

**Aus dem Institut für Veterinär-Biochemie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin**

**Untersuchungen zu Milchsäurebakterien aus dem
bovinen männlichen Genitaltrakt**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin**

**vorgelegt von
Felix Westerkamp
Tierarzt aus Eschweiler**

**Berlin 2020
Journal-Nr.: 4199**

**Aus dem Institut für Veterinär-Biochemie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin**

Untersuchungen zu Milchsäurebakterien aus dem bovinen männlichen Genitaltrakt

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin**

vorgelegt von

Felix Westerkamp

Tierarzt

aus Eschweiler

Berlin 2020

Journal-Nr.: 4199

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter: PD Dr. Christoph Gabler
Zweiter Gutachter: PD Dr. Sebastian Arlt
Dritter Gutachter: Prof. Dr. Marc Drillich

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

bulls, cattle, reproduction, semen, ejaculation, penis, prepuce, Enterococcus faecalis, Lactococcus garviae, Weissella thailandensis, Leuconostoc mesenteroides, Pediococcus acidilactici, Pediococcus pentosaceus, Weissella hellenica, gene expression, polymerase chain reaction

Tag der Promotion: 04.06.2020

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <<https://dnb.de>> abrufbar.

ISBN: 978-3-96729-053-0

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2020

Dissertation, Freie Universität Berlin

D188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2020

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Inhaltsverzeichnis

Liste der verwendeten Abkürzungen	V
1 Einleitung	1
2 Literaturübersicht.....	2
2.1 Boviner männlicher Genitaltrakt.....	2
2.1.1 <i>Anatomie des bovinen männlichen Genitaltraktes.....</i>	2
2.1.2 <i>Bovines Ejakulat</i>	3
2.1.3 <i>Bovines Seminalplasma</i>	3
2.2 Reproduktion von Rindern	5
2.2.1 <i>Methoden der Fertilitätsanalyse.....</i>	5
2.2.2 <i>Künstliche Besamung.....</i>	7
2.2.3 <i>Verdüner zur Spermakonservierung.....</i>	7
2.2.4 <i>Das Ejakulat im weiblichen Genitaltrakt.....</i>	8
2.3 Bakterien im bovinen Genitaltrakt.....	10
2.3.1 <i>Pathogene im bovinen männlichen Genitaltrakt</i>	10
2.3.2 <i>Kommensale Bakterien im männlichen Genitaltrakt.....</i>	11
2.3.3 <i>Milchsäurebakterien.....</i>	13
2.3.4 <i>Milchsäurebakterien im bovinen Uterus.....</i>	14
2.4 Immunologische Vorgänge im Endometrium bei Infektionen.....	15
2.5 Endometriale Zellkultur	17
2.6 Pro-inflammatorische Cytokine, Chemokin-Liganden und Enzyme.....	18
2.6.1 <i>Cytokine.....</i>	18
2.6.1.1 <i>Interleukin 6</i>	18
2.6.1.2 <i>Interleukin 8</i>	19
2.6.2 <i>Chemokin-Liganden.....</i>	19
2.6.3 <i>Prostaglandin-Endoperoxid-Synthasen</i>	20
3 Arbeitshypothese und Aufgabenstellung	22
4 Material.....	23
4.1 Tiermaterial	23
4.2 Geräte	23
4.3 Verbrauchsmaterialien	25
4.4 Reagenzien.....	26

4.5	Enzyme	28
4.6	Kits	29
4.7	Marker/Standards	29
4.8	Rezepte.....	30
4.9	Primer	33
5	Methoden	35
5.1	Isolation von <i>Lactobacillales</i> aus bovinem Seminalplasma	35
5.2	Isolation von <i>Lactobacillales</i> von Penis und Präputium	37
5.3	Charakterisierung von isolierten Bakterien	37
5.4	Einfrier- und Auftauqualität von Milchsäurebakterien in verschiedenen Verdünnern	39
5.5	Anreicherung von Bakterien zur Ko-Kultur mit endometrialen Epithelzellen.....	40
5.6	Isolierung und Kultivierung boviner endometrialer Epithelzellen	41
5.7	Zellviabilität in Anwesenheit verschiedener Milchsäurebakterien	44
5.8	mRNA-Expression endometrialer Epithelzellen in Anwesenheit von Milchsäurebakterien..	45
5.9	RNA-Extraktion nach Ko-Kultur endometrialer Epithelzellen mit Milchsäurebakterien	47
5.10	Reverse Transkription mit vorherigem DNase-Verdau	47
5.11	Quantitative Polymerase-Ketten-Reaktion (qPCR).....	48
5.12	Ko-Kultur von Milchsäurebakterien mit bovinen Spermien	49
5.13	Statistische Analysen.....	50
6	Ergebnisse	52
6.1	Charakterisierung von <i>Lactobacillales</i> aus bovinem Seminalplasma	52
6.2	Charakterisierung von <i>Lactobacillales</i> von Penis und Präputium	54
6.3	Einfrier- und Auftauqualität von Milchsäurebakterien in verschiedenen Verdünnern	56
6.4	Untersuchung von <i>Enterococcus faecalis</i>	57
6.4.1	Zell-Viabilität von endometrialen Epithelzellen	57
6.5	Untersuchung von <i>Lactococcus garviae</i>	58
6.5.1	Zell-Viabilität von endometrialen Epithelzellen	58
6.6	Untersuchung von <i>Weissella thailandensis</i>	59
6.6.1	Zell-Viabilität von endometrialen Epithelzellen	59
6.7	Untersuchung von <i>L. mucosae</i> 8.1	60
6.7.1	Zell-Viabilität von endometrialen Epithelzellen	60

6.7.2	<i>mRNA-Expression endometrialer Epithelzellen</i>	61
6.7.2.1	<i>CXCL-mRNA-Expression</i>	61
6.7.2.2	<i>PTGS2-mRNA-Expression</i>	62
6.7.2.3	<i>IL-mRNA-Expression</i>	63
6.7.3	<i>Motilität boviner Spermien nach Ko- Kultur mit L. mucosae 8.1</i>	64
6.8	<i>Untersuchung von L. mucosae 8.2</i>	65
6.8.1	<i>Zell-Viabilität von endometrialen Epithelzellen</i>	65
6.8.2	<i>mRNA-Expression endometrialer Epithelzellen</i>	66
6.8.2.1	<i>CXCL-mRNA-Expression</i>	66
6.8.2.2	<i>PTGS2-mRNA-Expression</i>	67
6.8.2.3	<i>IL-mRNA-Expression</i>	68
6.8.3	<i>Motilität boviner Spermien nach Ko- Kultur mit L. mucosae 8.2</i>	69
6.9	<i>Untersuchung von L. mucosae 31</i>	70
6.9.1	<i>Zell-Viabilität von endometrialen Epithelzellen</i>	70
6.9.2	<i>mRNA-Expression endometrialer Epithelzellen</i>	71
6.9.2.1	<i>CXCL-mRNA-Expression</i>	71
6.9.2.2	<i>PTGS2 mRNA-Expression</i>	72
6.9.2.3	<i>IL-mRNA-Expression</i>	73
6.9.3	<i>Motilität boviner Spermien nach Ko- Kultur mit L. mucosae 31</i>	74
6.10	<i>Untersuchung von Leuconostoc mesenteroides</i>	75
6.10.1	<i>Zell-Viabilität von endometrialen Epithelzellen</i>	75
6.10.2	<i>mRNA-Expression endometrialer Epithelzellen</i>	76
6.10.2.1	<i>CXCL-mRNA-Expression</i>	76
6.10.2.2	<i>PTGS2-mRNA-Expression</i>	77
6.10.2.3	<i>IL-mRNA-Expression</i>	78
6.10.3	<i>Motilität boviner Spermien nach Ko- Kultur mit Leuconostoc mesenteroides</i>	79
6.11	<i>Untersuchung von Pediococcus acidilactici</i>	80
6.11.1	<i>Zell-Viabilität von endometrialen Epithelzellen</i>	80
6.11.2	<i>mRNA-Expression endometrialer Epithelzellen</i>	81
6.11.2.1	<i>CXCL-mRNA-Expression</i>	81
6.11.2.2	<i>PTGS2-mRNA-Expression</i>	82
6.11.2.3	<i>IL-mRNA-Expression</i>	83
6.12	<i>Untersuchung von Pediococcus pentosaceus</i>	84
6.12.1	<i>Zell-Viabilität von endometrialen Epithelzellen</i>	84
6.12.2	<i>mRNA-Expression endometrialer Epithelzellen</i>	86
6.12.2.1	<i>CXCL-mRNA-Expression</i>	86
6.12.2.2	<i>PTGS2-mRNA-Expression</i>	87
6.12.2.3	<i>IL-mRNA-Expression</i>	88
6.13	<i>Untersuchung von Weissella hellenica</i>	89

6.13.1	<i>Zell-Viabilität von endometrialer Epithelzellen</i>	89
6.13.2	<i>mRNA-Expression endometrialer Epithelzellen</i>	90
6.13.2.1	<i>CXCL-mRNA-Expression</i>	90
6.13.2.2	<i>PTGS2-mRNA-Expression</i>	91
6.13.2.3	<i>IL-mRNA-Expression</i>	92
6.14	Untersuchung von <i>L. buchneri</i>	93
6.14.1	<i>Motilität boviner Spermien nach Ko- Kultur mit L. buchneri</i>	93
6.15	Übersicht der Ergebnisse.....	94
7	Diskussion	95
7.1	Tiermaterial und Methodik	95
7.2	Milchsäurebakterien im Genitaltrakt.....	98
7.2.1	<i>Milchsäurebakterien im männlichen Genitaltrakt</i>	98
7.2.2	<i>Milchsäurebakterien im weiblichen Genitaltrakt</i>	100
7.3	Zellkulturmodelle	101
7.4	Einfluss von Milchsäurebakterien auf endometriale Epithelzellen	103
7.5	Pro-inflammatorische Cytokine, Chemokin-Liganden und Enzyme	105
7.6	Einfluss von Milchsäurebakterien auf Spermien	109
7.7	Schlussfolgerung	112
7.8	Ausblick.....	113
8	Zusammenfassung	114
9	Summary	116
10	Literaturverzeichnis	118
11	Publikationsverzeichnis	138
12	Danksagung	139
13	Finanzierungsquellen	140
14	Selbständigkeitserklärung	141

Liste der verwendeten Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ACTB	β -Actin
ADR	Arbeitsgemeinschaft deutscher Rinderzüchter
B-Lymphozyt	knochenmarksassoziierter (bone marrow) Lymphozyt
BHV-1	bovines Herpesvirus 1
bp	Basenpaare
BRS	Bundesverband Rind und Schwein
BSP	bovines Seminalplasma protein
CASA	computerassistierte Spermienanalyse
CXCL-1/-2/-3/-5	Chemokin-X-Liganden 1, -2, -3, -5
cDNA	komplementäre DNA
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratcentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (-acid)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxy-Nukleosidtriphosphat
E.	Escherichia
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure
ELISA	enzyme-linked-immunsorbent-assay
EU	Europäische Union
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
for	vorwärts (forward)
h	Stunde(n)
H ₂ O	deionisiertes Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
IL-1A/-1B/-6/-8	Interleukin 1A, -1B, -6, -8
IE	internationale Einheiten
kbE	koloniebildende Einheiten
kDa	Kilo-Dalton
L.	Lactobacillus
l	Liter

Abkürzungsverzeichnis

LB	Luria und Bertani
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molarität
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mg	Milligramm
mmol	Millimol
µl	Mikroliter
µmol	Mikromol
ml	Milliliter
mM	millimolar
MOI	relative Infektionsdosis (multiplicity of infection)
mRNA	Boten-RNA (messenger-RNA)
MRS	deMan, Rogosa und Sharpe
n	Anzahl
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	Nanogramm
NaCl	Natriumchlorid
P	Signifikanz
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PBMC	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PGF _{2α}	Prostaglandin F _{2α}
PGH ₂	Prostaglandin H ₂
PMN	polymorphkernige Neutrophile
PTGS2	Prostaglandin-Endoperoxid-Synthase 2
qPCR	quantitative PCR
RBB	Rinderproduktion Berlin-Brandenburg
rDNA	ribosomale DNA
rev	rückwärts (reverse)
RNA	Ribonukleinsäure (-acid)
rpm	Umdrehungen pro Minute (rotations per minute)
RT	reverse Transkription
RT-PCR	reverse Transkription-Polymerase-Kettenreaktion
S.	Seite
SDHA	Untereinheit A des Succinat-Dehydrogenase-Komplexes
SUZ12	Polycomb-Protein 12
T.	Trueperella

T-Lymphozyt	thymusassoziierter Lymphozyt
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TLR	Toll-like-Rezeptor
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Einheiten (Units)
UV	Ultraviolett
V	Volumen
w	Gewicht

1 Einleitung

Die künstliche Besamung stellt den heutigen Standard in der Reproduktion von Milchkühen dar und hat die Milchviehhaltung aus ökonomischer Sicht betrachtet effizienter gemacht. Weltweit werden jährlich etwa 130 Millionen Rinder künstlich besamt und in Deutschland kommt es jährlich zu 4 Millionen Erstbesamungen (Vishwanath 2003, BRS 2017).

Um die Verbreitung und Übertragung von venerischen Erkrankungen zu minimieren, wurde in den vergangenen Jahrzehnten intensiv an den Möglichkeiten der Verminderung pathogener Erreger geforscht, weshalb Sperma-Pailletten grundsätzlich mit Antibiotika versetzt werden. Üblicherweise eingesetzte und in einer Richtlinie der Europäischen Union vorgegebene Wirkstoffe sind Streptomycin, Penicillin, Lincomycin und Spectinomycin (EU Richtlinie 88/407 1988). Einige der venerisch übertragbaren Erreger sind anzeigepflichtig und besitzen zoonotisches Potential (Nardi Junior et al. 2017).

Im Gegensatz zu pathogenen Bakterien ist das Wissen über kommensale, apathogene Bakterien im bovinen männlichen Genitaltrakt sehr begrenzt. Es existieren bislang keine detaillierten Studien über deren Existenz und deren Einfluss auf Zellen des Wirtes.

In der humanmedizinischen Forschung existieren bereits Untersuchungen über das Vorhandensein kommensaler Bakterien im Ejakulat des Mannes. Hier konnte gezeigt werden, dass vor allem Laktobazillen einen protektiven Effekt im Reproduktionstrakt haben und zur Verbesserung der Fruchtbarkeit beitragen könnten (Weng et al. 2014).

Bei weiblichen Rindern ist das Potenzial solcher kommensaler Bakterien mittlerweile bekannt und erste Untersuchungen befassten sich mit dem Einfluss solcher Bakterien auf die Uterusgesundheit (Kummer et al. 1997, Genis et al. 2018). Kürzlich veröffentlichte Studien konnten positive Eigenschaften autochtoner Milchsäurebakterien in Bezug auf die Fruchtbarkeit von Milchkühen zeigen. Durch intrauterin verabreichte Laktobazillen konnte die Günstzeit von Milchkühen signifikant verringert werden (Peter et al. 2018).

Milchsäurebakterien sind seit Langem als Probiotika bekannt und werden sowohl beim Menschen als auch bei Tieren als Arzneimittel eingesetzt. Die bakteriziden Eigenschaften dieser Milchsäurebakterien können einen großen Beitrag zur Reduktion von Antibiotika leisten und damit auch der aktuellen Resistenzproblematik entgegenwirken.

Durch diese Untersuchung soll das Potential solcher probiotischen Milchsäurebakterien im Genitaltrakt des Bullen erforscht werden.

2 Literaturübersicht

2.1 Boviner männlicher Genitaltrakt

2.1.1 Anatomie des bovinen männlichen Genitaltraktes

Der bovine männliche Genitaltrakt gliedert sich grundsätzlich in die Testes, die Nebenhoden, die *Ducti deferentes*, die akzessorischen Geschlechtsdrüsen und das Begattungsorgan, den Penis (Schmidt 2000). Die Hoden als Keimdrüsen dienen als Bildungsstätte der Spermien, während das Seminalplasma zum Großteil von den akzessorischen Geschlechtsdrüsen produziert wird. Der fibro-elastische Penis mit seinen umliegenden Strukturen dient lediglich dem Transport des Ejakulates. Das Präputium umschließt mit dessen Schleimhaut das distale Ende des Penis, die *Pars libera*. Das im *Cavum praeputiale* enthaltene Smegma besteht hauptsächlich aus Epithelzellen, Harn und Talg (Gille 2008).

Die Hoden des adulten Bullen besitzen einen Skrotalumfang von mindestens 28 Zentimetern (cm). Die täglich pro Gramm Hodenparenchym produzierte Spermienmenge wird als „*daily sperm production*“ definiert (Coulter & Foote 1979).

Das Hodenparenchym als Bildungsstätte der Spermien macht etwa 80 % des Hodengewichts aus und ist in Hodenläppchen gegliedert, in denen sich die *Tubuli seminiferi contorti* befinden. Das in den *Tubuli seminiferi contorti* befindliche Keimepithel dient der Bildung der Spermien. Dieser Prozess, bei dem sich diploide Spermatogonien zu haploiden Spermien entwickeln, wird als Spermatogenese bezeichnet (Liebich 2004).

Die das Keimepithel umgebenden Sertoli-Zellen bilden cytoplasmatische Ausläufer und sind über tight junctions miteinander verbunden. Diese tight junctions bilden die sogenannte Blut-Hoden-Schranke, indem sie das Keimepithel in ein basales und in ein lumbales Kompartiment unterteilen. Auf diese Weise bildet das lumbale Kompartiment einen abgeschlossenen Raum, in dem die Spermatozyten zu Spermatiden heranreifen und dort vor dem Immunsystem und Pathogenen geschützt sind (Liebich 2004).

Die Spermien werden über die *Ductuli efferentes* zum Nebenhoden transportiert, der sich in Nebenhodenkopf, -körper und -schwanz gliedert. Die stark gewundenen Nebenhodenkanäle dienen der Lagerung und der weiteren Reifung der Spermien. Dem Nebenhodenschwanz folgt der Samenleiter (Gille 2008).

Der Bulle besitzt zur Synthese des Seminalplasmas vier akzessorische Geschlechtsdrüsen, nämlich die *Ampulla ductus deferentis*, die *Glandula vesicularis*, die Prostata und die *Glandula bulbourethralis* (Gille 2008).

Während der Ejakulation werden die Sekrete der akzessorischen Geschlechtsdrüsen zusammen mit den im Nebenhoden befindlichen Spermien in den Samenleiter transportiert.

2.1.2 Bovines Ejakulat

Das mittlere Ejakulatvolumen bei Bullen in einem Alter von drei bis vier Jahren beträgt 5 Milliliter (ml) mit einer Spermienkonzentration von etwa $1,2 \times 10^9$ /ml (Schmidt 2000, Murphy et al. 2018). Bei 3- bis 10-jährigen Zuchtbullen sollte die wöchentlich gewonnene Spermienmenge zwischen 4 und 6×10^{10} liegen (Almquist et al. 1976). Sowohl Volumen als auch Konzentration variieren aufgrund der klimatischen Bedingungen, der Absamungsfrequenz und des Alters erheblich. Die höchste Spermienkonzentration wurde in einer Untersuchung während des Sommers beobachtet (Snoj et al. 2013). Diese saisonalen Schwankungen werden durch Änderungen bezüglich ausgeschütteter Hormone, wie zum Beispiel dem luteinisierendem Hormon, Testosteron und Melatonin, erklärt (Tatman et al. 2004).

Die zellfreien Bestandteile des Ejakulates werden zusammenfassend als Seminalplasma bezeichnet. Das Seminalplasma stammt fast ausschließlich aus den akzessorischen Geschlechtsdrüsen, während nur ein sehr kleiner Anteil dem Hodenparenchym und dem Nebenhoden entspringt. Der größte Teil des bovinen Seminalplasmas wird von der *Glandula vesicularis* produziert (Schmidt 2000).

Reife Spermien bestehen aus einem Spermienkopf und -schwanz. Der Schwanzteil lässt sich wiederum in das Hals-, Mittel-, Haupt- und Endstück unterteilen. Der Spermienkopf enthält nahezu ausschließlich den Nukleus und am proximalen Ende das Akrosom. Das Akrosom mit seinen Enzymen, wie beispielsweise Hyaluronidase und Neuraminidase, dient der Penetration der *Zona pellucida* der Oocyte. Das Mittelstück des Spermischwanzes enthält die spiralig angeordneten, wegen des hohen Adenosintriphosphat-Verbrauchs in großer Zahl vorliegenden, Mitochondrien (Liebich 2004).

