braun Melsungen AG, Melsungen

### **1.2. Für die bakteriologische Untersuchung verwendete Geräte, Instrumente, Materialien und Reagenzien**

#### **1.2.1. Für die bakteriologische Untersuchung verwendete Geräte**

Brutschrank Incucell	Münchner Medizin Me- chanik GmbH, Planegg
Bunsenbrenner Gasprofi 2SCS mit Butan-Flasche	WLD-Tec, Göttingen
Kühl-Gefrier-Kombination	Liebherr-Hausgeräte GmbH, Ochsenhausen

#### **1.2.2. Für die bakteriologische Untersuchung verwendete Materialien**

Columbia Schafblut-Agar	Oxoid, Wesel
Cryobank Tubes, gemischt	Mast Diagnostica, Reinfeld
Edwards-Agar	Oxoid, Wesel
Parafilm PM-966	Bemis Company, Neenah (USA)
Sterile Tupfer mit Aluminiumstab und Viscose	Nerbe Plus, Winsen/Luhe
Sterile Tupfer UNI-Ter mit Amies-Medium	Vacutest Kima s.r.l., Arzergrande (Italien)
Violet Red Bile-Agar	Oxoid, Wesel

### **1.3. Für die zytologische Untersuchung verwendete Geräte, Instrumente, Materialien und Reagenzien**

#### **1.3.1. Für die zytologische Untersuchung verwendete Geräte**

Counter AC-15	Karl Hecht KG, Sontheim
Kamera Leica Microsystems	Leica, Wetzlar
Mikroskop Aristoplan	Leitz, Stuttgart

#### **1.3.2. Für die zytologische Untersuchung verwendete Materialien**

Celltip Abstrichbürstchen	Servoprax GmbH, Wesel
Immersionsöl	Merck KGaA, Darmstadt
Objektträger	Hein Herenz, Hamburg

#### **1.3.3. Für die zytologische Untersuchung verwendete Reagenzien**

Haema-Schnellfärbung mit gebrauchsfertigen Reagenzien	Labor + Technik Eberhard Lehmann GmbH, Berlin
---	--

### **1.4. Für die Gewinnung, Inkubation und Konservierung der Explants verwendete Geräte, Instrumente, Materialien und Reagenzien**

#### **1.4.1. Für die Gewinnung, Inkubation und Konservierung der Explants verwendete Geräte**

Absaughilfe Vacuboy	Integra Bioscience GmbH, Biebertal
Brutschrank HeracellVios 160	Thermo Fisher Scientific, München
Laboport Laborvakuumpumpe	KNF, Hamburg
Multi-Pulse Vortexer	Glas-Col, Terre Haute (USA)
Wasserbad WBU45	Memmert GmbH + Co.KG, Schwabach

#### 1.4.2. Für die Gewinnung, Inkubation und Konservierung der Explants verwendete Instrumente

Stanze für Hautbiopsien, Durchmesser 5 mm	Kai Medical, Seki (Japan)
---	---------------------------

#### 1.4.3. Für die Gewinnung, Inkubation und Konservierung der Explants verwendete Materialien

Cellstar® 24-well Gewebekulturplatten	Greiner Bio-One, Kremsmünster (Österreich)
---------------------------------------	--

Glasperlen zur Ausplattierung der <i>E. coli</i> -Suspension	Carl Roth, Karlsruhe
--	----------------------

Harnteststreifen Multistix 10 SG	Siemens Healthineers, Erlangen
----------------------------------	--------------------------------

Messer aus rostfreiem Stahl	Eicker Messer, Solingen
-----------------------------	-------------------------

Pasteurpipetten ohne Wattestopfen	Carl Roth, Karlsruhe
-----------------------------------	----------------------

Petrischale, Glas	Carl Roth, Karlsruhe
-------------------	----------------------

Probengefäße 60 ml	Thermo Fisher Scientific, München
--------------------	-----------------------------------

Reagenzgläser	Carl Roth, Karlsruhe
---------------	----------------------

Rundboden-Proberöhrchen 1,4 ml und Kappen	Micronic, Lelystad (Niederlande)
---	----------------------------------

Schüttler Vortex 2	IKA, Staufen
--------------------	--------------

Zentrifugenröhrchen 50 ml	VWR, Ismaning
---------------------------	---------------

#### 1.4.4. Für die Gewinnung, Inkubation und Konservierung der Explants verwendete Reagenzien

Agar nach De Man, Rogosa and Sharpe	Carl Roth, Karlsruhe
-------------------------------------	----------------------

Amphotericin B-Lösung 250 µg/ml	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
---------------------------------	--------------------------------------

Brain Heart Infusion Broth	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
----------------------------	--------------------------------------

Kohlendioxid, Reinheit 3,0 (99,9 %)	Demmel Gase, München
-------------------------------------	----------------------

PBS Dulbecco	Biochrom, Berlin
Penicillin-Streptomycin 10.000 µg/ml	Merck KGaA, Darmstadt
Rekombinantes bovines IL1B	Bio-Rad Laboratories, Hercules (USA)
Rekombinantes bovines IL17A	Boster Biological Tech- nology, Pleasanton (USA)
Rekombinantes bovines IL10	Bio-Rad Laboratories, Hercules (USA)
RNAlater	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Stickstoff, Reinheit 3,5 (99,95 %)	Demmel Gase, München
Tryptic soja broth (TSB)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
WST-8 (Cell Counting Kit-8)	Merck KGaA, Darmstadt
Zellkulturmedium Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Ham's Nutrient Mixture F12	Merck KGaA, Darmstadt

## **1.5. Für die Molekularbiologische Untersuchung verwendete Geräte, Instrumente, Materialien und Reagenzien**

### **1.5.1. Für die Molekularbiologische Untersuchung verwendete Geräte**

Biosicherheitskabinett Klasse 1	LTF Labortechnik, Was- serburg
Elektronische Achtkanalpipette Picus bis 1200 µl	Sartorius Lab Instruments GmbH & Co.KG, Göttin- gen
Experion Automated Electrophoresis Systems mit Priming Station, Vortex Station II und Automated Electrophoresis Station	Bio-Rad Laboratories, Hercules (USA)
Heizblock und Schüttler BioShake iQ	Quantifoil Instruments GmbH, Jena

Homogenisator SpeedMill Plus	Analytik Jena AG, Jena
Piro Pipettierroboter	Dornier LabTech Systems GmbH, Lindau
Sterilwerkbank DNA/RNA UV-Cleaner UVC	LTF Labortechnik, Wasserbug
Thermocycler TOptical mit zugehöriger Software	Biometra GmbH, Göttingen

### 1.5.2. Für die Molekularbiologische Untersuchung verwendete Materialien und Reagenzien

384-Well-PCR-Platten, skirted sowie Abdichtungsfolien	4titude, Wotton (UK)
DNA-Exitus-Plus und RNase-Exitus-Plus	AppliChem, Darmstadt
DNase I und DNase I Reaktionspuffer	Bio&Sell GmbH, Feucht
Experion DNA 1K Analysis Kit zur Auftrennung der Produkte der konventionellen PCR	Bio-Rad Laboratories, Hercules (USA)
Experion RNA Analysis Kit und RNA StdSens Chip	Bio-Rad Laboratories, Hercules (USA)
Innu SPEED Lysetubes P mit 2,4 – 2,8 mm Keramik-Beads	Analytik Jena AG, Jena
Klonierungskit pGEM-T Easy Vector System	Promega, Madison (USA)
Kühlrack IsoFreeze PCR Cooler	Scientific Specialities, Lodi (USA)
LB-Agar	Thermo Fisher Scientific, München
LB-Medium	Carl Roth, Karlsruhe
PCR-Pipettenspitzen Safe Seal-Tips professional	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
PCR-Reaktionsgefäße Soft Tubes, 0,2 ml, RNase-, DNase- und DNA-frei, steril	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf

Primer für IL1B und IL1RA	biomers.net GmbH, Ulm
Reagenzien für cDNA-Synthese (Oligo-dT-15-Primer (500 µg/ml), dNTP-Mix (100 mM), M-MLV Reverse Transkriptase H(-) Point Mutant (200 u/µl), M-MLV RT 5x Buffer, RNasin Ribonuclease Inhibitor (400 u/µl))	Promega, Madison (USA)
Reagenzien für konventionelle PCR (5x Colorless GoTaq Reaction Buffer, dNTP.Mix (10 mM), GoTaq G2 DNA Polymerase)	Promega, Madison (USA)
Restriktionsenzym Hind III	Thermo Fisher Scientific, München
RNA Mini Kit	Bio&Sell GmbH, Feucht
SensiFAST™ SYBR No-ROX Kit für PCR	Meridian Bioscience, Cincinnati (USA)
Wasser, Nuklease-frei, steril-filtriert	Carl Roth, Karlsruhe

## **1.6. Für die Gewinnung der Uterussekretproben verwendete Geräte, Instrumente, Materialien und Reagenzien**

### **1.6.1. Für die Gewinnung der Uterussekretproben verwendete Geräte**

Autoklav Selectomat Compact	Münchner Medizin Mechanik GmbH, Planegg
Glumatic Heißklebepistole 3002 und zugehörige Cristal-Sticks	Steinel, Herzebrock-Clarholz
Sicherheitswerkbank Safeflow 1.2	Bioair, Euroclone Division, Pero (Italien)

### **1.6.2. Für die Gewinnung der Uterusskretproben verwendete Materialien**

Costar SpinX Centrifuge Tube Filters, 0,45 µm, CA-Membran, steril	Corning, Amsterdam (Niederlande)
---	----------------------------------

Edelstahlrohre 4,0 mm x 0,25 mm, und 5,0 mm x 0,75 mm, Länge 650 mm, wiederholt kalt nachgezogen	Sawade, Gottmadingen
Hygieneschutzhüllen für künstliche Besamung und Embryotransfer bei Tieren, 52 cm	Minitube, Tiefenbach
Kirschner-Draht als Mandrin, Durchmesser 3,2 mm, Länge 700 mm, beidseits rund	MK Medical, Emmingen- Liptingen
Kunststoffrohre 2,0 mm x 0,8 mm	Simprop, Harsewinkel
Merocel CF 120, Streifen mit 2 mm x 4 mm x 205 mm	Medtronic, Mystic (USA)
Mikro-Schraubröhrchen 0,5 ml Polypropylen	Sarstedt, Nümbrecht
Stellring 3 mm x 7 mm	Kipp, Sulz am Neckar
Sterile Operationshandschuhe Sempermed supreme	Semperit, Wien (Öster- reich)

### 1.6.3. Für die Gewinnung der Uterusskretproben verwendete Reagenzien

Aprotinin	AppliChem GmbH, Darm- stadt
-----------	--------------------------------

## 1.7. Für den AlphaLISA verwendete Geräte, Instrumente, Materialien und Reagenzien

### 1.7.1. Für den AlphaLISA verwendete Geräte

Elektronische Pipette HandyStep mit Spitzen	Brand, Wertheim
pH-Meter InoLab pH Level 1	WTW, Weilheim
Rüttler für Mikrotiterplatten MTS 4	IKA, Staufen
Rollmischer	VWR, Ismaning
Sonikator Sonifier Cell disruptor B15	Branson, Brookfield (USA)

### 1.7.2. Für den AlphaLISA verwendetes Material

384-Well-OptiPlate, weiß	PerkinElmer, Rodgau
--------------------------	---------------------

Abdichtungsfolie TopSeal-A Plus	PerkinElmer, Rodgau
Lichtgeschützte Reaktionsgefäße, 1,5 ml, amber	Carl Roth, Karlsruhe
Lichtgeschützte Reaktionsgefäße, Eppendorf Tubes 5 ml, amber	Eppendorf AG, Hamburg
Spatel und Löffel aus Edelstahl	Carl Roth, Karlsruhe

### 1.7.3. Für den AlphaLISA verwendete Reagenzien

AlphaLISA Akzeptor-Beads	PerkinElmer, Rodgau
AlphaLISA Detection Kit, 100 Assay Points für bovines IL1B	PerkinElmer, Rodgau
AlphaLISA HiBlock Buffer (10X)	PerkinElmer, Rodgau
CMO (98 %)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
HCl 1 mol/l	Merck KGaA, Darmstadt
HCl 4 mol/l	Fluka Chemika GmbH, Buchs (Schweiz)
HEPES ( $\geq 99,5$ %, für Zellkultur)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
$\text{KH}_2\text{PO}_4$ ( $\geq 99$ %)	Carl Roth, Karlsruhe
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
$\text{NaBH}_3\text{CN}$ (95 %, für Zellkultur)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
NaCl ( $\geq 99,9$ %)	Carl Roth, Karlsruhe
NaOH 1 mol/l	Merck KGaA, Darmstadt
NaOH 5 mol/l	Merck KGaA, Darmstadt
Polyklonaler Antikörper Goat anti Bovine IL1RA	Bio-Rad Laboratories, Hercules (USA)

---

Polyklonaler Antikörper Goat anti Bovine IL1RA, biotinyliert	Bio-Rad Laboratories, Hercules (USA)
Proclin-300	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Rekombinantes Protein bovines IL1RA	Bio-Rad, Hercules (USA)
Streptavidin (SA)-coated Donor Beads	PerkinElmer, Rodgau
Tris ( $\geq 99,9\%$ )	Carl Roth, Karlsruhe
Tween-20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

## 2. Protokolle

### 2.1. Dokumentation der Probengewinnung und -aufbereitung

Probennehmerin: \_\_\_\_\_ Datum: \_\_\_\_\_

Tier Nr. + Uhrzeit	Schlacht- band-Nr.	Sym./ n.sym.	Größe Uterus	Ovar mit Gelbkörper:					Ovar kontralateral:		
				Horn	Größe Ovar	Größe CL	Zyklusst.	Sonstiges (Foll.)	Größe	Funktionsgebilde	Sonstiges
1 ____ Uhr			H: B: L:		H: B: L:	H: B: L:			H: B: L:		
2 ____ Uhr			H: B: L:		H: B: L:	H: B: L:			H: B: L:		
3 ____ Uhr			H: B: L:		H: B: L:	H: B: L:			H: B: L:		

Tier-Nr. **1** Schlachtbandnummer: \_\_\_\_\_ Alter/Geburtsdatum: \_\_\_\_\_ Rasse: \_\_\_\_\_ Gewicht: \_\_\_\_\_