Spermien erlangen erst im distalen Abschnitt des Nebenhodens ihre Fertilität. Das Nebenhodenepithel sezerniert verschiedenste Moleküle, worunter die Glykosylphosphatidylinositol-Ankerproteine P25b, die in die Membran der reifenden Spermien eingebaut werden, als essenziell angesehen werden (Frenette & Sullivan 2001). Ebenso ändert sich während der Reifung die Zusammensetzung der Lipide in der Membran, indem dort nach der Reifung vermehrt Phosphatidylcholin und -ethanolamin vorzufinden sind (Rejraji et al. 2006).

2.1.3 Bovines Seminalplasma

Das Seminalplasma bildet, bezogen auf das Volumen, die größte Fraktion des Ejakulates. Grundsätzlich dient es dem Spermientransport, der Erhöhung der Spermienmotilität und dem intrauterinen Schutz vor einer frühzeitigen Eliminierung durch das weibliche Immunsystem. Der im Seminalplasma enthaltene transformierende Wachstumsfaktor β wird als Suppressor

von zytotoxischen thymusassoziierten Lymphozyten (T-Lymphozyten) und natürlichen Killerzellen im Endometrium angesehen (Robertson 2000).

Die Gewinnung von Seminalplasma erfolgt meist durch die Zentrifugation des Ejakulates für 10 Minuten bei einer Drehzahl von 1000 Umdrehungen pro Minute (rpm) (Odhiambo et al. 2009).

Das Seminalplasma ist eine heterogene Flüssigkeit und enthält tierartübergreifend unter anderem Aminosäuren, Lipide, Elektrolyte, Enzyme und Prostaglandine (Juyena & Stelletta 2012).

Die Zusammensetzung des bovinen Seminalplasmas ist in **Tabelle 1** dargestellt:

Tabelle 1: Zusammensetzung des bovinen Seminalplasmas. Konzentrationsangaben in Milligramm (mg)/ml (Mann 1954, Nauc & Manjunath 2000).

Bestandteil	Konzentration (mg/ml)
Citrat	7,20
Fructose	5,40
Chlorid	3,71
Natrium	1,09
Phosphor	0,82
Calcium	0,34
Gesamtstickstoff	7,56
Gesamtprotein	73-93

Der pH-Wert des bovinen Seminalplasmas beträgt 7,2 bis 7,4 (Shum et al. 2011). Die Analyse des Proteoms im Seminalplasma hat speziesspezifische Unterschiede dargelegt. Das bovine Seminalplasma enthält Peptidasen, heparin-bindende Proteine und Spermadhäsine. Spezifische Proteine sind „binder of sperm protein 1 und 3“ (BSP1, -3) und das bovine Seminalplasmaprotein 5 (BSP5) (Druart et al. 2013). Diese Seminalplasmaproteine dienen unter anderem der Adhäsion von Spermien an die Zilien des Oviduktes. In einer früheren Untersuchung über bovine Seminalplasmaproteine konnte gezeigt werden, dass Bullen mit einer hohen Konzentration an Proteinen mit einer Größe von 26 Kilo-Dalton (kDa) fertiler sind als solche mit einer hohen Konzentration an Proteinen von 16 kDa Größe. Proteine mit einer Größe von ca. 26 kDa sind beispielsweise die Phospholipase A₂ und die BSP1 und -3, die somit mit einer Erhöhung der Fertilität assoziiert sind (Killian et al. 1993).

Eine potenzielle Subfertilität von Zuchtbullen wird meist mit mangelhafter Spermienqualität korreliert, obwohl Untersuchungen zeigen, dass das in Samenportionen enthaltene

Seminalplasma einen nicht zu unterschätzenden Einfluss haben könnte (Maxwell et al. 2007). Eine Seminalplasmakonzentration von maximal 10 % hat einen positiven Einfluss auf die Vitalität, Motilität und Chromatin-Integrität boviner Spermien (Garner et al. 2001). Allerdings deutet eine andere Untersuchung auf einen negativen Effekt von Seminalplasma auf endometriale Epithelzellen *in vitro* hin (Nongbua et al. 2018). Die Anwesenheit von Seminalplasma führt zu einem Efflux von Phospholipiden und Cholesterin aus der Zellmembran, sodass die Membranintegrität gestört wird. Dieser Effekt wurde bei Ko-Kultur endometrialer Epithelzellen mit einer Konzentration von 4 % Seminalplasma beobachtet, wohingegen bei Anwesenheit von 1 % Seminalplasma kein negativer Einfluss beobachtet werden konnte. Seminalplasma von hoch-fertilen Bullen hatte einen geringeren Einfluss auf die Viabilität von endometrialen Epithelzellen als Seminalplasma von weniger fertilen Bullen. Pro-inflammatorische Bestandteile des Seminalplasmas, wie zum Beispiel Prostaglandine und Zytokine, induzieren im Uterus eine besamungsinduzierte Entzündungsreaktion („post-inseminationem inflammatory response“). Dieser Effekt scheint *in vivo* vorteilhaft für die spätere Implantation eines Embryos zu sein, da eine frühe Aktivierung von knochenmarkassoziierten („bone marrow“) Lymphozyten (B-Lymphozyten) und T-Lymphozyten nach artifizierlicher Insemination die maternale Toleranz gegenüber dem Embryo zu stimulieren scheint (Johansson et al. 2004). Beim Rind wurde festgestellt, dass die Anwesenheit von Seminalplasma zu einer verringerten Aktivität polymorphkerniger Neutrophiler (PMN) im Uterus führt und damit weniger reaktive Sauerstoffspezies synthetisiert werden (Aloe et al. 2012).

2.2 Reproduktion von Rindern

2.2.1 Methoden der Fertilitätsanalyse

Die Untersuchung des Ejakulats ist fester Bestandteil der Untersuchung auf Zuchttauglichkeit in Besamungsstationen. Nur allgemein- und geschlechtsgesunde Bullen können Ejakulat liefern, welches für die künstliche Besamung verwendet werden kann.

Die Untersuchung von Spermien hinsichtlich ihrer Qualität ist essenziell für einen späteren Besamungserfolg (Saacke et al. 1998). Allerdings konnte bereits gezeigt werden, dass alleine die Analyse der „Non-Return-Rate“ von besamten Rindern nur schwach mit der Spermienqualität korreliert, da diese Rate von vielen äußeren Einflüssen beeinflusst wird (Rodriguez-Martinez 2003). Die „Non-Return-Rate“ bezeichnet den Prozentsatz der Rinder, der nach erfolgter Besamung innerhalb eines bestimmten Zeitraumes nicht erneut besamt worden ist.

Die Empfehlung 8.2 der Arbeitsgemeinschaft deutscher Rinderzüchter (ADR) „Anforderungen an Zuchtbullen für den Einsatz in der künstlichen Besamung und für Deckbullen“ (ADR 2006a) gibt Besamungsstationen vor, dass in der Zucht eingesetzte Zuchtbullen allgemein-

geschlechts- und erbggesund sein müssen. Darüber hinaus ist das Ejakulat grobsinnlich und mikroskopisch auf dessen Qualität zu beurteilen. Das Volumen des Ejakulates soll bei Bullen, die älter als 4 Jahre sind, mindestens 4 ml betragen. Morphologisch veränderte Spermien dürfen maximal zu 20 % vorhanden sein und das native Ejakulat muss mindestens 70 % vorwärtsbewegliche, also progressiv motile, Spermien beinhalten.

Laut einer weiteren Empfehlung des Bundesverbandes Rind und Schwein e.V. (BRS) wird das Ejakulat jedes Bullen mindestens auf Spermienkonzentration, Spermienmorphologie und Vorwärtsbeweglichkeit untersucht. Zudem finden die gleichen Untersuchungen nach der Kryokonservierung und des darauffolgenden Auftauprozesses statt (ADR 2006b). Laut dieser Empfehlung müssen nach dem Auftauen bei 38° Celsius (C) für 10 Sekunden (s) mindestens 50 % der enthaltenen Spermien eine Vorwärtsbewegung zeigen. Zudem müssen pro Spermaportion mindesten 6×10^6 Spermien vorwärtsbeweglich sein.

Seit einigen Jahren werden Spermien zusätzlich via standardisierten „Computer assisted sperm analysis“- Verfahren (CASA) und der Durchflusszytometrie untersucht, um detailliertere Informationen über die Fertilität von Bullen zu erhalten (Malama et al. 2017).

Es existieren verschiedene CASA-Systeme, welche den Vorteil bieten, die Motilitätsanalyse von Spermien zu standardisieren. Alle Systeme bestehen aus einem Videomikroskop, welches mit einer Software verknüpft ist, die Analysen der Spermienmorphologie und der -motilität generieren kann (Amann & Hammerstedt 1980). Es werden meist mindestens vier Gesichtsfelder mit einer Gesamtspermienzahl von mindestens 1000 Zellen ausgewertet. Die gemessenen Parameter sind die absolute Motilität (%), die progressive Motilität (%), die Bewegungsrichtung und die Geschwindigkeit der Spermien (Mikrometer (μm)/s). Darüber hinaus können noch einige weitere Parameter, wie der Spermienkopfwinkel (μm) und die Geradlinigkeit der Bewegung einzelner Spermien, erhoben werden (Hoflack et al. 2007). Limitiert sind die erhältlichen CASA-Systeme dadurch, dass das Ejakulat meist verdünnt werden muss und dass einige Verdüner die Messung verfälschen können. Deshalb sollte die Spermienkonzentration bei Nutzung eines CASA-Systems zwischen 20 und $50 \times 10^6/\text{ml}$ liegen (Verstegen et al. 2002).

Durch die Nutzung der Durchflusszytometrie kann unter anderem die Integrität der Plasmamembran, des Akrosoms, das mitochondriale Membranpotenzial und die Chromatin-Struktur gemessen werden (Graham & Moce 2005). Neben der Qualitätsanalyse hat die Durchflusszytometrie die Geschlechtsbestimmung von Spermien („sex-sorted semen“) wirtschaftlich nutzbar gemacht (van den Engh & Stokdijk 1989). Moderne Methoden der Durchflusszytometrie können mit einer neunzig-prozentigen Sicherheit das Geschlecht von maximal 30.000 Spermien pro Sekunde unterscheiden (Seidel 2014).

2.2.2 Künstliche Besamung

Die künstliche Besamung stellt heutzutage den Standard in der Reproduktion von Milchkühen dar. Die durchschnittlich verwendete Spermienzahl pro Inseminationsportion beträgt 2×10^7 (Vishwanath 2003).

Bovines Ejakulat wird in der Regel durch die Nutzung einer künstlichen Vagina gewonnen. Die Methode ist einfach durchzuführen und liefert, im Gegensatz zu anderen Absammelmethode, ein physiologisches Ejakulat (Vishwanath 2003).

Dies hat neben hygienischen Gründen den Vorteil der Effizienz und des Zuchtfortschritts. In Deutschland existieren etwa 4,2 Millionen Milchkühe, die von insgesamt 22 Besamungsstationen betreut werden (BRS 2017). Mit Einführung der künstlichen Besamung ist die Arbeitssicherheit in der Milchviehhaltung gestiegen, da freilaufende Deckbullen immer eine Gefahr darstellen.

Jedoch ist durch die künstliche Besamung die genetische Diversität deutlich reduziert worden. Außerdem bestand in vergangenen Jahrzehnten immer das Risiko, venerische Erkrankungen über Sperma-Pailletten stark zu verbreiten, da das Ejakulat eines einzigen Bullen über die künstliche Besamung eine große Anzahl an Rindern erreicht (Eaglesome & Garcia 1997). Dies liegt daran, dass meist Tiefgefriersperma verwendet wird, weshalb es so über weite Strecken transportiert werden kann (Vishwanath 2003).

Die meist kryokonservierten Samenportionen werden nach dem Auftauen in der Regel intrauterin deponiert. Dies imitiert zwar nicht die natürlichen Bedingungen des Deckaktes, steigert aber den Besamungserfolg (Verberckmoes et al. 2004a). Allerdings existieren Methoden, bei denen die Samenportion intracornual oder intracervikal deponiert wird (Verberckmoes et al. 2004b). Vergleichende Studien haben gezeigt, dass die intracornuale Insemination um 5 % höhere Konzeptionsraten erzielt, da mehr progressiv motile Spermien den Ovidukt erreichen (Kurykin et al. 2003).

2.2.3 Verdünner zur Spermakonservierung

Die Spermien eines Ejakulates können für die Gefrierkonservierung, je nach Konzentration und Volumen, auf bis zu 600 Pailletten mit einem Volumen von 0,25 ml in Mikro-Pailletten zur künstlichen Besamung verdünnt werden (Anzar et al. 2011). Dies hat enorme wirtschaftliche Vorteile für die Rinderzucht.

In den letzten Jahren wurde die Flüssigkonservierung von Bullensamen immer weiter modifiziert, um die Spermienanzahl pro Samenportion weiter zu verringern. Bei der Flüssigkonservierung reichen in der Regel 5×10^6 Spermien pro Portion aus, da Verluste durch die Kryokonservierung ausbleiben (Murphy et al. 2013). Allerdings wird aufgrund der logistischen Probleme bei flüssigkonserviertem Samen bislang weiterhin zu einem Großteil auf kryokonservierten Samen zurückgegriffen (Murphy et al. 2015).

Das Tiefgefrieren von Spermaportionen in flüssigem Stickstoff führt zur zellulären Dehydratation, Eiskristallbildung und zu Membranschädigungen (Parks & Graham 1992). Um dem entgegenzuwirken, beinhalten alle erhältlichen Verdünner im Wesentlichen als nicht-penetrierendes Kryoprotektivum Lecithin aus entweder tierischen oder pflanzlichen Rohstoffen und beispielsweise Glycerin als penetrierendes Protektivum (Vishwanath & Shannon 2000). Die Erkenntnisse über die Nutzung von Glycerin als Kryoprotektivum haben das Tiefgefrieren von Sperma erst möglich gemacht (Polge et al. 1949).

Außerdem ist in jedem Verdünner Tris(hydroxymethyl-)aminoethan (TRIS) enthalten, um den osmotischen Druck auszugleichen. Monosaccharide, wie Glucose und Fructose, dienen der Nährstoffversorgung (Vishwanath & Shannon 2000). In dem Verdünner Triladyl (Minitüb-Artificial Animal Reproduction, Tiefenbach) sind 0,2 Gramm (g) Glucose/100 ml und 0,99 g Fructose/100 ml enthalten (Verberckmoes et al. 2005). Dennoch überleben nur etwa 50 % der Spermien den Einfrierprozess und das anschließende Auftauen (Vishwanath & Shannon 2000).

Um die Qualität eines Verdünners zu evaluieren, werden meist die Motilität und die Membran-Integrität der Spermien nach dem Einfrier- und Auftauprozess herangezogen (Christensen et al. 2011). Mit der Nutzung der Durchflusszytometrie lässt sich beispielsweise eine Veränderung der Membranintegrität aufgrund des eingesetzten Verdünners messen (Anzar et al. 2011).

Grundlage der vielen auf dem Markt erhältlichen Verdünner bilden TRIS-Puffer und Eigelb- oder Milchprodukte. National weit verbreitet sind Verdünner des Herstellers Minitüb. Als kommerziell erhältliche Verdünner stehen unter anderem Triladyl, Biladyl, Steridyl, AndroMed (alle Minitüb) und BioXcell (IMV Technologies, Lâigle, Frankreich) zur Verfügung. Hierbei kann zwischen einer antibiotikafreien und einer antibiotikahaltigen Variante nach Richtlinie 88/407 der Europäischen Union (EU Richtlinie 88/407 1988) ausgewählt werden. Alle der genannten Verdünner, außer AndroMed und BioXcell, werden mit Eigelb verwendet. Die im Eigelb enthaltenen Lecithine sollen dem Schutz der Phospholipide in der Zellmembran dienen (Ansari et al. 2016). Die Nutzung von Eigelb bringt allerdings gewisse hygienische Risiken mit sich und die Inhaltsstoffe können nicht exakt definiert werden (Bousseau et al. 1998). Studien konnten jedoch zeigen, dass der Einsatz von pflanzlichem Lecithin eine ebenso gute Wirkung erreicht wie Eigelb (Bousseau et al. 1998, Lima-Verde et al. 2018).

2.2.4 Das Ejakulat im weiblichen Genitaltrakt

Das Rind ist unter natürlichen Fortpflanzungsbedingungen ein Scheidenbesamer (Hawk 1983). Normalerweise wird das Sperma bei der künstlichen Besamung im *Corpus uteri* deponiert, wovon es von dort aus in die *Cornua uteri* und dann in die Ovidukte gelangt. Die Anzahl vitaler Spermien minimiert sich auf deren Weg in den Ovidukt, wo die Befruchtung der

Oozyte stattfindet (Hawk 1983). Spermien gelangen mit nur noch einer Konzentration von etwa 100 Stück pro ml in den Ovidukt (Larsson 1988). Die erste physiologische Barriere für eine Verminderung der Spermienkonzentration wird bei der künstlichen Besamung umgangen. Die *Cervix uteri* mit ihrer Schleimhaut und sezerniertem Mucus stellt somit kein Passagehindernis mehr dar (Rath et al. 2009).

Motile Spermien wandern über die *Cornua uteri* in den Ovidukt, wo sie für maximal 24 Stunden (h) vor vorzeitiger Kapazitation und Phagozytose geschützt sind (Suarez 2002). Durch an den Spermien haftende Seminalplasmaproteine können die Spermien über Fukoseliganen an den Zilien des Ovidukts haften (Suarez 2007).

Für die dann folgende Befruchtungsfähigkeit ist die Kapazitation und Akrosomenreaktion entscheidend. Um mit der *Zona pellucida* der Oozyte fusionieren zu können, werden Dekapazitationsfaktoren an der Oberfläche der Spermien entfernt. Dies führt zu metabolischen Veränderungen, sodass die Spermien hyperaktiviert werden (Jansen et al. 2001). Dieser Vorgang ist bislang nicht im Detail aufgeklärt, aber bekannt ist, dass ein Influx von Calcium-Ionen zu Phosphorylierungsreaktionen von Proteinen und damit zu einer Destabilisierung der Zellmembran führt (Piehler et al. 2006). Das Seminalplasmaprotein PDC-109 bindet an die Spermienoberfläche und soll die Kapazitation induzieren, indem es die Bindung von Spermien an das Epithel des Ovidukts gewährleistet (Talevi & Gualtieri 2010).

Anschließend folgt die Akrosomenreaktion, die nur bei Spermien mit vorheriger Kapazitation stattfinden kann. Das Spermium bindet an die Oozyte, wodurch über membrangebundene Glykoproteine die Akrosomenreaktion beginnt. Der Calcium-Einstrom aktiviert die Proteinkinase C, welche das Verschmelzen der Akrosomenmembran mit der Plasmamembran bewirkt (Gadella et al. 2001). Akrosomale Inhaltsstoffe werden frei, die zu einer Proteolyse der *Zona pellucida* führen (Michelmann et al. 2007). Die Anwesenheit von Progesteron in der Umgebung der *Zona pellucida* soll die Akrosomenreaktion zusätzlich induzieren (Flesch & Gadella 2000). Nur Spermien, die die Kapazitation und darauffolgende Akrosomenreaktion durchlaufen haben, sind befruchtungsfähig. Technologische Prozesse, wie zum Beispiel das Tiefgefrieren, führen zum Teil durch Veränderungen der Membranpermeabilität und des Akrosoms zu Schädigungen der Spermien, sodass sie zwar nach dem Auftauprozess noch vital sind, aber ihre Befruchtungsfähigkeit nicht mehr erlangen können (Spinaci et al. 2010).

In einer *in-vitro*-Studie wurde der immunologische Effekt von Spermien auf uterine Epithelzellen untersucht. Die Anwesenheit von Spermien führte bei den endometrialen Epithelzellen nach dreistündiger Inkubation zu einer Erhöhung der Interleukin 8- (*IL8*-) und Interleukin 1B- (*IL1B*-) Boten-Ribonukleinsäure- (mRNA) Expression. Diese pro-inflammatorische Reaktion soll die Phagozytose von im Uterus befindlichen Spermien stimulieren (Elweza et al. 2018).

2.3 Bakterien im bovinen Genitaltrakt

2.3.1 Pathogene im bovinen männlichen Genitaltrakt

In den letzten Jahrzehnten konnte man die Übertragung von anzeigepflichtigen Deckseuchen beim Rind erheblich einschränken (Eaglesome & Garcia 1997). Dies ist zum einen durch die Einführung der künstlichen Besamung, zum anderen durch die konsequente mikrobiologische und serologische Untersuchung von Zuchtbullen zu erklären.

Bullen in Besamungsstationen werden mindestens jährlich auf eine Infektion mit venerisch übertragbaren Deckseuchen untersucht. Die Richtlinie 88/407/EWG der Europäischen Union macht verbindliche Vorgaben bezüglich des Untersuchungsumfangs und der Untersuchungsart (EU Richtlinie 88/407 1988).

Im Fokus dieser Untersuchungen liegt die Identifizierung von vor allem *Campylobacter fetus venerealis*, *Leptospira spp.*, *Brucella abortus*, *Mycobacterium bovis*, *Mycoplasma spp.*, und *Coxiella burnettii* (Heinemann et al. 2000, Nardi Junior et al. 2017, Haapala et al. 2018). Eine Infektion mit *Campylobacter fetus venerealis* beispielsweise führt beim männlichen Tier nicht zu klinischen Symptomen. Infizierte Tiere können lebenslang inapparent infiziert sein (Bondurant 2005). *Campylobacter spp.* und *Brucella spp.* sind nach Kryokonservierung noch infektiös und können klinische Infektionen beim Rind auslösen (Bondurant 2005). Die Anwesenheit von Bakterien im Ejakulat führt zu einer erhöhten Rate an fragmentierter DNA der Spermien, wodurch die Spermienqualität und damit die Zahl fertiler Spermien reduziert wird (Gonzalez-Marin et al. 2011).

Neben diesen bakteriellen Erregern können auch Viren und Protozoen übertragen werden. Als virale Erreger sind das *bovine-Herpes-Virus-1 (BHV1)*, das *bovine-Virus-Diarrhoe-Virus* und das *bovine Leukose-Virus* zu nennen (Silva et al. 2000). Das *BHV1* repliziert in der Schleimhaut des Präputiums und der Urethra, weshalb es somit bei infizierten Bullen aus dem Seminalplasma isoliert werden kann (Wrathall et al. 2006). Die Anwesenheit des Virus inhibiert die Bindung des Spermiums an die *Zona pellucida* der Oozyte, sodass die Fertilität verringert wird (Tanghe et al. 2005).

Der bedeutendste venerisch übertragbare protozoäre Parasit ist *Tritrichomonas fetus* (Michi et al. 2016). Die Untersuchung der Bullen auf *Tritrichomonas fetus* findet via Präputialspülprobe statt (EU Richtlinie 88/407 1988). In einer Untersuchung wurde gezeigt, dass die Anwesenheit von *Tritrichomonas fetus* zusätzlich zu einer Schädigung der Spermien durch Adhäsion und teilweise Phagozytose führt und somit zur Verringerung der Fruchtbarkeit (Benchimol et al. 2008).

Die meisten der genannten Deckseuchen sind anzeigepflichtig und obliegen damit besonderen gesetzlichen Regelungen. Viele der meist bakteriellen Erreger, wie beispielsweise *Coxiella burnettii*, sind auch zoonotisch bedeutsam (Eldin et al. 2017).

Aufgrund der Vielfalt dieser oben genannten bakteriellen Erreger werden Spermaportionen für die künstliche Besamung mit mehreren antimikrobiellen Wirkstoffen versetzt, um ein sicheres Produkt zu garantieren (Shin et al. 1988). Die Richtlinie 88/407/EWG gibt vor, welche Wirkstoffe in der Regel zu verwenden sind. Üblich ist die Kombination von Streptomycin (500 Internationale Einheiten (IE)/ml), Penicillin (500 IE/ml), Lincomycin (150 mg/ml) und Spectinomycin (300 mg/ml). Streptomycin und Spectinomycin als Aminoglykoside hemmen durch Bindung an die 30S-Untereinheit der Ribosomen die Proteinbiosynthese von gram-positiven und -negativen Bakterien (Noah et al. 1999). Lincomycin wirkt ebenfalls inhibierend auf die Proteinbiosynthese, da es an die 50S-Untereinheit prokaryontischer Ribosomen bindet. Lincomycin hat ein breites Wirkspektrum gegen gram-positive Bakterien und wirkt, je nach Konzentration, bakteriostatisch bis bakterizid (Spizek & Rezanka 2017). Penicillin gehört zu den β -Lactam-Antiinfektiva und wirkt bakteriostatisch, indem es die Zellwandsynthese gram-positiver Bakterien inhibiert (Bush & Bradford 2016).

Die EU-Richtlinie 88/407 besagt, dass auch andere antibiotische Wirkstoffe genutzt werden dürfen, solange ein wirksamer Schutz gegen *Campylobacter spp.*, *Leptospira spp.* und *Mycoplasma spp.* gewährleistet ist. Nachdem die Spermien mit den Wirkstoffen versetzt wurden, müssen die Pailletten für mindestens 45 Minuten bei mindestens 5° C inkubiert werden, bevor diese dann in flüssigem Stickstoff kryokonserviert werden (EU Richtlinie 88/407 1988). Diese Inkubationszeit dient der Eliminierung potenziell vorhandener Bakterien vor der Kryokonservierung. Diese heutzutage übliche antibiotische Wirkstoffkombination und das Einfrierprotokoll gewährleistet meistens, dass keine Krankheiten über Sperma-Pailletten übertragen werden (Givens 2018). Allerdings zeigen andere Studien auf, dass der Zusatz von Antiinfektiva zu Resistenzbildungen von Bakterien beitragen kann, oder einige Spezies sogar primär resistent sind. Es wurde gezeigt, dass durch die üblicherweise genutzten Wirkstoffe kein verlässlicher Schutz gegen *Mykoplasma bovis* erreicht wird (Visser et al. 1999, Haapala et al. 2018). In einer anderen Studie wurden Resistenzen von gram-negativen Erregern gegen den Wirkstoff Tylosin gefunden, welcher ebenfalls Anwendung findet (Kilburn et al. 2013). Als häufig primär resistente Spezies ist *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* zu nennen (Ayele et al. 2004).

Darüber hinaus wurde gezeigt, dass einige Wirkstoffe die Motilität von Spermien beeinflussen und somit potenziell negative Auswirkungen auf den Besamungserfolg haben könnten (Guerin & Thibier 1993, Gloria et al. 2014).

2.3.2 Kommensale Bakterien im männlichen Genitaltrakt

Das Wissen über kommensale Bakterien im bovinen männlichen Genitaltrakt ist bisher sehr gering. Im Gegensatz zu pathogenen standen apathogene Spezies nie im Mittelpunkt der Forschung, weshalb keine Untersuchungen darüber vorliegen.

Eine veterinärmedizinische Untersuchung konnte zeigen, dass die mikrobiologische Kontamination im Ejakulat deutlich reduziert werden kann, wenn der Penis von Büffeln vor der Absamung gründlich mit entweder Sialinen oder Kaliumpermanganat gereinigt wird (Meena et al. 2015). In dieser Studie wurden jedoch keine bakteriellen Spezies, sondern nur die Gesamtkeimzahl bestimmt.

In der humanmedizinischen Forschung hingegen liegen bereits erste Studien über solche kommensalen Bakterien vor. Es wurden mikrobiologische Untersuchungen bei gesunden Männern und bei an Prostatitis erkrankten Probanden durchgeführt. Hier stellte man *Lactobacillus (L.) spp.* vermehrt bei gesunden Probanden fest, während erkrankte Probanden eine größere mikrobiologische Diversität aufwiesen. 27 % der gesunden Männer wiesen größtenteils *Lactobacillus spp.* im Seminalplasma auf, während der Prozentsatz bei erkrankten Männern nur 20,2 % betrug. Auch die mikrobiologische Diversität war bei Patienten mit Prostatitis höher als bei gesunden Probanden (Mandar et al. 2017). Eine andere humanmedizinische Studie wies mit 19,9 % der untersuchten Ejakulate am häufigsten *Lactobacillus spp.* im Seminalplasma nach. Es wurden Assoziationen zwischen der Menge der isolierten Milchsäurebakterien und der Spermaqualität gezeigt. Bei Probanden, bei denen größtenteils *Lactobacillus spp.* isoliert wurden, zeigten die Spermien im Ejakulat eine höhere Motilität (Weng et al. 2014). Eine weitere Studie über das humane Ejakulat konnte keinen Zusammenhang zwischen der mikrobiologischen Beschaffenheit und pathologischen Veränderungen von Spermienparametern zeigen. Spermien wurden hierfür entweder mit *Prevotella spp.* oder mit *Lactobacillus spp.* ko-kultiviert (Baud et al. 2019).

Patienten, die an Asthenozoospermie litten, nahmen über einen Zeitraum von maximal 6 Wochen *L. rhamnosus* und *Bifidobacterium longum* oral auf. Eine anschließende Untersuchung der Spermien zeigte, dass die orale Aufnahme dieser Bakterien zu verbesserten Fertilitätsparametern führte. Die Gesamtmotilität der Spermien erhöhte sich um das Sechsfache. Auch die Menge an Spermien mit DNA-Fragmentation war um das 1,2-fache geringer und die Konzentration an intrazellulärem Wasserstoffperoxid (H_2O_2) verringerte sich um mehr als das Dreifache (Valcarce et al. 2017).

Bei anderen Spezies wurden kürzlich erste Studien durchgeführt, die sich mit kommensalen Bakterien im Ejakulat befassen. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass in nahezu 30 % der Ejakulate, die vom Zuchteber gewonnen wurden, Milchsäurebakterien vorhanden sind (Schulze et al. 2018).

In Ko-Kultur-Experimenten von *L. acidophilus*, isoliert aus dem aviären Gastrointestinaltrakt, mit Truthahn-Spermien zeigte sich ein nahezu vollständiger Verlust der Spermienmotilität (Triplett et al. 2016).

2.3.3 Milchsäurebakterien

Die Ordnung der Milchsäurebakterien (*Lactobacillales*, „lactic acid bacteria“) ist eine große, heterogene Ordnung mit insgesamt sechs Familien und etwa 40 Gattungen. Sie wird zur Abteilung der *Firmicutes* und zur Klasse der *Bacilli* gezählt. Zu dieser Ordnung gehören die Familie der *Streptococcaceae*, *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Leuconostocaceae*, *Carnobacteriaceae* und *Aerococcaceae*. Die genaue Evolution der *Lactobacillales* wurde in den letzten Jahren durch molekularbiologische Verfahren detaillierter aufgeklärt (Salvetti et al. 2013, Andam & Hanage 2015, Papizadeh et al. 2017). In **Abbildung 1** ist die Ordnung mit dazugehörigen Familien und relevanten Gattungen vereinfacht dargestellt:

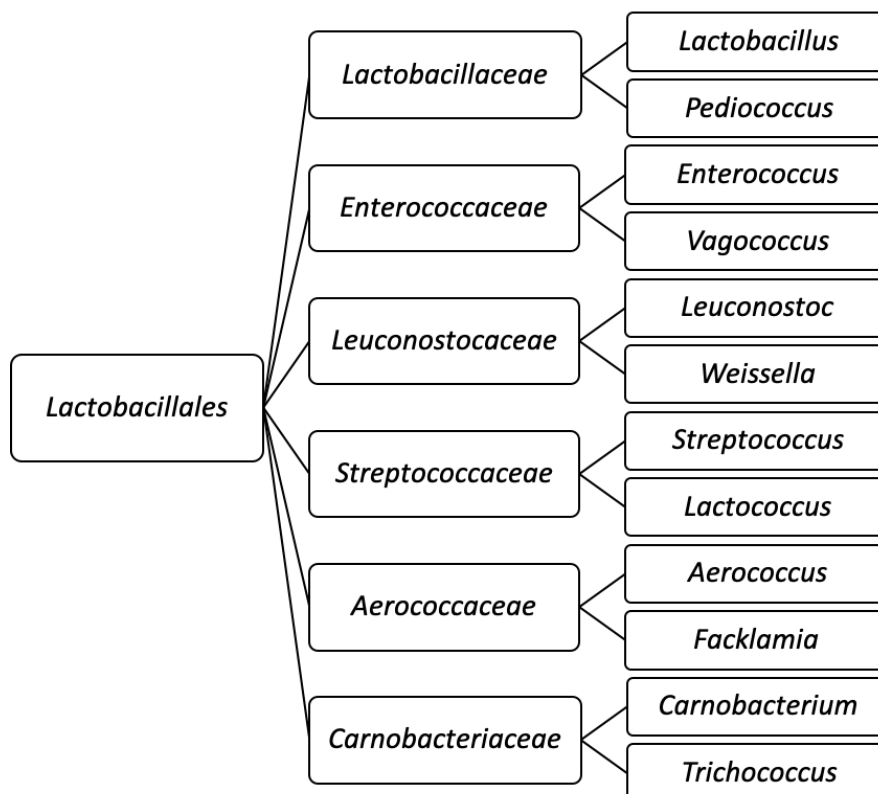


Abbildung 1: Schematische Systematik der Ordnung *Lactobacillales* mit den 6 Familien und einigen relevanten Gattungen (Ludwig et al. 2009).

Lactobacillales sind gram-positiv und morphologisch sehr heterogen. *Lactobacillales* wachsen meist unter fakultativ anaeroben Bedingungen. Sie bilden keine Sporen aus und sind relativ tolerant gegenüber niedrigen pH-Werten. Die Gemeinsamkeit aller zu dieser Ordnung gehörenden Familien liegt in der Synthese von Laktat im Abbau von Glucose. Einige Gattungen synthetisieren zusätzlich zum Laktat noch Ethanol und Kohlenstoffdioxid (CO₂). Für die Diagnostik ist wichtig, dass Milchsäurebakterien in der Regel keine Katalase bilden. Morphologisch existieren stäbchenförmige (z.B. *Lactobacillus*), kokkoide (z.B. *Aerococcus*) und ovoide Gattungen (z.B. *Leuconostoc*). Wie für *Firmicutes* charakteristisch, besteht das Genom nur zu etwa 30-40 % aus den Basen Guanin und Cytosin (Ludwig et al. 2009).

Milchsäurebakterien haben besondere Ansprüche bezüglich ihres Nährstoffbedarfs, weshalb sie spezielle Nährmedien für die Anzucht benötigen. Trotz dieser Ansprüche sind sie nahezu ubiquitär vorhanden. Bei Säugetieren sind viele Gattungen im Gastrointestinaltrakt zu finden (Kim & Adachi 2007, Hernandez et al. 2008). Auch auf anderen Schleimhäuten, wie beispielsweise in der Vagina, existieren Milchsäurebakterien und werden partiell als Arzneimittel genutzt (Mokoena 2017).

Milchsäurebakterien sind durch die Bildung von Laktat in der Lage, den pH-Wert ihres Milieus zu senken, sodass das Wachstum anderer Bakterien gehemmt wird. Man bezeichnet sie deshalb als azidophil, beziehungsweise als azidurisch (Cai et al. 2012). Auf diese Weise kann in deren Anwesenheit zum Beispiel das Wachstum von *Clostridium spp.* unterdrückt werden (Bohn et al. 2017).

Zusätzlich zur Bildung von Laktat produzieren einige *Lactobacillales* weitere Moleküle mit bakterizider Wirkung. Als Beispiel wäre die Synthese von H₂O₂ zu nennen (Kovachev 2018). Einige andere Bakteriozine sind in den letzten Jahren entdeckt worden (Tachedjian et al. 2017). Bakteriozine der Milchsäurebakterien werden aufgrund ihrer Struktur und Funktion in 3 Klassen unterteilt:

Die Bakteriozine der Klasse 1 bilden die sogenannten Lantibiotika, wozu das Lactocin mit dessen bakterizider Wirkung gegen *Listeria monocytogenes* zählt (Melian et al. 2019).

Bakteriozine der Klasse 2 werden teilweise in Untergruppen eingeteilt. Das *Acidocin B* als ein Vertreter dieser Bakteriozine verursacht Änderungen der Membranpermeabilität und der Integrität der Zellwand von gram-positiven Bakterien. *Acidocin B* wird von einigen *Lactobacillus spp.* synthetisiert und besitzt eine Größe von ca. 5 kDa (Acedo et al. 2015).

Die, bezogen auf das Molekulargewicht, größeren Bakteriozine zählen zu denen der Klasse 3. Hierzu zählt das *Lysostaphin* und das *Enterolysin A*. *Lysostaphin* wurde bereits *in vivo* zur Therapie von Infektionen mit *Staphylococcus aureus* eingesetzt (Ceotto-Vigoder et al. 2016). *Enterolysin A* wird von *Enterococcus spp.* synthetisiert und hemmt die Zellwandsynthese anderer gram-positiver Spezies (Khan et al. 2013).

Auf Schleimhäuten von Säugetieren bilden Milchsäurebakterien Biofilme, welche ebenfalls Schutz vor Adhäsion von potenziellen Pathogenen bieten (Filardo et al. 2019).

Für einige Gattungen innerhalb der Ordnung *Lactobacillales*, v.a. bei *Streptococcus spp.*, sind pathogene Wirkungen bzw. Virulenzfaktoren bekannt (Barnett et al. 2015).

α-hämolyzierende Streptococcus spp. wurden aus infizierten Uteri des Rindes isoliert und werden mit einer verlängerten Zwischenkalbezeit assoziiert (Sens & Heuwieser 2013).

2.3.4 Milchsäurebakterien im bovinen Uterus

Im Gegensatz zum bovinen männlichen Genitaltrakt existieren erste Untersuchungen über Milchsäurebakterien im bovinen weiblichen Genitaltrakt. *Lactobacillus spp.* wurden bereits vor

Längerem in der Vaginalflora von Kühen, ähnlich der humanen Vaginalflora, identifiziert (Rodriguez et al. 2011, Swartz et al. 2014). Auch wurden *Lactobacillus spp.* aus dem Uteruslumen von Milchkühen isoliert (Messier et al. 1984, Gärtner et al. 2015).

Allerdings wurde der Einfluss dieser Bakterien auf die Uterusgesundheit lange Zeit nicht im Detail erforscht. Erst kürzlich wurden Studien diesbezüglich veröffentlicht (Genis et al. 2018, Peter et al. 2018). Eine ältere Studie zeigte, dass *Lactobacillus spp.* 12 Tage nach intrauteriner Applikation eine Infiltration von Immunzellen in das Endometrium hervorruft (Kummer et al. 1997).

Genis et al. (2018) fanden heraus, dass die intravaginale Applikation von Milchsäurebakterien vor der Kalbung das Risiko, an einer Metritis zu erkranken, um bis zu 58 % senkt. Hingegen war die Metritis-Prävalenz nach intrauteriner Applikation genauso hoch wie bei Kontrolltieren. Peter et al. (2018) konnten in einer Studie positive Ergebnisse über den Einfluss von *L. buchneri* auf die Fruchtbarkeitsergebnisse von Kühen mit subklinischer Endometritis veröffentlichen. In dieser klinischen Studie wurden Kühe 24 bis 30 Tage post partum auf das Vorliegen einer subklinischen Endometritis untersucht. Gleichzeitig wurde den Kühen dann etwa 2×10^{10} koloniebildende Einheiten (kbE) *L. buchneri* in den Uterus instilliert. Die Tiere, die mit dem Bakterium behandelt wurden, hatten eine deutlich kürzere Gützeit und einen signifikant geringeren Besamungsindex als Kontrolltiere, denen als Placebo 20 ml Natriumchlorid (NaCl) in den Uterus instilliert wurden. Dieser Effekt wurde durch die immuno-modulatorischen Eigenschaften der Bakterien erklärt. Außerdem wurde die mRNA-Expression endometrialer Epithelzellen bezüglich pro-inflammatorischer Chemokine untersucht. Hier wurde festgestellt, dass *L. buchneri* nach einer Woche zu einem Anstieg der mRNA-Expression pro-inflammatorischer Faktoren führte, aber nach drei Wochen eine Verminderung der mRNA-Expression bewirkte. Allerdings führte die Applikation von *L. buchneri* nicht zu einer Heilung der subklinischen Endometritis, sondern nur zu den genannten Veränderungen der Fruchtbarkeitsraten. In *in-vitro*-Untersuchungen, bei denen endometriale Epithelzellen für bis zu 6 Stunden mit *L. buchneri* ko-kultiviert wurden, konnte gezeigt werden, dass die mRNA-Expression einiger pro-inflammatorischer Faktoren, verglichen mit Kontrollzellen, unverändert war (Gärtner et al. 2015).

Diese Studienergebnisse lassen die immuno-modulatorischen Effekte solcher kommensalen Bakterien im bovinen Reproduktionstrakt erkennen.