Tier-Nr. **2** Schlachtbandnummer: \_\_\_\_\_ Alter/Geburtsdatum: \_\_\_\_\_ Rasse: \_\_\_\_\_ Gewicht: \_\_\_\_\_

Tier-Nr. **3** Schlachtbandnummer: \_\_\_\_\_ Alter/Geburtsdatum: \_\_\_\_\_ Rasse: \_\_\_\_\_ Gewicht: \_\_\_\_\_

Ankunft Schlachthof: \_\_\_\_\_ Abfahrt Schlachthof: \_\_\_\_\_ Ankunft Klinik: \_\_\_\_\_ Ggf. Bearbeitung Explants: \_\_\_\_\_

Ausstreichen Tupfer \_\_\_\_\_ Färben Objektträger \_\_\_\_\_

Auswertung Tupfer 24h \_\_\_\_\_ Auswertung Tupfer 48h \_\_\_\_\_

Ggf. Explantinkubation:

Tier 1: Beginn Vorinkubation (1h) \_\_\_\_\_ → Beginn Inkubation \_\_\_\_\_ → WST-Zugabe \_\_\_\_\_

Tier 2: Beginn Vorinkubation (1h) \_\_\_\_\_ → Beginn Inkubation \_\_\_\_\_ → WST-Zugabe \_\_\_\_\_

Tier 2: Beginn Vorinkubation (1h) \_\_\_\_\_ → Beginn Inkubation \_\_\_\_\_ → WST-Zugabe \_\_\_\_\_

**Abbildung 17: Vorlage zur Dokumentation von Tier- und Organeigenschaften, Uhrzeiten und Arbeitsschritten bei der Gewinnung von Explants und Uterussekrete**

Sym.: Symmetrisch; n.: nicht; CL: Corpus luteum; Foll.: Follikel; H: Höhe; B: Breite; L: Länge; Gewicht: Schlachtgewicht des Tieres; WST: Water-soluble Tetrazolium

## **2.2. Laborprotokoll für die Haema-Schnellfärbung**

Für die zytologische Untersuchung wurde das Zellmaterial auf den Objektträgern folgendermaßen angefärbt:

- Eintauchen der Objektträger in eine Fixierlösung über 5 s
- Eintauchen der Objektträger in eine Färbelösung mit Eosin über 5 s
- Eintauchen der Objektträger in eine Färbelösung mit Azur über 5 s

Zwischen den verschiedenen Lösungen erfolgte ein Abtropfen. Im Anschluss wurden die Objektträger mit Aqua destillata (Aqua dest.) gespült. Die Trocknung erfolgte bei Raumtemperatur unter einem Abzug.

## **2.3. Laborprotokolle für die Explantkultur**

### **2.3.1. Protokoll für die Herstellung der *E. coli*-Suspension**

Ein Kügelchen aus dem Cryobank Tube wurde auf einem VRB-Agar ausgestrichen. Nach dem Bebrüten des Agars für 24 h bei 37 °C wurden einige Kolonien mit einer sterilen Öse in 10 ml Brain heart infusion überführt. Nach einer Inkubation bei 37 °C über 6 h auf einer Rüttelplatte mit 90 Runden pro Minute (rpm) wurden davon 100 µl in 9,9 ml Tryptic soja broth (TSB) überführt. Daraufhin folgte eine weitere Inkubation bei 37 °C über 18 h. Anschließend wurde daraus eine Verdünnungsreihe bis zur Verdünnungsstufe  $10^{-8}$  erstellt, indem in acht sterile Reagenzgläser jeweils 9 ml steriles NaCl 0,9 % vorgelegt wurde und jeweils 1 ml aus der Bakteriensuspension in TSB bzw. aus der dann jeweils nächstniedrigeren Verdünnung zugegeben wurden. Die übrige TSB-Suspension wurde zur Hitzeinaktivierung der *E. coli* für 60 min in einem Wasserbad mit 60 °C belassen, wobei eine Erfolgskontrolle der Hitzeinaktivierung durch ein erneutes Ausstreichen auf VRB-Agar und Inkubation über 48 h bei 37 °C erfolgte. Von den drei höchsten Verdünnungen wurden jeweils Triplikate zu je 100 µl auf VRB-Agar ausplattiert. Im Anschluss folgte eine Inkubation bei 37 °C über 24 h. Danach wurde die Berechnung der Bakterienkonzentration in der TSB-Suspension wie folgt vorgenommen: Zunächst wurde die Anzahl der gewachsenen Kolonien erfasst, wobei nur Agarplatten einbezogen wurden, auf denen wenigstens drei und höchstens 300 KBE gewachsen waren. Die Ergebnisse wurden zur Berechnung der KBE in folgende Formel eingesetzt:

$$\frac{KBE}{ml} = \frac{\text{Summe aller KBE}}{1 \cdot n_1 + 0,1 \cdot n_2} \cdot f \quad \text{Formel 1}$$

$n_1$  bezeichnet dabei die Anzahl der einbezogenen Agarplatten der niedrigeren Verdünnungsstufe und  $n_2$  die Anzahl der einbezogenen Agarplatten der höheren Verdünnungsstufe.  $f$  bezeichnet den Verdünnungsfaktor der niedrigeren Verdünnung. Da nur zwei der drei ausgestrichenen Verdünnungsstufen zu Keimwachstum mit wenigstens drei und höchstens 300 KBE führten, wurden nur diese beiden Verdünnungsstufen in die Berechnung einbezogen. Anschließend wurde die TSB-Suspension mit den hitzeinaktivierten Bakterien durch Zugabe von sterilem PBS auf eine Konzentration von  $1,0 \times 10^8$  KBE/ml verdünnt und bis zur weiteren Verwendung bei  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  gelagert.

### **2.3.2. Protokoll für die RNA-Extraktion**

Die Explants wurden auf Eis aufgetaut. Beide Explants des jeweiligen Doppelsatzes wurden zusammen mit je  $400 \mu\text{l}$  Lysepuffer in ein Lysetube gegeben. Im Anschluss wurden die Explants in den Lysetubes mit Hilfe eines Homogenisators nach folgendem Protokoll aufgeschlossen: Zunächst wurde für 30 s homogenisiert, direkt im Anschluss folgten 30 s Pause und Kühlen. Dieser Schritt wurde unmittelbar wiederholt, worauf ein drittes Homogenisieren für 1 min und 1 min Kühlen folgte. Durch einen Zentrifugationsschritt bei  $13.000 \times g$  für 1 min sanken noch vorhandene Gewebestandteile ab und konnten somit von den weiteren Reaktionsschritten ausgenommen werden. Die folgenden Schritte wurden bei Raumtemperatur ( $21 \text{ }^\circ\text{C}$ ) gemäß den Herstellerangaben durchgeführt: Der Überstand wurde auf eine DNA-bindende Säule überführt. Durch Zentrifugation bei  $11.000 \times g$  für 2 min wurde die genomische DNA an die Säule gebunden. Das erhaltene Filtrat mit der Gesamt-RNA, wurde mit  $400 \mu\text{l}$  an 70 % Ethanol versetzt und auf eine RNA-bindende Säule überführt. Durch den anschließenden Zentrifugationsschritt bei  $11.000 \times g$  für 2 min wurde die RNA an die Säule gebunden. Um eine mögliche Kontamination mit DNA auszuschließen, wurde an dieser Stelle zusätzlich ein DNA-Verdau-Schritt durchgeführt. Dafür wurden auf jede RNA-bindende Säule  $5 \mu\text{l}$  DNase mit  $10 \mu\text{l}$  Puffer und  $40 \mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  pipettiert und für 15 min inkubiert. Um eine möglichst hohe Reinheit der RNA zu erzielen, folgten im Anschluss an den DNA-Verdau drei Waschschritte, im ersten Schritt mit  $500 \mu\text{l}$  Waschpuffer, im zweiten Schritt mit  $700 \mu\text{l}$  Waschpuffer und im dritten Schritt mit  $700 \mu\text{l}$  80 % Ethanol. Die Zentrifugation wurde jeweils bei  $11.000 \times g$