2.4 Immunologische Vorgänge im Endometrium bei Infektionen

Durch den Prozess der Kalbung kommt es zwangsläufig zu einer bakteriellen Kontamination des Uterus, welche bei 90 % aller untersuchten Tiere nachweisbar ist (Sheldon & Dobson 2004, Prunner et al. 2014). Dadurch findet im klinischen Puerperium immer eine physiologische Entzündungsreaktion statt. Die physikalischen und chemischen Barrieren, wie

zum Beispiel das kollagenhaltige Epithel der *Cervix uteri* oder der uterine Mucus, werden zum Zeitpunkt der Kalbung unterbrochen (Bondurant 1999). Zusätzlich spielen immunologische Veränderungen während der Trächtigkeit eine Rolle im Entzündungsgeschehen. Zu Beginn und in der Mitte der Trächtigkeit ist die Zahl von Immunzellen im Uterus verringert, um den heranwachsenden Fetus vor dem maternalen Immunsystem zu schützen (Hansen 1995). Im letzten Drittel der Trächtigkeit ist dieses Phänomen nur noch fokal in interkotyledonären Bereichen des Uterus zu beobachten, sodass Unterschiede in der Immunreaktion in verschiedenen Zonen des Uterus angenommen werden können (Wooding 1992).

Außerdem konnte gezeigt werden, dass Progesteron, das wichtigste trächtigkeitserhaltende Hormon, die Proliferation von Lymphozyten supprimiert und somit zu einer temporären Veränderung des erworbenen Immunsystems führt (Herath et al. 2006). Die Uterusinvolution und die Regenerationsfähigkeit des Endometriums spielen ebenfalls eine Rolle während des Heilungsprozesses, nachdem durch die Kalbung ein hochgradiges Gewebstrauma hervorgerufen wurde. Dieses Trauma führt zwangsläufig zum Austritt von Blutbestandteilen in das Gewebe, welche von Zellen des angeborenen Immunsystems phagozytiert werden müssen.

Auf zellulärer Ebene bildet das endometriale Epithel die erste Barriere gegen eingewanderte Bakterien. Die Anwesenheit pathogener Bakterien führt zu einer Aktivierung des lokalen Immunsystems (Bondurant 1999). Dies führt beispielsweise bei Anwesenheit von Lipopolysacchariden gram-negativer Bakterien zu einer sofortigen Rekrutierung von Zellen des angeborenen Immunsystems (Murphy et al. 2009).

Zellen des Immunsystems, aber auch Epithelzellen besitzen „pathogen-erkennende Rezeptoren“ auf ihrer Oberfläche. Diese Rezeptoren erkennen spezifische Strukturen, welche als „Pathogen-assoziierte-molekulare-Muster“ zusammengefasst werden (Beutler 2009). Außerdem ist das lokale Immunsystem in der Lage, auch „Schaden-assoziierte-molekulare-Muster“ von geschädigten Epithelzellen zu erkennen (Sheldon et al. 2014). Bakterielle Oberflächen werden durch Toll-like-Rezeptoren (TLR) von endometrialen Epithelzellen erkannt. Diese Rezeptoren sind in der Lage, Lipopolysaccharide (LPS) von gram-negativen, und Zellwandbestandteile gram-positiver Bakterien zu erkennen (Beutler 2009).

In einer *in-vitro*-Untersuchung wurde gezeigt, dass die TLR1 bis TLR10 von bovinen endometrialen Epithel- und Stromazellen exprimiert werden (Davies et al. 2008). Im bovinen Endometrium scheinen v.a. die TLR1, 2 und 6 eine bedeutende Rolle zu spielen (Turner et al. 2014).

Das Erkennen von einwandernden Bakterien ist essenziell, um eine Immunreaktion hervorrufen zu können, da Epithelzellen erst dann vermehrt pro-inflammatorische Moleküle synthetisieren (Galvao et al. 2011). Diese Cytokine wirken chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten und Makrophagen, welche die vorhandenen Bakterien eliminieren

(Sheldon et al. 2009). Eine Verminderung peripherer neutrophiler Granulozyten wurde in einer Untersuchung mit der Entstehung von uterinen Erkrankungen assoziiert (Islam et al. 2017). An Endometritis erkrankte Kühe exprimieren mRNA pro-inflammatorischer Cytokine signifikant höher als geschlechts gesunde Tiere (Peter et al. 2015). Störungen in Ausmaß und Dauer dieser entzündlichen Prozesse werden also als Ursache für pathologische Prozesse angesehen (Jabbour et al. 2009).

2.5 Endometriale Zellkultur

Die Kultivierung boviner endometrialer Epithelzellen ist seit Langem möglich und wurde immer weiter modifiziert (Figge 1960, Gärtner et al. 2015). Auf diese Weise können primäre Reaktionen des Endometriums auf Bakterien *in vitro* untersucht werden. Da auf Gewebe von Schlachttieren zurückgegriffen wird, sind hierfür keine potentiell invasiven Untersuchungen *in vivo* nötig. Dieses Modellsystem hat sich für die Untersuchung von Bakterien bewährt, um zwischen pathogenen und kommensalen Spezies zu unterscheiden.

Durch solche Epithelzell-Monokulturen können zwar immunologische Prozesse der Endometriumzellen im Detail untersucht werden, aber durch die fehlende Untersuchungsmöglichkeit interzellulärer Mechanismen sind der Monokultur von endometrialen Epithelzellen wiederum Grenzen gesetzt (Sheldon et al. 2010). Jedoch wurden in neueren Untersuchungen dreidimensionale Modelle des Endometriums angelegt, welche allerdings einen erheblich höheren Aufwand benötigen (MacKintosh et al. 2015).

In einer Untersuchung über den Einfluss von *Trueperella (T.) pyogenes* auf das Endometrium wurde festgestellt, dass die Zugabe von mononukleären Zellen des peripheren Blutes („peripheral blood mononuclear cells“; PBMC) zu infizierten endometrialen Epithelzellen eine gesteigerte mRNA-Expression pro-inflammatorischer Faktoren, wie *IL6* und *IL8*, zur Folge hat, verglichen mit infizierten Epithelzellen ohne die Anwesenheit der PBMCs (Ibrahim et al. 2017). Im Gegensatz zu Zellkulturen besteht die Möglichkeit, Gewebe-Explants als Modell heranzuziehen. Allerdings kann hierbei nicht zwischen den immunologischen Reaktionen der unterschiedlichen Zelltypen unterschieden werden, da hier die Bakterien auch immunologische Prozesse der subepithelialen Zellen stimulieren (Borges et al. 2012).

In zahlreichen Studien wurde durch endometriale Epithelzellkulturen die Pathogenität von Bakterien und die darauffolgende immunologische Zellantwort *in vitro* untersucht. Durch die quantitative Bestimmung der mRNA-Expression der Epithelzellen konnte deren endokrine Immunkompetenz als Reaktion auf anwesende Bakterien und LPS dargelegt werden (Sheldon et al. 2010, Gärtner et al. 2015, Ibrahim et al. 2017). Zusätzlich kann durch einen „enzyme-linked-immunosorbent-assay“ (ELISA) die endometriale Synthese pro-inflammatorischer Zellmediatoren, wie zum Beispiel *IL8* und Prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$), nachgewiesen werden (Gärtner et al. 2015).

2.6 Pro-inflammatorische Cytokine, Chemokin-Liganden und Enzyme

Neben den genannten Zellen des Immunsystems sind lokale Abwehrmechanismen des Endometriums essenziell für die Initiierung einer primären Immunreaktion. Zu diesen Molekülen gehören die Cytokine, spezifische Chemokin-Rezeptoren und Prostaglandin-Endoperoxid-Synthasen, welche im Folgenden näher beschrieben werden.

2.6.1 Cytokine

Zur Gruppe der Cytokine gehören unter anderem die Interleukine, die Interferone und die Chemokine. Sie spielen sowohl bei Immunreaktionen als auch im Sexualzyklus eine bedeutende Rolle (Stassi et al. 2017). Cytokine werden von Zellen des Immunsystems und nahezu von allen anderen Epithelien synthetisiert. Sie führen zu einer unverzüglichen Chemotaxis von Immunzellen, um Noxen zu eliminieren (Tecchio et al. 2014).

2.6.1.1 Interleukin 6

IL6 wird meist von Zellen des unspezifischen Immunsystems synthetisiert und bewirkt die Bildung von Akute-Phase-Proteinen (Ramadori & Christ 1999). Es hat ein Molekulargewicht von 20,7 kDa (Hirano et al. 1986). IL6 wird aber auch in anderen Geweben, wie zum Beispiel im endometrialen Epithel, synthetisiert (Fischer et al. 2010, Sheldon et al. 2010, Gärtner et al. 2016). IL6 hat eine pyretische Wirkung auf den Organismus von Säugetieren.

Inwieweit IL6 in der Physiologie des Sexualzyklus beim Rind beteiligt ist, ist noch ungeklärt. Fischer et al. (2010) konnten zumindest keine zyklusabhängigen Differenzen bezüglich der *IL6*-mRNA-Expression feststellen. Eine andere Untersuchung wies eine erhöhte *IL6*-mRNA-Expression in zystisch veränderten Ovarfollikeln nach (Stassi et al. 2017).

Allerdings konnte mehrfach gezeigt werden, dass das endometriale Epithel von Kühen, die an einer klinischen oder subklinischen Endometritis leiden, *IL6* höher exprimiert (Fischer et al. 2010, Peter et al. 2015). In endometrialen Biopaten von Kühen, die an einer klinischen Endometritis erkrankt waren, war die *IL6*-Konzentration bereits eine Woche nach der Abkalbung höher als bei gesunden Kontrolltieren (Galvao et al. 2011). Auch gibt es Untersuchungen darüber, dass die Messung der *IL6*-Konzentrationen im peripheren Blut Aussagen über die uterine Gesundheit zulässt und damit als potentieller Indikator für uterine Erkrankungen dienen könnte (Ishikawa et al. 2004).

Bei der Kultur boviner endometrialer Epithelzellen *in vitro* konnte nach Ko-Kultur mit verschiedenen Bakterien ein Anstieg der *IL6*-mRNA-Expression detektiert werden. *L. ruminis* und *L. amylovorus* führten zu einem signifikanten Anstieg der *IL6*-mRNA-Expression, während *L. buchneri* nicht zu solchen Veränderungen führte. (Gärtner et al. 2015). Nicht nur lebende Bakterien, sondern auch hitze-inaktivierte *T. pyogenes* und LPS von *Escherichia (E.) coli*

fürten innerhalb 24 Stunden zu einer mehr als 100-fach erhöhten IL6-Freisetzung endometrialer Epithelzellen (Borges et al. 2012).

2.6.1.2 Interleukin 8

Chemokin-X-Ligand-8 (CXCL8), auch IL8, ist ebenfalls als wichtiger inflammatorischer Mediator zu sehen, da IL8 eine starke Wirkung auf neutrophile Granulozyten hat und somit ebenfalls chemotaktisch aktiv ist (Zerbe et al. 2003, Galvao et al. 2011). IL8 hat ein Molekulargewicht von 8,4 kDa und wird hauptsächlich von Monozyten, T-Lymphozyten, aber auch vom endometrialen Epithel gebildet (Baggiolini & Clark-Lewis 1992, Monaco et al. 2002, Gabler et al. 2010).

Die *IL8*-mRNA-Expression des Endometriums war bei klinisch gesunden Kühen 2 Wochen nach der Abkalbung signifikant höher als 9 Wochen post partum (Chapwanya et al. 2009). Dies deutet darauf hin, dass die *IL8*-mRNA-Expression physiologischen Schwankungen im Puerperium unterliegt.

Die Untersuchung von bovinem Uterussektret via ELISA zeigte, dass IL8 von entzündetem Gewebe in größerer Menge synthetisiert wird als in gesunden Uteri (Adnane et al. 2017).

Die *IL8*-mRNA-Expression korreliert positiv mit der Anzahl vorhandener neutrophiler Granulozyten im Endometrium (Fischer et al. 2010). Im Gegensatz dazu konnte bei Kühen, die dreimal erfolglos besamt wurden, im Vergleich zu Kontrolltieren keine Erhöhung der *IL8*-mRNA-Expression detektiert werden (Wagener et al. 2017). Kühen mit subklinischer Endometritis, denen intrauterin *L. buchneri* verabreicht wurde, hatten 3 Wochen nach Applikation eine signifikant geringere endometriale *IL8*-mRNA-Expression (Peter et al. 2018). Auch *in vitro* konnte eine Erhöhung der *IL8*-mRNA-Expression detektiert werden, nachdem endometriale Epithelzellen mit Bakterien, wie *L. ruminis* und *L. amylovorus*, ko-kultiviert wurden, während *L. buchneri* keine signifikante Erhöhung bewirkte (Gärtner et al. 2015). Die *IL8*-mRNA-Expression von endometrialen Epithelzellen, die mit *T. pyogenes* ko-kultiviert wurden, war ebenfalls signifikant erhöht und wurde durch die Anwesenheit von PBMCs amplifiziert (Ibrahim et al. 2017). Die Zugabe von purifizierten LPS führte zu einem starken Anstieg der IL8-Synthese, der via ELISA im Zellkulturüberstand festgestellt wurde (Sheldon et al. 2010).

2.6.2 Chemokin-Liganden

Wie schon erwähnt, spielen Chemokine eine entscheidende Rolle bei der Initiierung eines Entzündungsgeschehens durch die Chemotaxis von Zellen des angeborenen Immunsystems. Dies ist essenziell, da nur neutrophile Granulozyten und Makrophagen in der Lage sind, Bakterien und Zelldetritus zu phagozytieren (Zerbe et al. 2003).

Hierfür sind besonders die Chemokin-X-Liganden (CXCL) 1/2, CXCL3 und CXCL5 mit einem Molekulargewicht von 8 bis 14 kDa zu erwähnen (Fernandez & Lolis 2002). Die Familie der Chemokin-X-Liganden wirkt stark chemotaktisch, indem sie alle an dem Chemokin-X-Rezeptor 2 von Zellen des Immunsystems binden (Addison et al. 2000). Dieser Vorgang bewirkt eine Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten (Moser & Willmann 2004).

Bezüglich des physiologischen Sexualzyklus des Rindes konnte gezeigt werden, dass die CXCL5-mRNA-Expression im Endometrium während der prä-ovulatorischen Phase signifikant höher war als während der Lutealphase und somit zyklusabhängigen Schwankungen unterliegt (Fischer et al. 2010).

Eine erhöhte CXCL5-mRNA-Expression wurde in endometrialen Bürstchenproben von Kühen mit subklinischer Endometritis festgestellt. Die CXCL5-mRNA-Expression korrelierte positiv mit der Anzahl an neutrophilen Granulozyten (Gabler et al. 2010). In Untersuchungen über die mRNA-Expression von Epithelzellen in entzündeten Uteri wurde gezeigt, dass die CXCL1/-2- und CXCL3-mRNA-Expression deutlich höher war als bei gesunden Tieren (Gärtner et al. 2016). Hingegen war die CXCL1/-2- und CXCL3-mRNA-Expression von Kühen mit subklinischer Endometritis 3 Wochen nach Applikation einer *L. buchneri*-Lösung signifikant geringer als bei Kontrolltieren (Peter et al. 2018).

In vitro wurde bereits nach 2 Stunden eine signifikante Erhöhung der CXCL1/-2- und CXCL3-mRNA-Expression endometrialer Epithelzellen detektiert, die mit der potentiell pathogenen Spezies *Bacillus pumilus* ko-kultiviert wurden (Gärtner et al. 2016).

2.6.3 Prostaglandin-Endoperoxid-Synthasen

Arachidonsäure wird durch die Phospholipase A₂ von der Zellmembran abgespalten und von weiteren Enzymen zu verschiedensten Endzündungsmediatoren metabolisiert. Prostaglandin-Endoperoxid-Synthasen (PTGS), auch Cyclooxygenasen genannt, werden im Organismus nahezu ubiquitär exprimiert und sind seit Langem Gegenstand der Pharmakotherapie (Simmons et al. 2004).

PTGS synthetisieren Prostaglandine, welche zur Gruppe der Lipidmediatoren gehören. Man unterscheidet die PTGS1 von der PTGS2, deren Bildungsort und Wirkung sich unterscheiden (Kniss 1999, Ramsay et al. 2003, Burdan et al. 2006). Die PTGS2 ist ein Glycoprotein mit einem Molekulargewicht von 72-74 kDa (Kniss 1999). PTGS2 wird in den meisten Organen unter physiologischen Bedingungen nur basal exprimiert (Tanabe & Tohnai 2002), aber beispielsweise Interleukine und Lipopolysaccharide gram-negativer Bakterien induzieren die Synthese von PTGS2 (Simmons et al. 2004).

Neben der Rolle der PTGS2 während eines inflammatorischen Geschehens spielt das Enzym eine entscheidende Rolle in der Reproduktion. Mäuse, die eine genetisch bedingte PTGS2-Defizienz aufweisen, sind infertil (Lim et al. 1997). Beim Rind hingegen konnte man, anders

als bei anderen pro-inflammatorischen Faktoren, keine zyklusabhängige Schwankung der endometrialen *PTGS2*-mRNA-Expression feststellen (Fischer et al. 2010). Jedoch war die *PTGS2*-mRNA-Expression 17 Tage nach der Kalbung signifikant höher als am Ende des klinischen Puerperiums 31 Tage nach der Kalbung, positiv korrelierend mit der Anzahl an neutrophilen Granulozyten (Gabler et al. 2010).

Kühe, die an einer klinischen Endometritis leiden, haben eine signifikant höhere endometriale *PTGS2*-mRNA-Expression als gesunde Tiere (Gabler et al. 2010). Bei gynäkologisch gesunden Kühen, die dreimalig erfolglos besamt wurden, wurde ebenfalls, im Vergleich zu fertilen Tieren, eine erhöhte endometriale *PTGS2*-mRNA-Expression festgestellt (Wagener et al. 2017).

In vitro führt die Anwesenheit von Bakterien, wie *L. amylovorus* und *L. ruminis*, zu einem signifikanten Anstieg der *PTGS2*-mRNA-Expression von endometrialen Epithelzellen, während *L. buchneri* keine Veränderungen bewirkt (Gärtner et al. 2015). Pathogene *E. coli* und deren LPS induzieren ebenfalls einen signifikanten Anstieg der *PTGS2*-mRNA-Expression in endometrialen Epithelzellen (Herath et al. 2006).

3 Arbeitshypothese und Aufgabenstellung

Kommensale Bakterien im Uterus des Rindes sind mittlerweile erforscht und erste Untersuchungen über deren therapeutisches Potenzial wurden durchgeführt. Im Gegensatz dazu haben solche apathogenen Bakterien im Genitaltrakt des Bullen bislang keine Rolle in der Forschung gespielt.

Es war die Aufgabe dieser Studie, das Wissen über kommensale Bakterien im Genitaltrakt von Bullen zu erweitern und deren Einflüsse auf Zellen des Reproduktionstraktes *in vitro* zu untersuchen.

Dafür sollten zuerst kommensale Bakterien sowohl aus bovinem Seminalplasma als auch von Schleimhäuten des Genitaltraktes isoliert werden. Nach erfolgreicher Identifikation und Kultivierung wurde der Einfluss dieser Bakterien auf bovine endometriale Epithelzellen und auf bovine Spermien im Detail untersucht. Im Fokus dieser Untersuchung standen vor allem Milchsäurebakterien, während pathogene Spezies hier nicht berücksichtigt wurden.

Für die mikrobiologischen Analysen wurden einerseits Seminalplasma von Zuchtbullen, andererseits Tupferproben von Präputium und Penisspitze geschlachteter Mastbullen untersucht. Bakterien sollten auf speziellen Selektiv-Agar-Platten kultiviert werden.

Die Untersuchungen über den Einfluss solcher Bakterien auf kultivierte bovine endometriale Epithelzellen beruhten auf mikroskopischer Zellviabilität und auf molekularbiologischen Techniken. Hierbei wurde vor allem die mRNA-Expression pro-inflammatorischer Cytokine, Chemokin-Liganden und Enzyme von Zellen quantifiziert, welche zuvor mit Milchsäurebakterien inkubiert und im Anschluss lysiert wurden. Alle Untersuchungen fanden grundsätzlich zu verschiedenen Zeitpunkten der Ko-Kultur und in unterschiedlichen bakteriellen Konzentrationen statt. Die mRNA-Expressionsanalysen fanden nach 2 bis 6 Stunden der Ko-Kultur statt, während die Untersuchung der Zellviabilität für einen Zeitraum von 24 bis 72 Stunden durchgeführt wurde.

Außerdem sollte der Einfluss solcher kommensalen Bakterien auf die Motilität boviner Spermien untersucht werden. Spermien wurden hierfür zusammen mit Bakterien inkubiert und die Vitalitätsparameter wurden mikroskopisch erhoben. Die progressive Motilität als wichtiger Parameter wurde über einen Zeitraum von 4 Stunden via computergestützter Spermienanalyse erhoben.

Durch diese *in-vitro*-Untersuchungen sollten Rückschlüsse auf ähnliche Effekte und deren Auswirkungen auf einen natürlichen Organismus *in vivo* geschlossen werden. Darüber hinaus sollte die Frage geklärt werden, ob in dieser Untersuchung isolierte Milchsäurebakterien das Potenzial besitzen, ähnlich wie beispielsweise *L. buchneri* aus dem bovinen Uterus, zur Therapie oder sogar zu Prophylaxe gegen Krankheiten des Reproduktionstraktes eingesetzt zu werden. Solch eine Anwendung hätte großes wirtschaftliches Potential und würde einen Beitrag zum Tierwohl leisten.

4 Material

4.1 Tiermaterial

Das für die Versuche genutzte Ejakulat wurde von Zuchtbullen gewonnen. Die Absamung der Bullen fand unter den gleichen Bedingungen statt, wie für die kommerzielle Samengewinnung üblich. Die Proben wurden vom RBB Rinderproduktion Berlin-Brandenburg in Groß Kreutz bereitgestellt. Die Absamung von Zuchtbullen findet für spermatologische Untersuchungen in regelmäßigen Abständen statt, weshalb diese Prozedur nicht primär für diese Studie stattfand. Die Nutzung der Proben wurde beim Landesamt für Arbeitsschutz, Verbraucherschutz und Gesundheit des Landes Brandenburg angezeigt und bestätigt. Es wurde ein Aktenzeichen mit der Nummer „2340-18-2019“ angelegt.

Da die Samengewinnung nicht invasiv ist und den Tieren keine Schmerzen zugefügt werden, war hierfür keine Genehmigung im Rahmen eines Tierversuchsantrages nötig.

Die Tupferproben von *Glans penis* und Präputialhöhle wurden von Mastbullen während des Schlachtprozesses unmittelbar nach der Entblutung im Schlachthof Teterow Danish Crown genommen.

Die Uteri für die Zellkultur von endometrialen Epithelzellen wurden ebenfalls am selbigen Schlachthof während des Schlachtprozesses unmittelbar nach dem Ausweiden der Tiere entnommen.

4.2 Geräte

Tabelle 2: Verwendete Geräte für diese Studie

Gerätebezeichnung	Name	Bezugsquelle	Firmensitz
Anaerobier-Topf	Anaerocult	Merck	Darmstadt
Agarose-Gelkammer	MIDI Plus Kammer	Carl Roth	Karlsruhe
Brutschrank für Bakterien	MIDI 40 CO ₂ Incubator	Thermo Scientific	Langenselbold
Brutschrank für die Zellkultur	BB 15	Thermo Scientific	Langenselbold
CASA-System	Androvision	Minitüb	Tiefenbach

Material

Gerätebezeichnung	Name	Bezugsquelle	Firmensitz
Fotometer	BioPhotometer NanoDrop ND-1000	Eppendorf peqLab	Hamburg Erlangen
Mikroskop	Axioskop 50	Carl Zeiss	Jena
Mikrowelle	Microstar MD 6459	MTC-Medion	Mühlheim/Ruhr
Schüttler	Thermomixer compact	Eppendorf	Hamburg
Polymerase- kettenreaktions- (PCR) Thermozykler	Mastercycler Gradient	Eppendorf	Hamburg
pH-Meter	Digital-pH-Meter	Knick Elektronische Messgeräte	Berlin
Pinzetten	Pinzetten, anatomisch	Carl Roth	Karlsruhe
Pipettierhilfe	Pipetus-akku	Hirschmann Laborgeräte	Eberstadt
Pipetten	Research	Eppendorf	Hamburg
Real-Time-PCR- Thermozykler	Rotor Gene RG-3000	Corbett Research	Mortlake, Australien
RNA-Extraktionsgerät	KingFisher Flex	Thermo Scientific	Langenselbold
Roller	SRT1	Bibby Sterilin	Staffordshire, Großbritannien
Ultraviolett- (UV) Kamerasystem	GeneGenius	Syngene	Cambridge, Großbritannien
Wasserbad	Julabo SW-20C	Julabo Labortechnik	Seelbach
Werkbank/Sterilbank	HERASafeKS	Thermo Scientific	Langenselbold
Zählkammer	Neubauer-Kammer	Hecht-Assistent	Sondheim
Zentrifugen	Biofuge fresco Labofuge 400R Centrifuge 5804 R	Heraeus Heraeus Eppendorf	Hanau Hanau Hamburg

4.3 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3: Verwendete Verbrauchsmaterialien für diese Studie

Produkt	Bezugsquelle	Firmensitz
CO ₂ -Anreicherung „Anaerocult“	Merck	Darmstadt
Inokulations-Ösen	Carl Roth	Karlsruhe
Makro-Küvetten (10 x 4 x 45 Millimeter (mm))	Sarstedt	Nürnberg
Objektträger	Carl Roth	Karlsruhe
Pasteur-Pipetten ohne Wattestopfen (Länge: 150 mm)	Carl Roth	Karlsruhe
Petri-Schalen (Durchmesser: 8,5 Zentimeter (cm))	Sarstedt	Nürnberg
Pipetten 10 ml (serologisch)	Sarstedt	Nürnberg
Pipettenspitzen mit Filter (1-10 Mikroliter (µl); 2-20 µl; 2-100 µl; 100-1000 µl; 1000-5000 µl)	Sarstedt	Nürnberg
Reaktionsgefäße für qPCR (0,1 ml)	LTF-Labortechnik	Wasserburg
Reaktionsgefäße (0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml)	Sarstedt	Nürnberg
Rundfilter	Carl Roth	Karlsruhe
Skalpelle	Braun	Melsungen
Spritzen (5 ml; 20 ml)	Braun	Melsungen
Sterilfilter (0,22 µm)	Carl Roth	Karlsruhe
Trigalski-Spatel	Carl Roth	Karlsruhe
Tupfer für die Mikrobiologie mit Nähragar	Sarstedt	Nürnberg
Zellkulturplatten (6er- und 24er-Vertiefungsplatten)	Sarstedt	Nürnberg

Material

Produkt	Bezugsquelle	Firmensitz
Zellkulturflaschen (Fläche: 7 und 21 Quadratcentimeter (cm ²))	Sarstedt	Nürnbrecht
Zellkulturflaschen (Fläche: 7 cm ²)	Corning	Corning, USA
Zellschaber	Sarstedt	Nürnbrecht
Zentrifugenröhrchen (15 ml; 50 ml)	Sarstedt	Nürnbrecht

4.4 Reagenzien

Tabelle 4: Verwendete Reagenzien für diese Studie

Substanz	Bezugsquelle	Firmensitz
Agarose	Biozym Scientific	Hess. Oldendorf
Amphotericin B (250 Mikrogramm (µg)/ml)	Biochrom	Berlin
AndroMed CSS	Minitüb	Tiefenbach
Biladyl, Komponente A und B	Minitüb	Tiefenbach
Desoxy-Nukleosidtriphosphate (dNTPs) (100 millimolare (mM) Lösungen)	Bioline	Luckenwalde
Diethyl-Pyrocbonat (DEPC)	Sigma	Deisenhofen
Dulbecco's MEM (DMEM)/Ham's- F12 mit Glutamin	Biochrom	Berlin
Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth	Karlsruhe
Essigsäure (99,9 % v/v)	Carl Roth	Karlsruhe
Ethanol (mind. 99,8 % v/v) (mind. 96 % v/v)	Carl Roth	Karlsruhe
Ethanol, HPLC Gradient Grade	Carl Roth	Karlsruhe
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	Carl Roth	Karlsruhe

Substanz	Bezugsquelle	Firmensitz
Eigelb-Emulsion (20 % v/v)	Carl Roth	Karlsruhe
Fötale Kälberserum	Biochrom	Berlin
Gentamycin (10 mg/ml)	Biochrom	Berlin
Glycerin (99,5 % v/v)	Carl Roth	Karlsruhe
Hanks' Salzlösung	Biochrom	Berlin
Lysis Puffer TLR	Qiagen	Hilden
Mercaptoethanol	Carl Roth	Karlsruhe
MRS-Agar nach deMan, Rogosa und Sharpe (pH 5,5) (Bestellnummer: X925.1)	Carl Roth	Karlsruhe
MRS-Bouillon nach deMan, Rogosa und Sharpe (pH 5,5) (Bestellnummer: X924.1)	Carl Roth	Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin 10.000 Units (U)/ml	Biochrom	Berlin
Phosphat-gepufferte Saline (PBS)	Sigma	Deisenhofen
Primer (siehe Tab. 8)	Eurofins	Ebersberg
Random Hexamere (50 mikromolar (μ M))	Thermo Scientific	Berlin
Rogosa SL Agar (pH 5,4) (Bestellnummer: R1148)	Sigma	Deisenhofen
Rogosa Agar (pH 5,4) (Bestellnummer: 105413)	Sigma	Deisenhofen
Rotiphorese 10x Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE) (Tris (0,4 molar (M), Essigsäure 0,2 M, EDTA 10 mM) (pH 8)	Carl Roth	Karlsruhe
Steridyl	Minitüb	Tiefenbach
Triladyl CSS	Minitüb	Tiefenbach
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Carl Roth	Karlsruhe

Material

Substanz	Bezugsquelle	Firmensitz
Trypanblau (0,5 % v/v)	Carl Roth	Karlsruhe
Tween 80 (10% v/v)	Carl Roth	Karlsruhe
H ₂ O ₂ (30 % v/v)	Carl Roth	Karlsruhe

4.5 Enzyme

Tabelle 5: Verwendete Enzyme für diese Studie

Methode	Produktname	Bezugsquelle	Firmensitz
DNA-Verdau	RQ1RNase-freie Desoxyribonuklease (DNase) (1 U/ μ l)	Thermo Scientific	Berlin
Muramidase	Lysozym	Sigma	Deisenhofen
Bindegewebe- Lyse	Kollagenase (100 mg/ml)	Biochrom	Berlin
Fibroblasten- Ablösung	Accutase	Sigma	Deisenhofen
Hyaluron-Lyse	Hyaluronidase (500 mg/ml)	Sigma	Deisenhofen
PCR	Immolase (5 U/ μ l)	Bioline	Luckenwalde
Real-Time-PCR	SensiMix (dt)	Bioline	Luckenwalde
Reverse Transkription (RT)	M-MLV Reverse Transkriptase (200 U/ μ l)	Thermo Scientific	Berlin

4.6 Kits

Tabelle 6: Verwendete Kits für diese Studie

Methode	Produktname	Bezugsquelle	Firmensitz
DNA-Extraktion aus Zellen	Qlamp DNA Mini Kit	Qiagen	Hilden
DNA-Extraktion aus Gel	Invisorb Fragment Clean Up	Stratec	Berlin
RNA-Extraktion aus Zell-Lysaten	InviMag RNA Universal Mini Kit KF96	Stratec	Berlin

4.7 Marker/Standards

Tabelle 7: Verwendete Marker/Standards für diese Studie

Methode	Produktname	Bezugsquelle	Firmensitz
Gel- Elektrophorese	50-Basenpaar- (bp) Marker	Biolabs	Frankfurt a.M.
Gel- Elektrophorese	100-bp-Marker	Biolabs	Frankfurt a.M.
Gel- Elektrophorese	1-Kilobasen-Marker	Biolabs	Frankfurt a.M.

4.8 Rezepte

Sofern nicht anders vermerkt, wurde durch Umkehrosmose und Ionenaustausch Reinstwasser für Lösungen verwendet. Dieses Wasser wurde in sterilen Behältnissen autoklaviert (121°C bei 3 bar für 20 Minuten). Nachfolgend wird dieses autoklavierte Reinstwasser nur als „H₂O“ bezeichnet. Wasser für die Durchführung von PCRs (PCR-H₂O) wurde zu je 1 ml in Reaktionsgefäßen autoklaviert und anschließend bis zur Benutzung bei -20° C eingefroren.

1 % (w/v)-DNA-Agarosegel mit

Ethidiumbromid

0,5 g Agarose

50 ml TAE-Puffer

In der Mikrowelle zum Sieden bringen

10 µl Ethidiumbromid hinzugeben

3 % H₂O₂

20 ml H₂O₂

180 ml H₂O

70 % Ethanol für die RNA-Extraktion

70 ml Ethanol, HPLC Gradient Grade

30 ml DEPC-H₂O, gut mischen und anschließend bei 121°C für 20 Minuten autoklavieren

AndroMed-Lösung

200 ml AndroMed CSS

780 ml H₂O

Biladyl-Lösung

49 g Lösung A

250 g Lösung B

Lösungen gut mischen

DEPC-H₂O

1 ml Diethyl-Pyrocbonat (DEPC)

1 l H₂O

gut mischen und anschließend bei 121°C für 20 Minuten autoklavieren

Desoxy-Nukleosidtriphosphate (10 mM)

10 µl 100 mM Desoxy-Adenosintri-phosphat

10 µl 100 mM Desoxy-Cytidintri-phosphat

10 µl 100 mM Desoxy-Guanidintri-phosphat

10 µl 100 mM Desoxy-Thymidintri-phosphat

60 µl PCR-H₂O

DNase-Reaktionsansatz (je 10 µl Probe)

4 µl 5x M-MLV RT-Puffer

6 µl PCR-H₂O

1 µl Ribonuklease-freie DNase (1 U/µl)

0,5 µg RNA

Epithelzellkulturmedium

500 ml DMEM Ham's F12

50 ml fötales Kälberserum

3 ml Gentamycin (10 mg/ml)

3 ml Amphotericin B (250 µg/ml)

Glycerin (86 % v/v)

87 ml Glycerin (99,5 % v/v)
13 ml H₂O
Anschließend bei 121°C für
20 Minuten autoklavieren

MRS-Agar für die Mikrobiologie

62 g MRS-Agar
1 l H₂O
Anschließend bei 121°C für
20 Minuten autoklavieren

MRS-Bouillon für die Mikrobiologie

52 g MRS-Bouillon
1 l H₂O
Anschließend bei 121°C für
20 Minuten autoklavieren

PCR-Reaktionsansatz (25 µl je Probe)

2,5 µl 10x iTaq-Puffer
0,75 µl MgCl₂ (50 mM)
0,5 µl dNTPs (je 10 mM)
0,5 µl Primer forward (20 µM)
0,5 µl Primer reverse (20 µM)
17,25 µl PCR-H₂O
0,1 µl iTaq-Polymerase (5 U/µl)
5 µl DNA

Hanks'-Lösung

500 ml Hanks' Balanced Salt Solution
150 U/ml Collagenase
200 U/ml Hyaluronidase
200 U/ml Penicillin
200 µg/ml Streptomycin

Lysozym-Lösung

5 ml TRIS-Lösung
(10 Millimol (mmol)/l)
0,1 g Lysozym
Gut mischen und
anschließend Sterilfiltration
in Zentrifugenröhrchen

Primer

Alle genutzten Primer (Eurofins) wurden bei
-20° C gelagert
. Die Konzentration der Stammlösung betrug
200 µM. Für die Durchführung der PCRs
wurde eine Arbeitslösung mit 20 µM
hergestellt. Für die Verdünnung wurde PCR-
H₂O genutzt.

qPCR Reaktionsansatz (je 10 µl)

0,2 µl Primer forward (20 µM)
0,2 µl Primer reverse (20 µM)
0,2 µl 50 x SYBR Green Solution
3,4 µl PCR-H₂O
5 µl 2 x SensiMix
1 µl komplementäre DNA (cDNA)

Reverse Transkriptionsreaktion

8 µl 5x M-MLV RT-Puffer
4 µl dNTPs (je 10 mM)
3 µl Random Hexamere (50 µM)
27,75 µl PCR-H₂O
1 µl M-MLV Reverse Transkriptase
(200 U/µl)
x µl DNase-Ansatz

Rogosa Agar für die Mikrobiologie

73 g Rogosa Agar
1 l H₂O
zusammen aufkochen
Zugabe von 10 ml Tween 80 (10 % v/v)
und 1,32 ml Essigsäure

Rogosa SL Agar für die Mikrobiologie

75 g Rogosa SL Agar
1 l H₂O
zusammen aufkochen
Zugabe von 1,32 ml Essigsäure;
erneut erhitzen bis zum Sieden

Triladyl

200 g Triladyl
580 ml H₂O
200 g Eigelb

Steridyl

500 ml Steridyl
480 ml H₂O

TAE-Puffer

1 l TAE (10 x)
10 l H₂O

TRIS-Lösung

50 µl TRIS
5 ml H₂O
(10 mmol/l, pH 8,2)

4.9 Primer

Tabelle 8: Genutzte Gen-Transkripte, Sequenzen der Primer, Annealing-Temperaturen für die Real-Time PCR, Fragmentlänge und Referenzen

Gen	Primer-Sequenz	Referenz	Fragmentlänge	Annealingtemperatur
16S-rDNA	For: 5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3' Rev: 5' AAG GAG GTG ATC CAG CC 3'	(Weisburg et al. 1991)	ca. 1200 bp	72° C
Spacer-Region zw. 16S und 23S-rDNA	For: 5' CTC AAA ACT AAA CAA AGT TTC 3' Rev: 5' CTT GTA CAC ACC GCC CGT CA 3'	(Dubernet et al. 2002)	ca. 250-1200 bp	72° C
CXCL1/2	For: 5' GAC CTT GCA GGG GAT TCA CCT C 3' Rev: 5' CGG GGT TGA GAC ACA CTT CCT G 3'	(Peter et al. 2015)	125 bp	60° C
CXCL3	For: 5' GCC ATT GCC TGC AAA CTT 3' Rev: 5' TGC TGC CCT TGT TTA GCA 3'	(Peter et al. 2015)	189 bp	60° C
CXCL5	For: 5' CTT TCG GGC TCC CTG TG 3' Rev: 5' CAC TGA CCG TTT TGG ATG 3'	(Peter et al. 2015)	193 bp	60° C
IL6	For: 5' TCC AGA ACG AGT ATG AGG 3' Rev: 5' CAT CCG AAT AGC TCT CAG 3'	(Konnai et al. 2003)	236 bp	56° C
IL8	For: 5' CGA TGC CAA TGC ATA AAA AC 3' Rev: 5' CTT TTC CTT GGG GTT TAG GC 3'	(Fischer et al. 2010)	153 bp	56° C
PTGS2	For: 5' CAG CAA ATC CTT GCT GTT CC 3' Rev: 5' ACA GTT CGG TTG AAC GTT CC 3'	(Odau et al. 2006)	359 bp	60° C

Material

Gen	Primer-Sequenz	Referenz	Fragment-länge	Annealing temperatur
<i>β</i> -Actin (ACTB)	For: 5' CGG TGC CCA TCT ATG AGG 3' Rev: 5' GAT GGT GAT GAC CTG CCC 3'	(Gärtner et al. 2015)	266 bp	58° C
Untereinheit A des Succinat- Dehydrogenase- Komplexes (SDHA)	For: 5' GGG AGG ACT TCA AGG AGA GG 3' Rev: 5' CTC CTC AGT AGG AGC GGA TG 3'	(Gärtner et al. 2015)	219 bp	60°C
Glycerin- aldehyd-3- phosphat- Dehydrogenase (GAPDH)	For: 5' CCC AGA AGA GTC TGG ATG 3' Rev: 5' AGT CGC AGG AGA CAA CCT 3'	(Gärtner et al. 2015)	306 bp	62°C
Polycomb- Protein 12 (SUZ12)	For: 5' TTC GTT GGA CAG GAG AGA CC 3' Rev: 5' GTC CAC CAA GGG CAA TGT AG 3'	(Peter et al. 2015)	286 bp	60° C

5 Methoden

5.1 Isolation von *Lactobacillales* aus bovinem Seminalplasma

Zuchtbullen der Rasse „Holstein-Friesian“, welche Eigentum des RBB Rinderproduktion Berlin-Brandenburg (Groß Kreutz, Deutschland) waren, wurden für diese Studie ausgewählt. Es wurde meist Seminalplasma von Jungbullen verwendet, deren Sperma noch nicht kommerziell vermarktet wurde.