für je 1 min durchgeführt. Um Reste der Waschpuffer aus der RNA-bindenden Säule zu entfernen, wurde im nächsten Schritt eine Trockenzentrifugation bei 11.000 x g für 4 min durchgeführt. Schließlich erfolgte die Lösung der RNA, indem 80 µl RNase-freies Wasser auf die Säule gegeben und diese nach 1 min Inkubationszeit bei 11.000 x g über 1 min zentrifugiert wurde. Die RNA befand sich nun im Eluat, welches auf drei RNase- und DNase-freie Reaktionsgefäße aufgeteilt wurde: ein Aliquot zu 2 µl wurden unmittelbar für die Überprüfung der Integrität und der Konzentration der RNA verwendet, ein weiteres zu 10 µl wurde als Template in die unmittelbar folgende cDNA-Synthese eingesetzt. Zuletzt wurde das übrige Volumen bei -80 °C eingefroren.

### **2.3.3. Protokoll für die cDNA-Synthese**

Für die cDNA-Synthese wurde ein konventionelles Kit verwendet. Zunächst wurde je 1 µl Oligo-dT-Primer zum 10 µl-RNA-Aliquot jeder Probe pipettiert. Die verwendeten Oligo-dT-Primer sind komplementär zum Poly(A)-Schwanz eukaryotischer mRNA, sodass von der extrahierten Gesamt-RNA nur die mRNA umgeschrieben wird. Nach der Erhitzung in einem Thermocycler auf 70 °C für 5 min wurden die Proben für 5 min in einem Kühlrack abgekühlt. Anschließend wurde zu jeder Probe 14 µl Reaktionsmix pipettiert. Dieser bestand je Probe aus 5 µl des Puffers, 1,25 µl Desoxynukleosidtriphosphate (dNTP), 0,625 µl RNasin, 0,5 µl RT und 6,625 µl Nuklease-freiem Wasser. Die Proben wurden in den Thermocycler eingesetzt, dessen Temperaturprogramm wie folgt eingestellt wurde:

- 10 min bei 38 °C (Aktivierung der RT)
- 50 min bei 46 °C (Reverse Transkription)
- 15 min bei 70 °C (Enzym-Denaturierung)

### 2.3.4. Primer-Spezifikationen

**Tabelle 3: Spezifikation der Primer für die qPCR.**

Gen	Primersequenz (5'→3') und -länge	Genlänge	Produktlänge (Position im Gen)	Schmelztemperatur	GC %	Ggf. Referenz	Acc. No.
<b>IL1B</b>	for TTCTCTCCAGCCAACCTTCATT (22)	944	198 (2 - 199)	59,6 °C	45,5	(NEUVIANS et al., 2004)	M35589
	rev ATCTGCAGCTGGATGTTCCAT (22)			60,4 °C	45,5		
<b>IL1RA</b>	for CTCCTCTTCCTGTTCCGTTC (21)	1.872	290 (63 - 352)	59,1 °C	52,4		NM_ 174357.3
	rev TGATGTTACGGCCTCTAACT (21)			59,1 °C	47,6		

Quantitative real-time PCR (qPCR); for: forward-Primer; rev: reverse-Primer; T<sub>m</sub>: Schmelztemperatur des Primers; GC %: Gehalt der Primer an den Basen Guanin und Cytosin in %; Acc. No.: Zugangsnummer zur Nukleotid-Sequenz in der National Center for Biotechnology Information (NCBI)-Datenbank.

### **2.3.5. Protokolle der Standardkurvenetablierung für IL1RA**

#### **2.3.5.1. Protokoll der konventionellen PCR**

Die konventionelle PCR wurde mit Hilfe eines handelsüblichen Kits nach Herstellerangaben durchgeführt.

Pipettierschema (Volumenangaben je Probe, Gesamtvolumen 50 µl):

Zunächst wurde ein Master Mix hergestellt, der sich je Probe wie folgt zusammensetzte:

- 5 µl 5X Colorless GoTaq Reaction Buffer
- 1 µl dNTP Mix (10 mM)
- 3 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM)
- 0,25 µl GoTaq G2 DNA Polymerase
- 1,25 µl Primer for
- 1,25 µl Primer rev
- 33,25 µl H<sub>2</sub>O

Anschließend wurden je Probe 5 µl Probe und 45 µl Master Mix pipettiert. Zusätzlich wurden Negativkontrollen mitgeführt, die statt Probe 5 µl H<sub>2</sub>O enthielten.

Temperaturprotokoll der konventionellen PCR (Deckeltemperatur 110 °C):

- Schritt 1: 3 min bei 94 °C
- Schritt 2: 45 s bei 94 °C
- Schritt 3: 30 s bei 58 °C
- Schritt 4: 1 min 30 s bei 72 °C
- Schritt 5: 29-malige Wiederholung der Schritte 2, 3 und 4
- Schritt 6: 10 min bei 72 °C

Nach der konventionellen PCR wurden die Proben für 15 min bei Raumtemperatur (21 °C) abgekühlt.

#### **2.3.5.2. Protokoll der Klonierung des Produktes aus der konventionellen PCR**

Das Einbringen der Zielsequenz in die „Competent *E. coli*“-Bakterien zum Zweck der Klonierung erfolgte mit Hilfe eines handelsüblichen Klonierungskits nach Herstellerangaben.

Herstellung des Ligationsansatzes:

- 3 µl PCR-Produkt
- 5 µl Puffer
- 1 µl Vektor (Plasmid)
- 1 µl T4 DNA-Ligase

Es folgte eine Inkubation für 20 h bei 4 °C. Anschließend wurden 2 µl des Ligationsansatzes auf Eis zu 50 µl *E. coli*-Suspension pipettiert (Konzentration 10<sup>8</sup> KBE/µg). Nach einer Erhitzung auf 42 °C für 50 s erfolgte eine Kühlung auf Eis für 2 min. Anschließend wurden 950 µl Super Optimal Broth mit Glucose (20 mM) zugegeben. Es folgte eine Inkubation bei 37 °C für 1,5 h. Im Anschluss wurde 100 µl der Bakteriensuspension auf LB-Agar ausplattiert und die Agarplatten bei 37 °C für 24 h inkubiert. Der eingesetzte LB-Agar war zuvor nach den Vorschriften des Herstellers des Klonierungskits folgendermaßen hergestellt worden:

- 32 g LB-Trockensubstanz in 1 Liter Aqua dest. lösen und autoklavieren (135 °C, 2,8 bar, 20 min), im Anschluss auf 55 °C abkühlen lassen
- Zugabe von Ampicillin (100 µg/ml), X-Gal (80 µg/ml) und IPTG (119,2 µg/ml)
- 20 ml unter einer Sterilwerkbank in eine sterile Petrischale gießen und auskühlen lassen
- Lagerung bei 4 °C für maximal einen Monat

Ob das Einbringen des Plasmids in die *E. coli*-Bakterien erfolgreich war, ließ sich aufgrund der Eigenschaften des Plasmids an der weißen Farbe der Kolonien auf dem LB-Agar erkennen.

**2.3.5.3. Weitere Inkubation der *E. coli* in LB-Medium**

Nach der Inkubation der LB-Agar wurden zwei bis vier KBE mit *E. coli*, in denen das Plasmid erfolgreich integriert und vervielfältigt worden war, mit einer sterilen Öse vom LB-Agar in ein LB-Medium übertragen. Das LB-Medium war wie folgt angesetzt worden:

- 25 g Trockensubstanz in 1 Liter Aqua dest. lösen
- Aliquotierung in sterile Reagenzgläser zu je 3 ml

- Autoklavierung und Lagerung bei 4 °C für maximal einen Monat
- Zugabe von Ampicillin (100 µg/ml) unmittelbar vor Verwendung

Das LB-Medium wurde für 24 h bei 37 °C inkubiert, bevor daraus 2 ml in die Plasmidextraktion eingesetzt wurden.

#### **2.3.5.4. Plasmidextraktion**

Die Plasmidextraktion wurde mit einem handelsüblichen Extraktskit nach Herstellerangaben durchgeführt. Alle Zentrifugationsschritte wurden bei Raumtemperatur (21 °C) mit 13.000 x g durchgeführt. Zunächst wurden 2 ml der Bakterienkultur in LB-Medium für 10 min zentrifugiert. Anschließend wurden zur Resuspension des entstandenen Pellets sowie zur Lyse der Bakterienzellen verschiedene im Kit enthaltene Puffer nach Herstellerangaben zugegeben. Zur Entfernung des Zellmaterials folgte eine erneute Pelletierung durch Zentrifugation für 10 min. Anschließend wurde der Überstand in ein Filtrerröhrchen gegeben und bei Zentrifugation für 1 min die Plasmide an die Filtersäule gebunden. Im Anschluss wurden Waschschrte mit teilweise ethanolhaltigen Puffern nach Herstellerangaben durchgeführt. Im letzten Schritt wurde durch Zugabe eines weiteren im Kit enthaltenen Puffers und Zentrifugation des Filtrerröhrchens für 1 min das Plasmid aus der Filtersäule gelöst.

#### **2.3.5.5. Extraktion der Zielsequenz aus dem Plasmid (Linearisierung)**

Zunächst wurde mit Hilfe eines Nanophotometers die Plasmidkonzentration im Eluat aus der in XI.2.3.5.4. beschriebenen Plasmidextraktion ermittelt und berechnet, welches Eluatvolumen 1 µg Plasmid beinhaltet.

##### Pipettierschema für die Extraktion:

- 1 µg Plasmid
- 1 µl Restriktionsenzym Hind III
- 2 µl Puffer

Es folgte eine Inkubation bei 37 °C für 1 h.

#### **2.3.5.6. Aufreinigung und Verdünnung der Zielsequenz**

Nach der in XI.2.3.5.5. beschriebenen Inkubation wurden die Proben mit einem handelsüblichen Kit nach Herstellerangaben aufgereinigt. Alle Zentrifugationsschritte wurden bei Raumtemperatur (21 °C) mit 13.000 x g durchgeführt. Die

Probe wurde in ein Filterröhrchen gegeben. Anschließend wurde die DNA durch Zentrifugation für 1 min an die Filtersäule gebunden. Nach einem Waschschrift wurde die DNA mit einem Puffer durch Zentrifugation für 1 min aus der Säule gelöst. Anschließend wurde mit Hilfe eines Nanophotometers die DNA-Konzentration im Eluat bestimmt. Über die DNA-Konzentration konnte die Anzahl der DNA-Kopien im Eluat berechnet werden. Durch definierte Verdünnungen des Eluats wurden anschließend die Eichpunkte der Standardkurve ( $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$  und  $10^2$  Kopien/ $\mu$ l) hergestellt.

### 2.3.6. Protokoll für die qPCR

Nach dem Auftauen wurden alle Komponenten, die DNA-Moleküle enthalten (Proben, Primer, Standard) in einem Heizschüttler für 5 min bei 60 °C und 250 rpm homogenisiert. Anschließend wurde an einem isolierten Arbeitsplatz ein Master Mix angesetzt. Pro Probe enthielt dieser:

- 5  $\mu$ l SensiFast SYBR Mix mit dem interkalierenden Farbstoff SYBR Green, Desoxyribonukleotiden, sowie einer Polymerase
- 0,4  $\mu$ l for Primer (5 pmol/ $\mu$ l)
- 0,4  $\mu$ l rev Primer (5 pmol/ $\mu$ l)
- 3,2  $\mu$ l Nuklease-freies H<sub>2</sub>O

Die Reaktionsansätze für die qPCR setzten sich aus je 9  $\mu$ l Master Mix und 1  $\mu$ l Probe oder Standard zusammen. Die Proben wurden im Doppelansatz und die Standardpunkte im dreifachen Ansatz auf eine 384-Well-Platte aufgetragen. Zudem wurden je Platte auch vier bis sechs Negativkontrollen pipettiert, die statt Probe oder Standard 1  $\mu$ l Nuklease-freies H<sub>2</sub>O enthielten. Anschließend wurde die Platte mit einer Folie versiegelt, kurz abzentrifugiert und in einen Thermocycler eingesetzt. Die qPCR verlief bei einer Deckeltemperatur von 110 °C nach folgendem Protokoll:

- Schritt 1: 95 °C über 2 min zur Aktivierung der Polymerase
- Schritt 2: 95 °C über 5 s zur Denaturierung der DNA-Doppelstränge
- Schritt 3: 60 °C über 15 s zum Anlagern der Primer an die DNA- Einzelstränge und Amplifikation des komplementären Stranges
- Schritt 4: Fluorometrische Messung
- Schritt 5: 39-malige Wiederholung der Schritte 2, 3 und 4

- Schritt 6: Schrittweises Erhitzen zur Erstellung einer Schmelzkurve mit fluorometrischer Messung nach jedem Erhitzungsschritt (60 °C Starttemperatur, 95 °C Endtemperatur, 0,5 °C Inkrement)

## **2.4. Laborprotokolle für AlphaLISA-Untersuchungen**

### **2.4.1. Herstellung der Reagenzien für die Kopplung des anti-IL1RA-Antikörpers an Akzeptor-Beads**

#### PBS

14,4 mg  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  + 900,0 mg NaCl + 79,5 mg  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  + 100 ml Aqua dest.

Einstellen des pH-Wertes auf 7,4 mit NaOH 1 mol/l

#### 400 mM $\text{NaBH}_3\text{CN}$ -Lösung

25 mg  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  + 1 ml Aqua dest.