Es wurden 57 Seminalplasma-Proben von insgesamt 40 verschiedenen Zuchtbullen verwendet. Das Seminalplasma von 17 Bullen wurde in zeitlichen Abständen zweimal mikrobiologisch untersucht. Die Samengewinnung fand genauso statt wie für die Samengewinnung zur kommerziellen Nutzung. Alle Tiere wurden vor der Samengewinnung auf Beschmutzungen untersucht und, falls nötig, mit Wasser gereinigt. Jegliche Bestandteile der Materialien zur Samengewinnung wurden vor der Benutzung sterilisiert, oder es wurden sterile Einwegartikel verwendet. Alle Zuchtbullen, deren Seminalplasma in dieser Studie untersucht wurden, waren allgemein- und geschlechtsgesund. Die Untersuchungen diesbezüglich werden im Rahmen der tierärztlichen Betreuung regelmäßig vor der Samengewinnung durchgeführt. Gewonnenes Seminalplasma wurde in sterilen Reaktionsgefäßen von 1,5 ml gelagert und bei Raumtemperatur in das Labor transportiert.

Im Labor des Instituts für Veterinär-Biochemie wurden alle Proben unter aseptischen Bedingungen unter einer Sterilbank bearbeitet. Das Volumen des Seminalplasmas betrug, individuell geringgradig variierend, ca. 0,5 ml. Jede Probe wurde mit PBS auf ein Volumen von 1 ml verdünnt. Das Seminalplasma jeden Tieres wurde auf drei gleiche Volumina aufgeteilt, um es auf verschiedenen Agar-Platten und in Nährmedien zu inkubieren. Hierfür wurde MRS-, Rogosa SL- und Rogosa-Agar genutzt. Je 100 µl des Seminalplasmas wurden auf die Agar-Platten pipettiert und mithilfe eines Trigalski-Spatels gleichmäßig ausgestrichen. Alle Proben wurden im zweifachen Ansatz ausgestrichen, da die Inkubation unter aeroben, als auch unter mikroaerophilen Bedingungen stattfand.

Die mikroaerophile Inkubation fand bei 37° C in luftdichten Anaerobier-Töpfen statt, in denen sich „Anaerocult“-Beutel, die mit 6 ml Wasser befeuchtet wurden, befanden. Dadurch wird atmosphärischer Sauerstoff gebunden und es kommt zur CO₂-Anreicherung.

Zusätzlich wurden je 100 µl der Proben unter aeroben Bedingungen in 3 ml MRS-Medium inkubiert. Die Inkubation fand bei 37° C für maximal 72 Stunden statt.

Falls nach 72 Stunden kein bakterielles Wachstum sichtbar war, wurden die jeweiligen Ansätze aus dem Versuch entfernt und als bakterienfrei gewertet. Gewachsene Kolonien auf Agar-Platten wurden per Inokulations-Öse entnommen und in einem Volumen von 3 ml MRS-Medium angereichert. Sobald dieses Medium eine deutliche Trübung aufwies, wurden

100 µl entnommen und gleichmäßig auf MRS-Agar ausgestrichen und aerob inkubiert. Diese Prozedur aus Kolonieentnahme, Wachstum und Ausplattieren wurde jeweils zweimal wiederholt, um zu gewährleisten, dass Reinkulturen aus nur einem bakteriellen Stamm erhalten werden (siehe **Abbildung 2**).

Bei den primär in MRS-Medium inkubierten Proben wurde so vorgegangen, dass 100 µl getriebter Proben auf MRS-Agar unter aeroben Bedingungen kultiviert wurden. Bei Wachstum von Kolonien wurde weiter verfahren, wie in **Abb. 2** beschrieben.

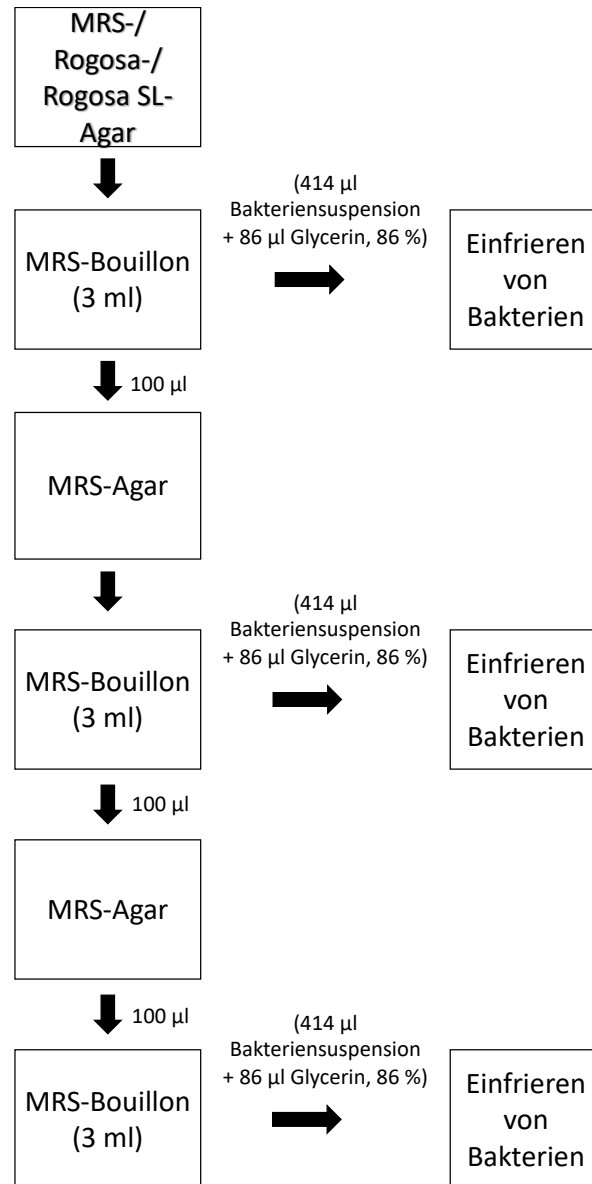


Abbildung 2: Schema der Kultivierung von Bakterien

Jeweils 414 μl der angereicherten Reinkulturen wurden mit 86 μl Glycerin (86 % v/v) in Reaktionsgefäßen miteinander vermischt und bei -80°C eingefroren. Aus diesen eingefrorenen Lösungen wurden für weitere Untersuchungen Bakterien per Inokulations-Öse entnommen, ohne dass es zu einem Auftauen der Bakterien kommen konnte. Die bakterienhaltigen Lösungen wurden dafür in bei -20°C vorgekühlten Behältnissen innerhalb der Räumlichkeiten transportiert.

Sobald Isolate in Reinkultur vorlagen, wurde ein Katalase-Test mit 3 %-igem H_2O_2 durchgeführt, um eine erste unspezifische Bestimmung vorliegender Bakterien vorzunehmen. Sterile Objektträger wurden mit 50 μl der Wasserstoffperoxid-Lösung versehen. Anschließend wurden Teile von Einzelkolonien von der Agar-Platte mit H_2O_2 vermischt und auf potenzielle Gasbildung untersucht. Da Milchsäurebakterien in der Regel katalase-negativ sind, wurden nur Isolate weiterführend untersucht, bei denen es nicht zur Gasbildung kam.

5.2 Isolation von *Lactobacillales* von Penis und Präputium

Für die bakteriologische Untersuchung der *Glans penis* und des Präputiums wurden Standardtupfer mit Nähragar aus der mikrobiologischen Diagnostik verwendet. 12 Mastbullen wurden während des Schlachtprozesses unmittelbar nach dem Entbluten beprobt. Tiere, die stark verschmutzt waren oder Anzeichen von Krankheiten des Reproduktionstraktes hatten, wurden nicht berücksichtigt. Die untersuchten Tiere stammten alle von dem gleichen Mastbetrieb. Mit sterilen Handschuhen wurde der Penis der Tiere vorverlagert, sodass die *Glans penis* betupft werden konnte. Anschließend wurde die Präputialhöhle ebenfalls mit einem zweiten Tupfer beprobt. Die Tupfer wurden unmittelbar danach in sterile Röhrchen mit Nähragar geschoben und fest verschlossen.

Somit lagen insgesamt 24 Tupferproben, jeweils 12 von Penis und Präputium, vor. Die Tupfer wurden anschließend auf Eis gekühlt und umgehend in das Institut für Veterinär-Biochemie transportiert. Dort wurden die Tupfer auf MRS-, Rogosa- und Rogosa SL-Agar ausgestrichen. Die Tupfer wurden anschließend zusätzlich in 3 ml MRS-Medium inkubiert. Die Inkubation der Platten und des MRS-Mediums fand unter aeroben Bedingungen bei 37°C statt. Von dort an fand die Anzucht und Isolierung nach dem gleichen Schema statt, wie bereits zuvor bei der Untersuchung des Seminalplasmas beschrieben (s. **Abb. 2**).

5.3 Charakterisierung von isolierten Bakterien

Gewachsene und dreimalig vereinzelte Isolate, welche nach dem Einfrierprozess erfolgreich re-kultiviert werden konnten, wurden weiterführend charakterisiert. 12 Isolate konnten nach dem Einfrierprozess nicht wieder re-kultiviert werden und wurden nicht weiterverwendet.

Etwa 10 µl aus den bei -80° C gelagerten Proben jedes Isolates wurde per Inokulations-Öse in 3 ml MRS-Medium unter aeroben Bedingungen bei 37° C inkubiert. Sobald dieses Medium durch bakterielles Wachstum eine deutlich sichtbare Trübung aufwies, wurden die Proben für zehn Minuten bei einer Drehzahl von 10.000 rpm zentrifugiert. Das MRS-Medium wurde verworfen, während der bakterienhaltige Bodensatz für die weitere Bearbeitung aufgehoben und erneut bei -80° C eingefroren wurde.

Aus den pelletierten Bakterien wurde die DNA mithilfe des QIAamp DNA Mini Kits nach den Herstellerangaben, mit leichten Modifikationen, extrahiert. Das bakterienhaltige Pellet wurde in 180 µl Lysozym-Lösung resuspendiert und für 30 Minuten bei 37° C inkubiert. Anschließend wurden 20 µl Proteinase K und 200 µl Puffer AL hinzugegeben und für 30 Minuten bei 56° C; dann für 15 Minuten bei 95° C inkubiert. Im nächsten Schritt wurden die Ansätze für eine Minute bei 13.000 rpm zentrifugiert, bevor 200 µl Ethanol (96 %) hinzugegeben wurden. Die Lösungen wurden kräftig gemischt und kurz bei 13.000 rpm zentrifugiert. Daraufhin wurden die Lösungen auf eine neue Säule pipettiert und eine Minute bei 8.000 rpm zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden die Säulen auf neue Reaktionsgefäße übertragen und dann 500 µl AW1-Puffer hinzupipettiert. Die Ansätze wurden für eine Minute bei 8.000 rpm zentrifugiert, erneut auf neue Reaktionsgefäße überführt und es wurden 500 µl des AW2-Puffers hinzugegeben. Anschließend wurden die Gefäße erneut eine Minute bei 8.000 rpm zentrifugiert, bevor wieder neue Reaktionsgefäße verwendet wurden. Der jeweilige Durchfluss wurde nach jeder Zentrifugation verworfen. Die Säulen wurden abschließend eine Minute bei 13.000 rpm zentrifugiert, in neue Reaktionsgefäße gesteckt und zusammen mit 100 µl PCR-H₂O für eine Minute bei 8.000 rpm zentrifugiert. Die Konzentration der so erhaltenen DNA im Durchfluss wurde via NanoDrop bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen.

5 µl der durch die Extraktion erhaltenen DNA wurde in einem nächsten Schritt durch eine PCR amplifiziert, indem spezifische, phylogenetische 16S-rDNA-Primer verwendet wurden (Weisburg et al. 1991). Der Amplifizierungsvorgang wurde mit einem Thermo-Cycler der Firma Eppendorf durchgeführt. Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze ist in Kapitel 4.8 beschrieben. Die Amplifizierung erfolgte nach folgendem Schema:

- 1.) **Denaturierung** bei 95° C für 10 Minuten
- 2.) **35 Zyklen**
 - a. 95° C für 2 Minuten
 - b. 42° C für 30 Sekunden
 - c. 72° C für 4 Minuten
- 3.) **Elongationsschritt** bei 72° C für 20 Minuten

Bei 3 Isolaten, die als gleiche Spezies identifiziert wurden, wurde zur weiteren Verifizierung zusätzlich eine PCR mit einem *Lactobacillus*-spezifischem Primer (Spacer-Region zwischen 16S- und 23S-rDNA) durchgeführt (Dubernet et al. 2002). Die Zusammensetzung der

Reaktionsansätze ist in Kapitel 4.8 beschrieben. Die Amplifizierung erfolgte hierbei nach folgendem Schema:

- 1.) **Denaturierung** bei 95° C für 10 Minuten
- 2.) **35 Zyklen**
 - a. 95° C für 2 Minuten
 - b. 55° C für 30 Sekunden
 - c. 72° C für 4 Minuten
- 3.) **Elongationsschritt** bei 72° C für 20 Minuten

Anschließend wurden die Produkte der PCR durch eine Gelelektrophorese in 1x TAE-Puffer bei 80 Volt für 60 Minuten aufgetrennt. Das 1 %-ige Agarose-Gel enthielt Ethidiumbromid, welches an die enthaltene DNA bindet. Die DNA wurde unter UV-Licht mit einem scharfen Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten und mit dem Invisorb Spin DNA Extraction Kit (siehe Kapitel 4.6) nach den Herstellerangaben extrahiert. Die Gelstücke wurden mit je ca. 1 ml, abhängig von der Größe des Gelstücks, „Gel Solubilizer S“ versetzt und für 10 Minuten bei 50° C inkubiert. Dann wurden jeweils 0,5 ml „Binding Enhancer“ hinzugegeben und die Lösungen wurden auf einen Zentrifugationsfilter übertragen. Der Zentrifugationsfilter wurde 2 Minuten bei 11.000 rpm zentrifugiert und das Zentrifugat wurde anschließend verworfen. Auf den Filter wurden 0,5 ml Wasch-Puffer pipettiert und erneut 2 Minuten bei 11.000 rpm zentrifugiert. Um restliche Flüssigkeiten zu entfernen, wurde der Filter nochmals für 4 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der jeweilige Durchfluss wurde verworfen. Die DNA wurde abschließend durch Zentrifugation für 1 Minute bei 11.000 rpm mit 20 µl eines Elutionspuffers eluiert.

5 µl des jeweiligen DNA-Produktes (Konzentration: 10-50 ng/ml) wurden mit 5 µl des jeweiligen Primers (Konzentration: 5 µM) in einem Reaktionsgefäß vermengt. Die Ansätze wurden an GATC Biotech/Eurofins Genomics (Konstanz, Deutschland) gesendet und dort sequenziert. Die jeweilige „rückwärts-Sequenz“ eines Isolates wurde in die komplementäre „vorwärts“-Basensequenz überführt und mit der „vorwärts-Sequenz“ zu einer teilweise überlappenden Konsensus-Sequenz verknüpft. Die so erhaltenen Sequenzen wurden anschließend mit der „National Center for Biotechnology Information“ (NCBI) Blast DNA-Datenbank abgeglichen, um vorhandene Homologien festzustellen.

5.4 Einfrier- und Auftauqualität von Milchsäurebakterien in verschiedenen Verdünnern

Milchsäurebakterien wurden zusammen mit verschiedenen Verdünnern eingefroren, die in der kommerziellen Nutzung mit bovinem Ejakulat versetzt werden. Die genutzten Verdüner des Herstellers Minitüb waren Triladyl, Biladyl, Steridyl und Andromed. Alle der genannten Verdüner lagen als Antibiotika-freie Variante vor. Die Verdüner wurden nach den Vorgaben

des Herstellers vorbereitet. Benötigtes Eigelb wurde hierfür kommerziell erworben und ist laut Hersteller auf Kontaminationen untersucht wurden. Anschließend wurden die Bakteriensuspensionen, die zum Zwecke dieses Versuchs nur in PBS gelagert und bei -80°C eingefroren waren, aufgetaut und zu den Verdünnern hinzugegeben. Auf die Nutzung von Glycerin zur Lagerung wurde in diesem Fall verzichtet, um die Zusammensetzung der Verdünner nicht zu verändern. Die Bakteriensuspensionen hatten eine Konzentration von 1×10^6 bis 1×10^9 kbE/ml. Für jeden untersuchten Verdünner wurde von jedem Isolat das gleiche Volumen der bakterienhaltigen Lösungen genutzt, um sicherzustellen, dass zu Beginn gleich viele kbE enthalten sind. Nach kräftigem Mischen wurden die Lösungen für 24 Stunden bei -80°C tiefgefroren. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Bakteriensuspensionen aufgetaut und es wurde mit PBS eine dezimale Verdünnungsreihe (10^{-1} bis 10^{-9} /ml) angesetzt, um die Lösungen zu verdünnen. Anschließend wurden die verdünnten Bakterien im zweifachen Ansatz auf MRS-Agar ausgestrichen und 24 Stunden bei 37°C unter aeroben Bedingungen inkubiert. Die gewachsenen Kolonien wurden ausgezählt. Parallel wurde nach dem gleichen Schema mit in PBS gelagerten und eingefrorenen Bakterien vorgegangen, um Kontrollwerte für die Einfrier- und Auftauqualität zu erhalten. Die jeweils gewachsenen Kolonien in der 6. (10^{-7} /ml) und 7. (10^{-8} /ml) dezimalen Verdünnung wurden ausgezählt und der Mittelwert aus den Ansätzen ($n = 5$) wurde berechnet.

5.5 Anreicherung von Bakterien zur Ko-Kultur mit endometrialen Epithelzellen

Von den isolierten Bakterien wurden einige für weiterführende Untersuchungen verwendet. Grundsätzlich wurden *Lactobacillus spp.* und einige andere Isolate der Ordnung *Lactobacillales* verwendet. Spezies, dessen Einfluss auf endometriale Epithelzellen bereits bekannt sind, wurden nicht verwendet.

Untersuchte Bakterien wurden zuvor in drei unterschiedlichen „multiplicities of infections“ (MOIs) vorbereitet. In der MOI 1 entsprach das Verhältnis zwischen vorhandenen Epithelzellen und der Anzahl an kbE 1:1. In der MOI 5 wurde die fünffache kbE und in der MOI 10 die zehnfache kbE eingesetzt. Es wurden sowohl Isolate aus dem Seminalplasma als auch aus den Tupferproben verwendet. Dafür wurden die Bakterien per Inokulationsöse aus den bei -80°C eingefrorenen Lösungen entnommen und angereichert. Bei erfolgreichem Wachstum in MRS-Medium bei 37°C unter aeroben Bedingungen für mindestens 48 Stunden wurden die Bakterien für 10 Minuten bei 10.000 rpm abzentrifugiert und in 20 ml sterilem PBS resuspendiert. Aliquots von je 0,5 ml wurden danach bei -80°C eingefroren. Je ein Aliquot wurde frühestens nach 24 Stunden aufgetaut und einer dezimalen Verdünnungsreihe in PBS unterworfen. Jeweils von der 5., 6. und 7. Verdünnung (1×10^{-6} , 1×10^{-7} und 1×10^{-8} /ml) wurden 100 μl auf je einer MRS-Platte mit einem Trigalski-Spatel ausgestrichen. Nach

24 Stunden bei 37° C unter aeroben Bedingungen wurden die gewachsenen Kolonien auf den Platten gezählt. Aus den Mittelwerten wurde die Anzahl der kbE/ml bestimmt. Anhand dieser kbE/ml-Zahl wurden zu verwendende MOIs berechnet.

5.6 Isolierung und Kultivierung boviner endometrialer Epithelzellen

Die Isolierung und Kultivierung boviner endometrialer Epithelzellen wurde, mit leichten Modifikationen wie bereits beschrieben, durchgeführt (Gärtner et al. 2015).

Unverzüglich nach dem Ausweiden der weiblichen Schlachttiere wurden die Uteri der Tiere unter möglichst hygienischen Bedingungen samt Ovarien auf Höhe der *Cervix uteri* aus dem restlichen Visceralgewebe entfernt.

Vor Ort wurden die Organe grobsinnlich auf potenzielle pathologische Veränderungen untersucht. Es wurden nur Uteri von bereits geschlechtsreifen, geschlechtsgesunden Tieren verwendet. Organe mit makroskopischen Anzeichen auf bakterielle Infektionen oder zystische Veränderungen an den Ovarien wurden nicht verwendet. Auch Uteri von Tieren im klinischen Puerperium wurden verworfen. Lediglich die Uteri brünstiger Tiere wurden verwendet, solange die vorhandenen Sekrete farblos und geruchsneutral waren. Jeder Uterus wurde dann einzeln verpackt und auf Eis zum Labor des Instituts für Veterinär-Biochemie transportiert.