#### Tween-20 10 %

5 ml Tween-20 + 45 ml Aqua dest.

Mischung mit Hilfe eines Magnetrührers

#### 100 mM HEPES mit pH 7,4

1191,5 mg HEPES + 40 ml Aqua dest.

Einstellen des pH-Wertes auf 7,4 mit NaOH 5 mol/l

Auffüllen auf 50 ml mit Aqua dest.

#### CMO-Lösung 65 mg/ml in 800 mM NaOH

1 mg CMO + 1 ml 800 mM NaOH aus 200  $\mu\text{l}$  Aqua dest. + 800  $\mu\text{l}$  NaOH 1 mol/l

#### 100 mM Tris-HCl mit pH 8,0

605,7 mg Tris in 50 ml Aqua dest.

Einstellen des pH-Wertes auf 8,0 mit HCl 4 mol/l

#### Proclin-300 0,05 %

1  $\mu\text{l}$  Proclin-300 + 1999  $\mu\text{l}$  PBS

### **2.4.2. Protokoll für den IL1RA-AlphaLISA**

#### **2.4.2.1. Herstellung der Verdünnungen**

Die Verdünnung der Reagenzien erfolgte unmittelbar vor der Verwendung.

### 1X HiBlock Buffer

1:10-Verdünnung des 10X HiBlock Buffers mit Aqua dest.

### Standard

Herstellung von PBS mit 0,1 % BSA mit 10 mg BSA und 10 ml PBS

Herstellung einer Verdünnung mit 250 ng/ml durch Lösen von 5 µg Standard in 20 µl PBS mit 0,1 % BSA mit anschließender 1:1000-Verdünnung mit Aqua dest.

Daraus Herstellung der Standardkurve durch 1:2-Verdünnungen bis zu einer Konzentration von 975 pg/ml

### Akzeptor-Beads

Herstellung von 200 µg/ml (10 µg/ml final concentration) durch 1:25-Verdünnung mit Aqua dest.

### Biotinylierter Antikörper

Herstellung von 200 nM (10 nM final concentration) durch 1:10003,33-Verdünnung mit Aqua dest.

### Donor-Beads

Herstellung von 50 µg/ml (40 µg/ml final concentration) durch 1:100-Verdünnung mit Aqua dest.

#### **2.4.2.2. Pipettierschema**

Pro Well 5 µl Standard oder Probe + 2,5 µl Anti-IL1RA-konjugierte Akzeptor-Beads + 2,5 µl biotinylierter Antikörper

Inkubation für 120 min bei Raumtemperatur (21°C)

Zugabe von 40 µl Donor-Beads pro Well

Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur unter Abdunkelung

Photometrische Messung bei 615 nm nach Anregung mit 680 nm

#### **2.4.3. Protokoll für den IL1B-AlphaLISA**

##### **Herstellung der Verdünnungen**

Die Verdünnung der Reagenzien erfolgte unmittelbar vor ihrer Verwendung.

### 1X HiBlock Buffer

1:10-Verdünnung des 10X HiBlock Buffers mit Aqua dest.

Standard

Herstellung einer Verdünnung mit 300 ng/ml durch Lösen des lyophilisiert gelieferten Standards in 100 µl Aqua dest. mit anschließender 1:10-Verdünnung mit Aqua dest.

Daraus Herstellung der Standardkurve nach Herstellerangaben bis zu einer Konzentration von 1 pg/ml

Akzeptor-Beads

Herstellung von 200 µg/ml durch 1:25-Verdünnung mit Aqua dest.

Biotinylierter Antikörper

Herstellung von 20 nM durch 1:25-Verdünnung mit Aqua dest.

Donor-Beads

Herstellung von 50 µg/ml durch 1:100-Verdünnung mit Aqua dest.

**Pipettierschema**

Das Pipettierschema entsprach dem Pipettierschema des IL1RA-Assays (siehe XI.2.4.2.).

**2.4.4. Berechnung des Verdünnungsfaktors**

Der Verdünnungsfaktor  $F$  berechnet sich als Verhältnis aus Endvolumen zu Anfangsvolumen:

$$F = \frac{\text{Endvolumen}}{\text{Anfangsvolumen}} \quad \text{Formel 2}$$

Nach ROHAN et al. (2000) kann dieser aus der Masse des Schwämmchens vor ( $m_{S1}$ ) und nach ( $m_{S2}$ ) der Probenentnahme sowie der Masse der insgesamt 600 µl Extraktionspuffer ( $m_{ExPGes}$ ) folgendermaßen berechnet werden:

$$F = \frac{(m_{S2} - m_{S1}) + m_{ExPGes}}{m_{S2} - m_{S1}} \quad \text{Formel 3}$$

Da im Rahmen der US-Gewinnung kein exaktes Wiegen der Merocel-Schwämmchen unmittelbar nach der Probengewinnung möglich war, wurde die Formel an die gegebenen Bedingungen angepasst. Zunächst wurde die Masse des aufgenommenen US im Schwämmchen  $m_{US}$  folgendermaßen berechnet:

$$m_{US} = m_{2Ges} - m_{FR} - m_{Exp} - m_{S1} \quad \text{Formel 4}$$

Dabei bezeichnen

- $m_{2Ges}$  die Gesamtmasse von Filterröhrchen, Schwämmchen nach der Probenentnahme und 300  $\mu$ l Extraktionspuffer,
- $m_{FR}$  die Leermasse des Filterröhrchens,
- $m_{Exp}$  die Masse der für den Transport verwendeten 300  $\mu$ l Extraktionspuffer (Dichte 1,005 g/ml) und
- $m_{S1}$  die Masse des Schwämmchens vor der Probenentnahme.

Der Verdünnungsfaktor kann nun wie folgt berechnet werden:

$$F = \frac{m_{US} + m_{ExpGes}}{m_{US}} \quad \text{Formel 5}$$

Für die Wägung wurde eine temperaturstabile Präzisionswaage mit Windschutz verwendet, womit sie mit einer Genauigkeit auf 0,001 g durchgeführt werden konnte. Die im unverdünnten US vorliegende Analytkonzentration wurde durch Multiplikation der mittels AlphaLISA ermittelten Konzentration jeder Probe mit dem probenspezifischen Verdünnungsfaktor  $F$  berechnet.

#### 2.4.5. Rechnerische Korrektur der Blutkontamination

Eine Methode zur Quantifizierung und rechnerischen Korrektur der Blutkontamination der *in vivo* gewonnenen US-Proben war entwickelt und für die Korrektur der IL1B-Konzentration bereits angewandt worden (HELFRICH, 2018). Die Korrektur der im Rahmen der vorliegenden Arbeit gemessenen IL1RA-Konzentration in *in vivo* gewonnenen US-Proben wurde nach dem gleichen Prinzip durchgeführt, welches nachfolgend in Kürze beschrieben wird.

Mit Hilfe einer Standardkurve mit zwölf Standardpunkten unterschiedlicher Blutkontaminationsgrade ergab sich zur Berechnung der prozentualen Blutkontamination die Formel:

$$\text{Blut \%} = 242 \cdot OD_{570}^2 + 118 \cdot OD_{570} + 0,24 \quad \text{Formel 6}$$

Dabei bezeichnet *Blut %* die prozentuale Blutkontamination und  $OD_{570}$  die OD der Probe bei 570 nm. Da die Nachweisgrenze bei 2,18 % Blutkontamination lag, wurde dieser Wert für alle Proben angenommen, deren prozentuale Blutkontami-

nation rechnerisch darunter lag.