Dort angekommen, wurde jeder Uterus mit sterilen Einwegmaterialien behandelt. Die Uteri wurden mit sterilem Wasser gereinigt und anschließend wurden die einzelnen *Cornua uteri* äußerlich mit Ethanol (70 %) benetzt. Nach der Desinfektion wurden, vom *Corpus uteri* ausgehend, beide *Cornua* bis in die Spitzen eröffnet, um sie dann genau auf pathologische Anzeichen zu untersuchen. Falls die Uteri makroskopisch gesund waren, wurde mit dem Abtragen des Endometriums begonnen. Mit anatomischen Pinzetten und chirurgischen Skalpell wurde die oberflächliche Gewebsschicht abgeschnitten und auf eine sterile Petri-Schale verbracht. Es wurde strikt darauf geachtet, möglichst kein fibröses Gewebe der Submukosa zu entfernen. Nachdem das Gewebe aus beiden Hörnern vollständig abgetragen war, wurde das Endometrium in der Petri-Schale mit Skalpell emulgiert, sodass das Gewebe zerkleinert wird. Dann wurden die gewonnenen Zellen mit einem Zell-Schaber in sterile Zentrifugiergefäße mit einem Volumen von 50 ml verbracht. Zu den Zellen wurden je Uterus 25 ml einer Hanks' Balanced Salt Solution hinzu pipettiert.

Diese beinhaltete zusätzlich 150 U/ml Collagenase, 150 U/ml Hyaluronidase, 200 U/ml Penicillin und 200 µg/ml Streptomycin (siehe Kapitel 4.8). Die abgetragenen Endometriumszellen wurden in dieser Lösung zwei Stunden bei 37° C unter ständigem Rollen inkubiert. Nach Ablauf dieser zwei Stunden wurden die Zentrifugiergefäße, welche die Zellen beinhalteten, für ca. 10 Minuten aufrecht stehengelassen, um ein Absinken größerer Gewebsbestandteile zu ermöglichen. Dann wurde der Überstand, der die endometrialen Epithelzellen enthielt, mit sterilen serologischen Pipetten (10 ml) entnommen und in neue

Zentrifugiergefäße mit einem Volumen von 15 ml pipettiert, ohne dabei große Gewebsbestandteile zu entnehmen. Die entnommenen Überstände wurden für 10 Minuten bei 700 rpm ohne Bremsfunktion zentrifugiert (Centrifuge 5804 R; Eppendorf). Der dadurch entstandene Überstand wurde verworfen, sodass sich in den Gefäßen nur noch die zellhaltigen Niederschläge befanden. Diese zellhaltigen Zentrifugate wurden langsam mit 5 ml des vorbereiteten Epithelzellkulturmediums resuspendiert. Dieses Epithelzellkulturmedium wurde im Voraus zusammengestellt und bei 37° C gelagert.

Nach erfolgreichem Resuspendieren wurden die Zentrifugiergefäße erneut unter oben genannten Gegebenheiten zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand erneut verworfen und der Vorgang der Zugabe des Epithelzellkulturmediums mit anschließender Zentrifugation ein weiteres Mal wiederholt. Nach diesem Vorgang wurden die Zellen unter sterilen Bedingungen in Zellkultur-Flaschen (Corning) mit einer Fläche von 25 cm² verbracht. Die zellhaltigen Zentrifugate wurden mit 7 ml des Epithelzellkulturmediums versetzt und dann vorsichtig in die Zellkultur-Flaschen pipettiert. Bei einzelnen Flaschen, bei denen die Zelldichte bereits zu Beginn durch mikroskopische Schätzung sehr hoch war, wurde die Hälfte des Epithelzellkulturmediums sofort wieder entnommen und in eine zweite Flasche gegeben und das fehlende Volumen mit Epithelzellkulturmedium aufgefüllt. Die Zellen wurden bei 37° C, einer CO₂-Konzentration von 5 % und bei gesättigter Luftfeuchtigkeit inkubiert.

Nach 18 Stunden wurden noch nicht adhärierte Zellen zusammen mit dem gesamten Epithelzellkulturmedium aus den ursprünglichen Flaschen in neue Zellkultur-Flaschen (Corning) transfundiert. In die ursprünglichen Flaschen wurden 7 ml neues Epithelzellkulturmedium gegeben. Ab diesem Zeitpunkt fand alle 48 Stunden mindestens ein Wechsel des Epithelzellkulturmediums statt. Täglich wurden die Behältnisse mikroskopisch auf potenzielle Kontaminationen und generell auf das Zellwachstum untersucht. Bei Bedarf wurden zusätzlich eventuelle Fibroblasten entfernt, bzw. die Endometriumszellen passagiert. Bei einem lediglichen Epithelzellkulturmedienwechsel wurde das vorhandene Epithelzellkulturmedium via einer Pasteur-Pipette vollständig aspiriert und verworfen. Die verbliebenen Zellen wurden zweimal mittels eines Volumens von 7 ml sterilem PBS gespült. Anschließend wurden 7 ml des neuen Epithelzellkulturmedium hinzugegeben. Die Flaschen wurden, da sich Filter im Deckel befanden, fest verschlossen und für mindestens weitere 48 Stunden bei 37° C, 5 % CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit inkubiert.

Bei Behältnissen, in denen ein Wachstum von Fibroblasten sichtbar war, wurden diese, zusätzlich zum Wechsel des Epithelzellkulturmediums, enzymatisch entfernt. Dafür wurde das Epithelzellkulturmedium aspiriert und die Zellen wurden zweimalig mit PBS gespült. Es wurde 1 ml Accutase hinzu pipettiert und die Flaschen wurden für zwei Minuten bei 37° C inkubiert. Danach wurde die Accutase aspiriert und verworfen. Erneut wurden die Zellen zweimalig mit 7 ml PBS gespült. Abschließend wurde neues Epithelzellkulturmedium hinzugegeben.

Endometriale Epithelzellen zeichnen sich mikroskopisch durch dessen rundliche Morphologie aus. Sie wachsen „inselartig“ und haben einen festen Zellverbund. Fibroblasten sind vereinzelt vorhanden und besitzen lange cytoplasmatische Ausläufer.

Solche Flaschen, bei denen entweder durch eine Trübung des Epithelzellkulturmediums oder durch mikroskopische Anzeichen Verdacht auf bakterielle oder mykotische Kontamination vorlag, wurden unverzüglich verworfen.

Sobald die endometrialen Epithelzellen eine nahezu vollständige Konfluenz aufwiesen, fand die jeweils erste Passage der Zellen statt. Hierbei wurden in einem ersten Schritt, wie bereits erläutert, vorhandene Fibroblasten via 1 ml Accutase entfernt. Nach diesem Schritt fand die eigentliche Passagierung statt, indem erneut 1 ml der Accutase in die Flasche pipettiert wurde. Die Flaschen wurden bei 37° C und 5 % CO₂ bei gesättigter Luftfeuchtigkeit inkubiert. Alle 15 Minuten wurde mikroskopisch kontrolliert, ob sich die Zellen vom Boden der Flaschen gelöst hatten. Die Zellen wurden maximal für eine Dauer von 40 Minuten mit Accutase inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurde die enzymatische Wirkung der Accutase durch Zugabe von 9 ml des Epithelzellkulturmediums deaktiviert. Die nun gelösten Zellen, die sich dann in einem Volumen von insgesamt 10 ml befanden, wurden zu gleichen Teilen auf jeweils zwei neue Zellkultur-Flaschen (Sarstedt) aufgeteilt. Diesen Flaschen mit nun einer Fläche von 75 cm² wurden zusätzlich zu den vorhandenen 5 ml der zellhaltigen Lösung 16 ml Epithelzellkulturmedium hinzugefügt, sodass ein Gesamtvolumen von 21 ml je Flasche vorlag. Nun wurde wieder alle 48 Stunden ein Wechsel des Epithelzellkulturmediums durchgeführt und eventuell Fibroblasten entfernt, bis die endometrialen Epithelzellen eine nahezu vollständige Konfluenz erreichten. Fibroblasten wurden in den großen Flaschen nach dem gleichen Schema entfernt, wie bereits beschrieben. Allerdings wurde hier je ein Volumen von 3 ml Accutase verwendet.

Als die Zellen vollständig konfluent waren, fand die zweite Passagierung statt. Hierbei wurden die Zellen in Vertiefungsplatten passagiert, in denen sie dann für weitere Versuche genutzt werden konnten. Für Zellviabilitätsversuche wurden 24er-Vertiefungsplatten, und für mRNA-Expressionsanalysen 6er-Vertiefungsplatten verwendet. Erst wurden wieder via 3 ml Accutase Fibroblasten entfernt, sodass nur noch endometriale Epithelzellen vorlagen. Dann wurde durch Zugabe von erneut 3 ml Accutase und einer maximalen Inkubationszeit von 40 Minuten bei 37 °C die Epithelzellen von der Zellkulturflasche entfernt. Hierbei wurde auch alle 15 Minuten der Prozess der Ablösung beobachtet. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Aktivität der Accutase durch 7 ml Epithelzellkulturmedium beendet. Anschließend wurden die Volumina aus allen Flaschen, welche Zellen vom gleichen Tier beinhalteten, in ein steriles Zentrifugiergefäß mit einem Volumen von 50 ml überführt. Diese Zentrifugiergefäße wurden mehrmals vorsichtig geschwenkt, sodass eine homogene Verteilung der Epithelzellen stattfinden konnte.

Für Ko-Kultur-Versuche wurden für 24er-Vertiefungsplatten Zellkonzentrationen von 1×10^5 /ml ausgesät. Bei Verwendung von 6er-Vertiefungsplatten wurden Konzentrationen von 2×10^5 /ml genutzt. Hierfür wurden die Zellkonzentrationen in den 50 ml-Zentrifugiergefäßen durch mikroskopische Zellzählung ermittelt. Aus den Lösungen wurden $10 \mu\text{l}$ entnommen und nativ in eine Neubauer-Zählkammer überführt. Bei 100-facher Vergrößerung wurden die enthaltenen Zellen durch mäanderförmiges Zählen ermittelt. Somit konnte durch Verdünnen der Zelllösungen die erforderliche Zellkonzentration erreicht werden. Das Verdünnen fand mit dem Epithelzellkulturmedium statt. So wurden je 0,5 ml der Lösungen in jede Vertiefung der 24er-Vertiefungsplatten und 3 ml in jede Vertiefung der 6er-Vertiefungsplatten pipettiert. Nach 48 Stunden Inkubation der Vertiefungsplatten waren die Zellen aller Tiere vollständig konfluent und konnten somit für Ko-Kultur-Versuche genutzt werden.

Insgesamt standen endometriale Epithelzellen von insgesamt 14 Schlachttieren zur Verfügung.

5.7 Zellviabilität in Anwesenheit verschiedener Milchsäurebakterien

Für die Untersuchung der Viabilität von endometrialen Epithelzellen wurden diese mit Milchsäurebakterien ko-kultiviert. Dafür wurden, wie zuvor in Kapitel 5.6 beschrieben, Epithelzellen nach der zweiten Passage in 24er-Vertiefungsplatten mit je 1×10^5 Zellen vorbereitet. Jedes Bakterium (siehe Kapitel 5.5) wurde mit Epithelzellen von mindestens drei verschiedenen Tieren ko-kultiviert ($n = \text{mind. } 3$). Mit Hilfe der bestimmten kbE/ml konnten dann die MOI 1, MOI 5 und MOI 10 hergestellt werden. Für Zellviabilitäts-Versuche wurde in der MOI 1 190.000 kbE, in der MOI 5 950.000 kbE und in der MOI 10 1.900.000 kbE vorbereitet. Zur Herstellung der MOIs wurde Epithelzellkulturmedium aus der Zellkultur verwendet. Allerdings wurde hierfür weder Gentamycin noch Amphotericin B genutzt, sodass das Medium Antibiotika-frei war.

Nun wurde das noch enthaltene Zellkulturmedium aus den Vertiefungen aspiriert und diese wurden je zweimalig mit sterilem PBS gespült, um Reste der enthaltenen Antibiotika und -mykotika zu entfernen. Dann wurden die Bakterienlösungen in den verschiedenen MOIs hinzugegeben. Die Vertiefungen der Kontrollgruppen enthielten nur endometriale Epithelzellen und 0,5 ml des Epithelzellkulturmediums ohne Antibiotika. Die ko-kultivierten Zellen wurden bei 37°C , einer CO_2 -Konzentration von 5 % und gesättigter Luftfeuchtigkeit inkubiert. Die Zellen aller Tiere wurden in Doppelansätzen mit Bakterien ko-kultiviert. Die Ko-Kultur der Epithelzellen ist in folgendem Schema vereinfacht dargestellt:

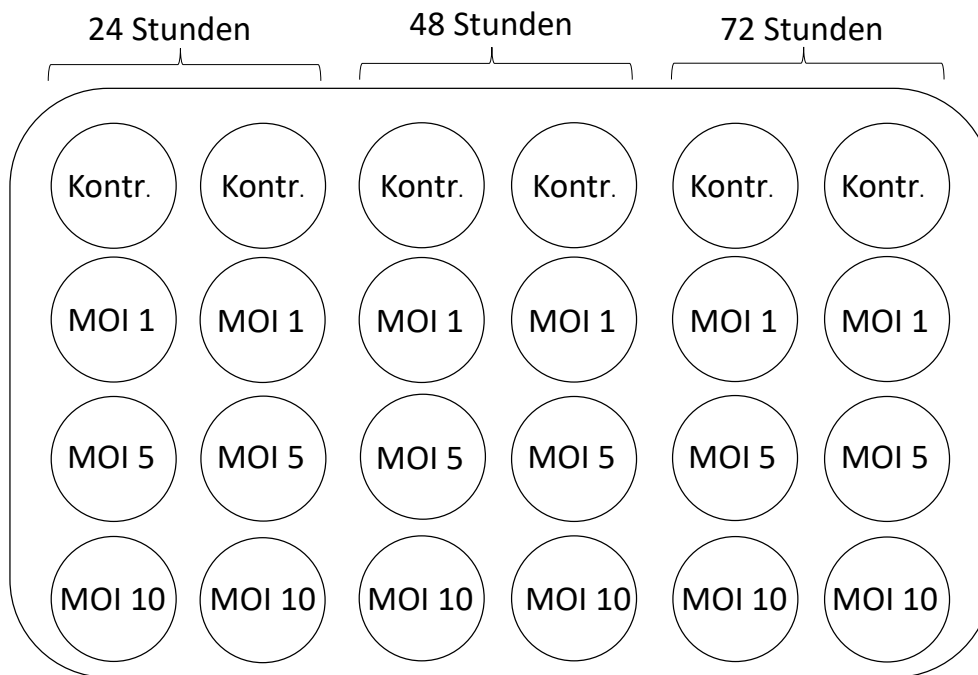


Abbildung 3: Schema der Ko-Kultur von endometrialen Epithelzellen mit Bakterien zur Untersuchung der Zell-Viabilität.

Die Untersuchung der Zellviabilität fand alle 24 Stunden über einen Zeitraum von drei Tagen statt. Nach je 24 Stunden wurden die Zellen in Ko-Kultur mikroskopisch begutachtet. Dafür wurde sowohl von den ko-kultivierten Zellen als auch jeweils der Kontrollgruppe das Epithelzellkulturmedium samt der Bakterienlösung aspiriert. Das Medium wurde für eventuelle weitere Untersuchungen bei -20°C eingefroren. Die am Boden der Vertiefungen befindlichen Zellen wurden zweimalig mit sterilem PBS gespült. Anschließend wurde in jede Vertiefung $200\ \mu\text{l}$ einer 0,5 %-igen Trypanblau-Lösung, 1:2 verdünnt mit PBS, pipettiert. Nach einer Wartezeit von etwa einer Minute wurden die endometrialen Epithelzellen bei 100-facher Vergrößerung mikroskopiert. Das Trypanblau färbt nicht-vitale Zellen blau an, sodass eine Untersuchung der Zellviabilität stattfinden konnte. Die Untersuchung fand immer im Vergleich zu der jeweiligen Kontrollgruppe von Zellen statt, welche sich nicht in Ko-Kultur mit Bakterien befand. Jeweils mindestens fünf optische Felder wurden pro Vertiefung begutachtet. Eine visuelle Auswertung des Versuchs fand anschließend anhand aufgenommener Fotografien der Zellen statt.

5.8 mRNA-Expression endometrialer Epithelzellen in Anwesenheit von Milchsäurebakterien

Endometriale Epithelzellen für Experimente bezüglich deren mRNA-Expression wurden in der zweiten Passage in 6er-Vertiefungsplatten kultiviert (siehe Kapitel 5.6). Die Zellkonzentration

betrug 1×10^5 /ml, sodass sich in jeder Vertiefung bei einem Volumen von 3 ml 300.000 Zellen befanden. Für Ko-Kultur-Versuche wurden hier ebenfalls Bakterienlösungen, wie in Kapitel 5.5 beschrieben, in drei verschiedenen MOIs angesetzt. In der MOI 1 wurden 960.000 kbE, in der MOI 5 4.800.000 und in der MOI 10 9.600.000 kbE eingesetzt. Zusätzlich dienten je drei Vertiefungen pro Tier als Kontrollgruppe (0 h), um die mRNA-Expression normieren zu können. Nach je 2, 4 und 6 Stunden der Ko-Kultur dienten Zellen einer weiteren Vertiefung ohne Bakterien als Referenzwert zu den verschiedenen Zeitpunkten der Zellyse. Pro untersuchtem Milchsäurebakterium wurden endometriale Epithelzellen von mindestens vier verschiedenen Schlachttieren genutzt (n = mind. 4). Die Ko-Kultur der Epithelzellen ist in folgendem Schema vereinfacht dargestellt:

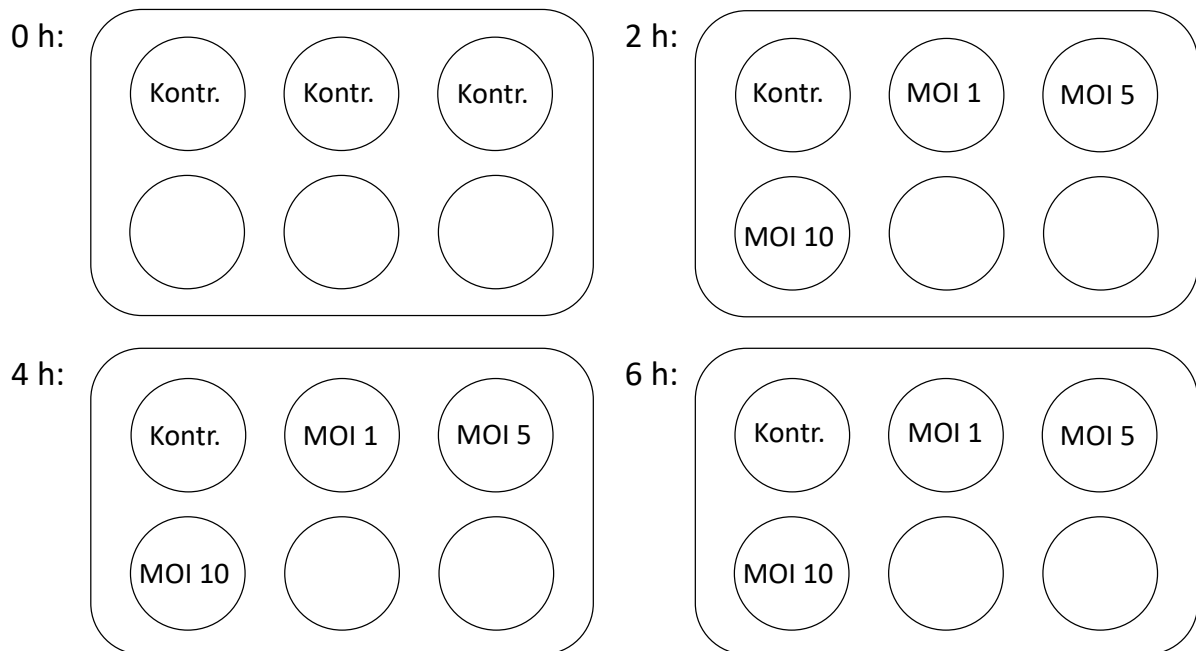


Abbildung 4: Schema der Ko-Kultur von endometrialen Epithelzellen mit Bakterien zur Quantifizierung der mRNA-Expression.