Nach Bestimmung der Analytkonzentration in US und Plasma mittels AlphaLISA wurde die rechnerische Korrektur der Analytkonzentration im US durchgeführt. Dabei wurde zunächst der Anteil an reinem US an der Probe folgendermaßen ermittelt:

$$US \% = 100 \% - Blut \% \quad \text{Formel 7}$$

Dabei bezeichnet  $US \%$  den Anteil von reinem US an der US-Probe. Die mittels AlphaLISA in der US-Probe gemessene und um den Verdünnungsfaktor  $F$  korrigierte Konzentration des Analyten  $c(US_F)$  setzt sich folgendermaßen zusammen:

$$c(US_F) = \frac{US \%}{100} \cdot c(US) + \frac{Blut \%}{100} \cdot c(Plasma) \quad \text{Formel 8}$$

Dabei bezeichnet  $c(US)$  die rechnerische Analytkonzentration in reinem US (ohne Blutkontamination und korrigiert um den Verdünnungsfaktor  $F$  und  $c(Plasma)$  die Analytkonzentration im Plasma. Entsprechend lässt sich  $c(US)$  folgendermaßen berechnen:

$$c(US) = \frac{c(US_F) - \frac{Blut \%}{100} \cdot c(Plasma)}{1 - \frac{Blut \%}{100}} \quad \text{Formel 9}$$

Bei Proben, deren Analytkonzentration im AlphaLISA unter dem LDL lag, wurde die Konzentration des niedrigsten pipettierten Standardpunktes ohne Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor  $F$  als  $c(US)$  übernommen.

### 3. Ergebnistabellen der statistischen Auswertung

#### 3.1. Genexpression von IL1B und IL1RA sowie IL1RA/IL1B-Verhältnis auf Genexpressionsebene nach Koinkubation mit hitzeinaktivierten Bakterien oder Zytokinen

**Tabelle 4: Statistische Auswertung (p-Werte): Vergleich des Einflusses der eingesetzten Bakterien auf die Genexpression von IL1B und IL1RA sowie auf das IL1RA/IL1B-Verhältnis auf Genexpressionsebene in endometrialen Explants aus 26 Schlachtorganen.**

Verglichene Ansätze	t	p-Werte (gemischtes Modell)		
		IL1B	IL1RA	IL1RA/IL1B
<b>Kontrolle/<i>E. coli</i></b>	3	< 0,0001	0,0001	< 0,0001
<b>Kontrolle/<i>B. pumilus</i></b>	3	< 0,0001	0,0011	< 0,0001
<b>Kontrolle/<i>L. buchneri</i></b>	3	< 0,0001	0,9973	0,0153
<b><i>E. coli</i>/<i>B. pumilus</i></b>	3	1,0000	0,8887	0,9183
<b><i>E. coli</i>/<i>L. buchneri</i></b>	3	< 0,0001	0,0004	0,0010
<b><i>B. pumilus</i>/<i>L. buchneri</i></b>	3	< 0,0001	0,0031	0,0001
<b>Kontrolle/<i>E. coli</i></b>	14	< 0,0001	0,1999	< 0,0001
<b>Kontrolle/<i>B. pumilus</i></b>	14	< 0,0001	0,1459	< 0,0001
<b>Kontrolle/<i>L. buchneri</i></b>	14	< 0,0001	0,0001	< 0,0001
<b><i>E. coli</i>/<i>B. pumilus</i></b>	14	0,0301	0,9993	0,1948
<b><i>E. coli</i>/<i>L. buchneri</i></b>	14	0,0426	0,0378	0,3245
<b><i>B. pumilus</i>/<i>L. buchneri</i></b>	14	0,9974	0,0495	0,0020
<b>Kontrolle/<i>E. coli</i></b>	24	< 0,0001	0,9082	< 0,0001
<b>Kontrolle/<i>B. pumilus</i></b>	24	< 0,0001	0,9980	< 0,0001
<b>Kontrolle/<i>L. buchneri</i></b>	24	< 0,0001	0,0098	< 0,0001
<b><i>E. coli</i>/<i>B. pumilus</i></b>	24	0,9951	0,9605	0,3143
<b><i>E. coli</i>/<i>L. buchneri</i></b>	24	0,6823	0,0642	0,8689
<b><i>B. pumilus</i>/<i>L. buchneri</i></b>	24	0,5370	0,0165	0,0726

Für den Vergleich des Einflusses der eingesetzten Bakterien auf die Genexpression wurden die Daten aufgrund der großen Streuung logarithmiert und nach Überprüfung der statistischen Annahmen in ein lineares gemischtes Modell unter Anwendung der Tukey-Korrektur eingesetzt. t = Inkubationsdauer in Stunden.

**Tabelle 5: Statistische Auswertung (p-Werte): Vergleich des Einflusses der eingesetzten Zytokine auf die Genexpression von IL1B und IL1RA sowie auf das IL1RA/IL1B-Verhältnis auf Genexpressionsebene in endometrialen Explants aus 26 Schlachtorganen.**

Verglichene Ansätze	t	p-Werte (gemischtes Modell)		
		IL1B	IL1RA	IL1RA/IL1B
<b>Kontrolle/IL1B</b>	24	0,0312	0,9975	0,4755
<b>Kontrolle/IL17A</b>	24	0,6449	0,9997	0,2111
<b>Kontrolle/IL10</b>	24	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
<b>IL1B/IL17A</b>	24	0,9389	0,9997	0,9545
<b>IL1B/IL10</b>	24	< 0,0001	0,0001	< 0,0001
<b>IL17A/IL10</b>	24	< 0,0001	0,0001	< 0,0001

Für den Vergleich des Einflusses der Zytokine auf die Genexpression wurden die Daten aufgrund der großen Streuung logarithmiert und nach Überprüfung der statistischen Annahmen in ein lineares bzw. im Fall der Genexpression von IL1B in ein robustes gemischtes Modell unter Anwendung der Tukey-Korrektur eingesetzt. Als Kontrolle wird hier die zytokinspezifische Medium-Kontrolle mit BSA bezeichnet. t = Inkubationsdauer in Stunden.

### 3.2. Proteinkonzentrationen von IL1B und IL1RA sowie IL1RA/IL1B-Verhältnis in Uterussekretproben

**Tabelle 6: Proteinkonzentrationen von IL1B und IL1RA sowie IL1RA/IL1B-Verhältnis in Uterussekretproben.**

Protein	Gruppe		n	Konzentration in pg/ml		
				1. Quartil	Median	3. Quartil
<b>IL1B</b>	<b>Schlachtorgan</b>	<b>SE<sub>neg</sub></b>	32	1,00	1,00	84,74
		<b>SE<sub>pos</sub></b>	3	201,22	227,35	1.701,03
	<b>in vivo</b>	<b>SE<sub>neg</sub></b>	21	1,00	1,00	23,43
		<b>SE<sub>pos</sub></b>	5	243,54	267,69	1.740,99
<b>IL1RA</b>	<b>Schlachtorgan</b>	<b>SE<sub>neg</sub></b>	34	28.408,74	50.617,47	103.233,02
		<b>SE<sub>pos</sub></b>	3	179.442,83	310.324,26	587.846,79
	<b>in vivo</b>	<b>SE<sub>neg</sub></b>	21	42.984,42	114.343,31	167.966,00
		<b>SE<sub>pos</sub></b>	5	43.371,71	195.742,64	288.931,86
<b>Verhältnis</b>				<b>Verhältnis d. Konzentration</b>		
<b>IL1RA/ IL1B</b>	<b>Schlachtorgan</b>	<b>SE<sub>neg</sub></b>	32	775,33	20.786,42	53.843,61
		<b>SE<sub>pos</sub></b>	3	187,54	277,34	2.041,88
	<b>in vivo</b>	<b>SE<sub>neg</sub></b>	21	3.014,39	45.521,66	151.933,32
		<b>SE<sub>pos</sub></b>	5	141,36	178,09	302,25

Dargestellt sind die mittels AlphaLISA bestimmten Konzentrationen der Proteine IL1B und IL1RA nach rechnerischer Korrektur um den Verdünnungsfaktor und im Fall der Gewinnung *in vivo* zusätzlich um die Blutkontamination sowie das berechnete Konzentrationsverhältnis IL1RA/IL1B getrennt nach Uterusgesundheit und Art der Probengewinnung. n: Anzahl der in die statistische Auswertung einbezogenen Proben; SE<sub>neg</sub>: Tiere ohne Endometritis; SE<sub>pos</sub>: Tiere mit subklinischer Endometritis nach zytologischer Untersuchung (PMN-Anteil > 5 %)

**Tabelle 7: Statistische Auswertung (p-Werte): Vergleich der Proteinkonzentrationen von IL1B und IL1RA sowie deren Konzentrationsverhältnis in bovinen Uterussekretproben.**

Verglichene Gruppen	Gewinnungsart	p-Werte		
		IL1B	IL1RA	IL1RA/IL1B
SE <sub>neg</sub> /SE <sub>pos</sub>	Schlachtorgan	0,027	0,071	0,082
	<i>in vivo</i>	< 0,001	0,325	0,002
<b>Uterusgesundheit</b>				
Schlachtorgan/ <i>in vivo</i>	SE <sub>neg</sub>	0,353	0,070	0,019
	SE <sub>pos</sub>	0,817	0,584	0,475

Für den Vergleich der Proteinkonzentrationen von IL1B und IL1RA sowie deren Konzentrationsverhältnis in bovinen Uterussekretproben wurden die Daten aufgrund der großen Streuung logarithmiert. Nach Überprüfung von Normalverteilung und Homogenität der Varianzen wurden die Gruppen paarweise miteinander verglichen. SE<sub>neg</sub>: Tiere ohne Endometritis; SE<sub>pos</sub>: Tiere mit subklinischer Endometritis nach zytologischer Untersuchung (PMN-Anteil > 5 %).

## **XII. DANKSAGUNG**

An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. Holm Zerbe für die Überlassung des Dissertationsthemas, den Freiraum bei dessen Bearbeitung, den großen fachlichen und persönlichen Rückhalt sowie die Möglichkeit, am Lehrstuhl für Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung klinisch tätig zu sein, bedanken.

Meinem Mitbetreuer Dr. Frank Weber möchte ich einen großen Dank für das Einbringen seiner Fachkompetenz für meine Labortätigkeiten, die Kreativität und das stets für Anliegen und Fragen offene Ohr aussprechen. Unsere herzliche und humorvolle Zusammenarbeit war mir eine besondere Freude.

Bei meiner Mitbetreuerin Dr. Marie Meyerholz möchte ich mich für die äußerst engagierte Betreuung, den steten Rückhalt und die vertrauensvolle Zusammenarbeit bedanken. Die Bereitschaft, trotz ohnehin vollem Terminkalender jederzeit offen für meine Anliegen zu sein und sich in diese tief und kreativ hineinzudenken, schätze ich sehr.

Ein herzlicher Dank gilt Sandra Kirsch für die kompetente Begleitung bei allen Laborthemen, die guten Ideen auch bei kniffligen Fragestellungen, die fachliche wie menschliche Unterstützung bei Höhen und Tiefen der Laborarbeit, das Zählen von tausenden Zellen unter dem Mikroskop und unsere Freundschaft.

Meiner Mitdotorandin Simone Schabmeyer gebührt ein großer Dank für das außerordentlich große Engagement für unser Explantmodell. Ihr und unserer Mitdotorandin Julia Schneider danke ich außerdem herzlich für die schöne Zusammenarbeit und den guten Austausch. Vom lautstarken Autoradio-Mitsingen auf dem Weg zum Schlachthof bis hin zum Witze erzählen an der Sterilwerkbank habt ihr die langen Beprobungstage mit vielen Dingen aufgewertet. Vielen Dank auch an Elena Gerdes für die Bereicherung unseres Teams.

Bei Rita Radloff möchte ich mich für die kompetente und freundliche Unterstützung in allen organisatorischen Fragen bedanken.

Weiter möchte ich mich bei folgenden Personen bedanken, die mit ihrer Expertise und Hilfsbereitschaft die Erstellung dieser Arbeit ermöglicht haben:

- Der Leitung der amtlichen Fleischhygieneüberwachung des Schlachthofes, an dem wir unsere Proben aus Schlachtorganen gewinnen durften, für die Vermittlung dieser Möglichkeit sowie dem gesamten dortigen Team für die freundliche Aufnahme
- PD Dr. Christoph Gabler, für die Bereitstellung von *Bacillus pumilus* und *Lactobacillus buchneri*
- Dr. Yury Zablotzki für die kompetente und humorvolle statistische Beratung
- Dr. Georg Wolf, für die Speziesdifferenzierung mittels MALDI-TOF
- Dr. Monir Majzoub-Altweck, für die Ermöglichung der Einbettung von Biopaten

Darüber hinaus möchte ich mich beim gesamten Team der Klinik für Wiederkäuer für die wirklich schöne Zeit und die gute Zusammenarbeit herzlich bedanken. Insbesondere danke ich meinen ehemaligen Kolleginnen und Kollegen aus der Gruppe G für alles, was ich von euch lernen durfte.

Von ganzem Herzen möchte ich mich bei den Personen bedanken, die mir das Wichtigste sind und mir nicht nur während der Dissertationszeit eine feste Stütze waren. Jojo und Luki, schön, dass wir alle drei unseren ganz eigenen Weg gehen und ihr immer wieder meinen Horizont erweitert. Markus, Danke für unsere Partnerschaft am Berg und im restlichen Leben, deine unglaubliche Unterstützung im Kampf mit Word, Excel und R, das engagierte Gegenlesen und die Aufheiterung durch humorvolles Kommentieren, dein Interesse an meiner Arbeit, deine Gelassenheit, deine Rückendeckung und das Mittragen aller meiner beruflichen Entscheidungen. Mama und Papa, Danke für die finanzielle, noch mehr aber für die persönliche Unterstützung auf jeder Stufe meines Lebensweges, den Freiraum und euren bedingungslosen Rückhalt.