Vor Beginn der Ko-Kultur wurden die Zellen ebenfalls mikroskopisch auf vollständige Konfluenz inspiziert. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gespült, sodass das Gentamycin- und Amphotericin B-haltige Medium vollständig entfernt war. Dann wurden in die verschiedenen Vertiefungen die bakterienhaltigen Suspensionen mit den MOI 1, 5 und 10 pipettiert. Die jeweiligen Verdünnungen wurden mit Antibiotika-freiem Zellkulturmedium angesetzt. Dieser Prozess geschah im dreifachen Ansatz, um Zellen nach 2, 4 und 6 Stunden lysieren zu können. Zum Zeitpunkt „null“ wurde direkt das Zellkulturmedium abgenommen und die Zellen der drei Vertiefungen wurden lysiert, welche zum späteren Zeitpunkt als Kontrollgruppen dienten. Nach jeweils zwei Stunden wurden Zellen einer Kontrollgruppe und

Zellen aus einer Vertiefung mit der MOI 1, 5 und 10 mit 0,6 ml Lysis Puffer TLR (Qiagen) lysiert. Die Zelllysate wurden in sterilen 1,5 ml Reaktionsgefäßen bei -80° C bis zur weiteren Bearbeitung gelagert.

5.9 RNA-Extraktion nach Ko-Kultur endometrialer Epithelzellen mit Milchsäurebakterien

Die Gesamt-RNA-Extraktion aus den mit Milchsäurebakterien ko-kultivierten endometrialen Epithelzellen fand nach Abschluss des Ko-Kultur-Experiments mit dem Gerät „Kingfisher Flex“ statt. Die lysierten Zellen waren zuvor bei -80° C eingefroren und wurden kurz vor der RNA-Extraktion aufgetaut. Hierzu wurden die genauen Instruktionen des Herstellers befolgt. Die benötigten Reagenzien und Verbrauchsmaterialien wurden dem Kit InviMag Universal Kit/KF96 entnommen. Es wurde das Hersteller-Protokoll für die RNA-Extraktion aus gefrorenem Zellmaterial verwendet.

Die Zell-Lysate wurden mit 400 µl Ethanol und 20 µl der SNAP-Lösung vermischt und in die dafür vorgesehenen Vertiefungen der Binde-Platte pipettiert. In die Wasch-Platte 1 wurden in jede Vertiefung 800 µl der Waschlösung 1 gegeben. In die Vertiefungen der Wasch-Platten 2 und 3 wurden je 800 µl der Waschlösung 2 pipettiert. In die Vertiefungen der Elutions-Platte wurden 100 µl der Elutionslösung gegeben. Die Platten wurden in die dafür vorgesehenen Positionen des Gerätes platziert. Der Extraktionsvorgang wurde gestartet und die Prozedur fand automatisiert statt. Die extrahierte Gesamt-RNA wurde in Reaktionsgefäße überführt.

Nach der maschinellen Gesamt-RNA-Extraktion wurde die Konzentration der vorliegenden Gesamt-RNA in den einzelnen Proben via „NanoDrop“ bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Ebenfalls fand zeitgleich eine Messung der optischen Dichte bei 280 nm statt, um eine Kontamination der Proben mit Proteinen zu detektieren. Der Quotient der Konzentrationen bei beiden Wellenlängen lässt Rückschlüsse über die Reinheit der vorliegenden Gesamt-RNA zu.

5.10 Reverse Transkription mit vorherigem DNase-Verdau

Die Gesamt-RNA jeder Probe wurde nun einer RT unterzogen, um aus der RNA eine einzelsträngige cDNA zu erhalten. Die zuvor gemessene Konzentration der RNA wurde genutzt, um das Volumen zu berechnen, welches man benötigt, um 0,5 µg RNA für die RT zu erhalten. Diese Prozedur wurde, mit leichten Modifikationen, wie bereits beschrieben, durchgeführt (Oda et al. 2006). Um potenziell noch vorhandene genomische DNA in den Proben zu eliminieren, wurden die Proben mit DNase I inkubiert. Der Reaktionsansatz wurde dann bei 37° C für 30 Minuten inkubiert und anschließend für 5 Minuten auf 75° C erhitzt, um die DNase zu inaktivieren. Außerdem werden durch die Hitzeeinwirkung potentielle

Sekundärstrukturen der vorhandenen RNA zerstört. Nach dem Erhitzen wurden die Proben für etwa eine Minute eisgekühlt. Zu den konzentrationsabhängigen Volumina der Proben wurden 40 µl des RT-Reaktionsansatzes hinzugegeben.

Es wurde im Thermo-Cycler folgendes Programm durchlaufen:

- 1.) 25° C für 10 Minuten
- 2.) 37° C für 50 Minuten
- 3.) 90° C für 2 Minuten

Die so entstandene cDNA wurde bis zur weiteren Bearbeitung, zu je 20 µl portioniert, bei -20° C eingefroren.

5.11 Quantitative Polymerase-Ketten-Reaktion (qPCR)

Nachdem die aus den lysierten Epithelzellen gewonnene Gesamt-RNA durch die reverse Transkription in cDNA transkribiert wurde, konnte die mRNA-Expression via quantitativer PCR analysiert werden. Dies wurde, wie bereits zuvor beschrieben, durchgeführt (Oda et al. 2006). Der Real-Time-PCR-Cycler „Rotorgene 3000“ und der Fluoreszenzfarbstoff „SYBR Green“ wurden hierfür verwendet. Durch den fluoreszierenden Farbstoff wird es ermöglicht, eine Amplifikation der DNA bereits in einem frühen Stadium der Vervielfältigung zu detektieren. Im Gegensatz dazu kann in der konventionellen PCR nur das Endprodukt, nicht aber quantitative Änderungen während der Amplifikation, detektiert werden.

Die Amplifikation verläuft grundsätzlich in drei Phasen. Zunächst kommt es zur exponentiellen Phase, in der alle Substrate in ausreichenden Mengen vorhanden sind und es zur schnellen Bildung des Produktes kommt. Dann kommt es zur linearen und anschließend zur Plateauphase, in denen die Substrate nur noch in geringerer Menge vorliegen können und sich die Reaktionen deshalb verlangsamen. Ab einem bestimmten Zeitpunkt können sich die Produkte zusätzlich degradieren. In der Real-time-PCR kann die Bildung der Produkte während der exponentiellen Phase detektiert werden, sodass eine genaue Messung möglich wird.

Die PCR wurde in spezifischen Reaktionsgefäßen mit einem Volumen von 0,1 ml durchgeführt. Von jeder Probe wurde 1 µl der cDNA benötigt. Zu der cDNA wurden 9 µl des Reaktionsansatzes hinzugegeben. Dieser enthielt steriles Wasser, den Sensomix und 0,4 mM des jeweiligen Primers (vorwärts und rückwärts) für die untersuchten Gene. Die genaue Zusammensetzung der Reaktionsansätze ist in Kapitel 4.8 beschrieben. Um eine Kontamination der Proben zu vermeiden, wurden die Reaktionsansätze ohne die jeweilige cDNA unter einer nur für diesen Zweck vorhandenen Sterilbank vorbereitet. Unter einer zweiten Sterilbank wurde dann die cDNA der jeweiligen Proben zusammen mit den vorbereiteten Reaktionsansätzen zusammengeführt. Zusätzlich zu den Proben wurden jeder

qPCR immer Standards, Negativkontrollen und Wasser mitgeführt. Die genutzten Standards waren bereits vorliegende PCR-Produkte mit bekannter Konzentration, welche der Quantifizierung der gemessenen Werte dienen. Sie wurden in einer dezimalen Verdünnungsreihe mit PCR-H₂O (10⁻³ bis 10⁻¹⁰/ml) hergestellt. Die genutzten Negativkontrollen sind Proben mit hoher RNA-Konzentration, die einer reversen Transkription unterzogen wurden, ohne dass eine Transkriptase hinzugegeben wurde. Somit durfte in den Negativkontrollen keine cDNA enthalten sein, wodurch es nicht zu einer Amplifizierung in der qPCR kommen konnte. Zusätzlich wurde H₂O als zusätzliche Negativkontrolle eingesetzt, um dessen Kontamination mit Fremd-DNA auszuschließen.

Grundsätzlich verläuft die PCR immer in den gleichen Schritten, mit Ausnahme der spezifischen Annealingtemperaturen für die genutzten Primer. Die Amplifizierung erfolgte im Rotor Gene RG-3000 nach folgendem Schema:

- 1.) **Aktivierung der DNA-Polymerase und Denaturierung** bei 95° C für 10 Minuten
- 2.) **45 Zyklen**
 - a. 95° C für 15 Sekunden
 - b. variable Temperatur für 20 Sekunden (siehe Tabelle 8)
 - c. 72° C für 30 Sekunden
- 3.) **Durchführung einer Schmelzpunktkurve** zwischen 50° C und 99° C

Die eingesetzten Negativkontrollen waren bei allen PCR-Ansätzen negativ.

Die Überprüfung der jeweiligen Schmelzpunkte diente dem Nachweis der Spezifität des PCR-Produktes.

Die Auswertung erfolgte mit der Software „Rotor-Gene 6.1“. Durch die Bestimmung der spezifischen Schwellenwerte und den bekannten Konzentrationen der Standards wurde eine Standardkurve erstellt. Der Korrelationskoeffizient (R) der Standardkurven lag bei 0,99 und die Effizienz der PCR-Reaktionen betrug 90 bis 100 %.

5.12 Ko-Kultur von Milchsäurebakterien mit bovinen Spermien

Milchsäurebakterien wurden für einen Zeitraum von 4 Stunden mit Spermien von Zuchtbullen (n = 5) ko-kultiviert. Die Absamung der Zuchtbullen fand unter den gleichen Bedingungen statt, wie bereits bei der Untersuchung des Seminalplasmas beschrieben (siehe 5.1). Neben Bakterien, die aus dem Seminalplasma gewonnen wurden, wurde auch *L. buchneri*, isoliert aus dem bovinen Uterus (Gärtner et al. 2015), untersucht.

Die Spermienkonzentration wurde unmittelbar nach der Absamung festgestellt und es wurden von jedem Bullen 5 x 10⁷ Spermien pro Versuchsansatz genutzt. Die Zuchtbullen wurden hierfür unter den gleichen Bedingungen abgesamt wie für die kommerzielle Samengewinnung. In sterilen Reaktionsgefäßen wurden die Bakterien zusammen mit der errechneten

Spermienmenge vermengt. Als Medium wurde sowohl PBS als auch der Verdünner Triladyl verwendet. Die Messungen in PBS und Triladyl wurden bezüglich der Motilitätsparameter miteinander verglichen, um Verfälschungen auszuschließen. Der eingesetzte Verdünner beeinträchtigte die mikroskopischen Messungen nicht, weshalb nur die Versuche in Triladyl ausgewertet wurden. Es wurde ein Gesamtvolumen je Versuchsansatz von 1 ml genutzt.

Um Unterschiede bezüglich der eingesetzten bakteriellen Konzentration festzustellen, fand die Ko-Kultur jeweils in zwei unterschiedlichen kbE/ml statt. Bakterien wurden in den Konzentrationen 1×10^6 /ml und 1×10^7 /ml eingesetzt und, wie in Kapitel 5.5 beschrieben, vorbereitet. Triladyl wurde nach den Herstellerangaben angesetzt. Das hierfür benötigte kommerziell erworbene Eigelb wurde vorher filtriert.

Spermien jedes Bullen wurden zusätzlich nur mit Triladyl inkubiert, welche als Kontrollproben dienten. So konnten Änderungen der Spermienmotilität und -morphologie aufgrund äußerer Einflüsse ausgeschlossen werden.

Die Ansätze wurden unmittelbar nach Versuchsbeginn in einem Thermoblock bei 38°C inkubiert. 2 Stunden und 4 Stunden nach Beginn der Ko-Kultur wurden Motilitätsparameter der Spermien via Androvision erhoben. Die beiden Zeitpunkte wurden ausgewählt, da bovine Spermien zeitnah nach der Samengewinnung kryokonserviert werden. Hierfür wurden $4 \mu\text{l}$ aus den zuvor vorsichtig geschwenkten Reaktionsgefäßen entnommen und auf sterile vorgewärmte Objektträger pipettiert und mit einem Deckglas bedeckt. Jeweils vier Gesichtsfelder der Proben wurden ausgewertet, sodass eine Spermienzahl pro Zeitpunkt von insgesamt 1000 analysiert wurde. Es wurden bei jeder Messung Gesichtsfelder genutzt, in denen ca. 250 Spermien sichtbar waren. Gesichtsfelder, die eine sichtbar größere Anzahl veränderter Spermien zeigten und dies nicht der Anzahl anderer Gesichtsfelder entsprach, wurden nicht ausgewertet.

Via Androvision wurde die Gesamtmotilität, die progressive Motilität, die zirkuläre Motilität und die Geschwindigkeit der motilen Spermien gemessen. Nach dem gleichen Schema wurde mit den Kontrollproben vorgegangen.

Die Auswertung der Motilitätsparameter erfolgte anschließend mithilfe der Kontrollproben, um äußere Einflüsse zu detektieren.

5.13 Statistische Analysen

Die statistische Auswertung der mRNA-Expression endometrialer Epithelzellen wurde mit der Software SPSS (Version 25) durchgeführt. Die anschließenden Grafiken wurden via Microsoft Office erstellt. Die Referenzgene, GAPDH, SDHA, ACTB und SUZ12 wurden als Normalisierungsfaktoren genutzt. Die Expression dieser Referenzgene wurde mit der mRNA-Expression der untersuchten pro-inflammatorischen Faktoren mithilfe von „geNorm“ in Relation gesetzt (Vandesompele et al. 2002). Somit wurden die Expressionen der

untersuchten Faktoren durch die Expressionen der dazugehörigen Normalisierungsfaktoren dividiert.

Die relative mRNA-Expression zum Zeitpunkt „null“ wurde in der statistischen Analyse für die Zellen eines Tieres als 100 % festgelegt. Alle anderen Werte wurden auf diese Prozentangabe in Relation bezogen. Da hierbei keine Normalverteilungen aufgrund der prozentualen Angaben zugrunde gelegt werden konnten, wurden für die Auswertung nicht-parametrische Tests durchgeführt. Zwei unabhängige Stichproben wurden miteinander verglichen, indem immer die Kontrolle und die jeweilige Probe desselben Tieres via Wilcoxon-Test auf Unterschiede untersucht wurde.

Die grafische Darstellung erfolgte via Microsoft Excel. Signifikanzen ($P \leq 0,05$) sind in den Abbildungen mit „ * “ gekennzeichnet. Tendenzielle Veränderungen ($P \leq 0,1$) sind in den Abbildungen mit „T“ gekennzeichnet.

Die grafische Darstellung bezüglich des Wachstums verschiedener Milchsäurebakterien in den untersuchten Verdünnern erfolgte via Microsoft Excel.

Die statistische Auswertung der Motilitätsparameter boviner Spermien nach Ko-Kultur mit Milchsäurebakterien erfolgte ebenfalls mit der Software SPSS (Version 25). Zwei unabhängige Stichproben, die jeweilige Kontrollprobe und die mit Bakterien ko-kultivierten Spermien, wurden miteinander via Wilcoxon-Test verglichen. Es wurden nur die Motilitätsparameter in dem Verdünner Triladyl ausgewertet.

Die grafische Darstellung erfolgte via Microsoft Excel. Signifikanzen ($P \leq 0,05$) sind in den Abbildungen mit „ * “ gekennzeichnet. Es wurde nur die progressive Motilität der bovinen Spermien in dem Verdünner Triladyl grafisch dargestellt.

6 Ergebnisse

6.1 Charakterisierung von *Lactobacillales* aus bovinem Seminalplasma

In 27 der insgesamt 54 Seminalplasmaproben konnte im selektiven Nährmedium für Milchsäurebakterien kein bakterielles Wachstum festgestellt werden. Somit konnten bei 27 der Seminalplasmaproben Isolate kultiviert werden. Bei vier Proben konnten zwar Bakterien isoliert, aber aufgrund von technischen Problemen, wie beispielsweise einer zu geringen DNA-Konzentration, nicht weiter charakterisiert werden. In 23 Proben konnten Bakterien isoliert und anschließend identifiziert werden. In 11 Proben wurden *Staphylococcus (S.) spp.* isoliert. Neben nicht im Detail charakterisierbaren Spezies konnten *S. aureus*, *S. chromogenes*, *S. haemolyticus*, *S. auricularis*, *S. xylosus* und *S. pasteurii* identifiziert werden. In einer weiteren Probe wurde *Kocuria sp.*, und in einer anderen *Bacillus sp.* identifiziert.

Für diese Untersuchung relevante Spezies konnten in drei Seminalplasmaproben isoliert werden. Die Isolate *Enterococcus faecalis*, *L. mucosae* und *Leuconostoc mesenteroides* wurden weitergehend untersucht. Der Fokus dieser Studie lag auf der Ordnung *Lactobacillales*, weshalb Isolate dieser Ordnung ausgewählt wurden.

Eine Übersicht der isolierten Spezies ist in nachfolgender **Tabelle 9** dargestellt. Weiterführend untersuchte Isolate sind fett markiert.

Tabelle 9: Charakterisierung isolierter Bakterien aus dem Seminalplasma. Die fett markierten Isolate wurden für weiterführende Untersuchungen verwendet.

Probenanzahl	Identifizierte Spezies	Sequenz-Homologie	Access-Nummer
27	Kein bakterielles Wachstum	-	-
4	Nicht identifizierbar	-	-
2	<i>Enterococcus faecalis</i>	98,70 % 97,33 %	KC890839.1 CP030045.1
1	<i>Enterococcus faecium</i>	97,82 %	KU359786.1
1	<i>Enterococcus mundtii</i>	96,07 %	AJ536436.1
1	<i>Enterococcus malodoratus</i>	99,89 %	LC097068.1
1	<i>Enterococcus xiangfangensis</i>	99,35 %	MK660187.1

Probenanzahl	Identifizierte Spezies	Sequenz-Homologie	Access-Nummer
1	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	97,79 %	MH368118.1
2	<i>Staphylococcus aureus</i>	96,76 % 98,70 %	CP035005.1 KY347702.1
2	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	99,04 % 95,63 %	MH748275.1 KJ783397.1
1	<i>Staphylococcus capitis</i>	96,70 %	MF620008.1
1	<i>Staphylococcus pasteurii</i>	99,57 %	GQ284475.1
2	<i>Staphylococcus xylosus</i>	99,52 % 98,01 %	MK696228.1 MK696228.1
1	<i>Staphylococcus auricularis</i>	100 %	LS483491.1
1	<i>Kocuria kristinae</i>	96,06 %	MG972890.1
1	<i>Bacillus cereus</i>	97,15 %	MG972890.1
1	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	98,00 %	CP021491.1
3	<i>Lactobacillus mucosae 8.1</i>	98,42 %	CP011013.1
	8.2	97,67 %	CP011013.1
	31	98,00 %	KU612251.1

Durch die weitere Untersuchung von *L. mucosae 8.1* und *L. mucosae 8.2* mit einem *Lactobacillus*-spezifischen Primer (Dubernet et al. 2002) wurde bestätigt, dass es sich hierbei um vermutlich identische Isolate handelt. Die erhaltenen Sequenzen der Spacer-Region zwischen der 16S- und 23S-rDNA beider Isolate stimmen mit einer Länge von 210 Basenpaaren zu 100 % miteinander überein. Ein weiteres Isolat wurde vorerst ebenfalls als *L. mucosae*, aber dann durch die zusätzliche Sequenzierung als *Enterococcus faecalis* (CP030045.1; siehe Tabelle 9) identifiziert.

6.2 Charakterisierung von *Lactobacillales* von Penis und Präputium

Aus den Tupferproben aller 12 Tiere konnten Kolonien angezüchtet und vereinzelt werden. Es konnten 34 verschiedene Isolate für eine PCR und anschließende Sequenzierung genutzt werden.

Es wurden hauptsächlich Isolate der Ordnung *Lactobacillales* isoliert. Für weitere Untersuchungen wurden *Pediococcus spp.*, *Lactococcus spp.* und *Weissella spp.* ausgewählt, da hierfür bislang keine ähnlichen Untersuchungen durchgeführt wurden. Isolierte *Corynebacterium spp.* und *Streptococcus spp.* wurden nicht weiterführend untersucht.

Eine Übersicht der isolierten Spezies ist in den nachfolgenden **Tabellen 10** und **11** dargestellt. Weiterführend untersuchte Isolate sind fett markiert.

Tabelle 10: Charakterisierung isolierter Bakterien von der *Glans penis*. Die fett markierten Isolate wurden für weiterführende Untersuchungen verwendet.

Probenanzahl	Identifizierte Spezies	Sequenz-Homologie	Access-Nummer
1	<i>Corynebacterium phoceense</i>	98,40 %	MH119724.1
1	<i>Streptococcus equinus</i>	98,40 %	KX881778.1
1	<i>Pediococcus sp.</i>	96,02 %	MG561214.1
9	<i>Pediococcus acidilactici</i>	99,78 %	CP033438.1
		99,86 %	CP033438.1
		99,74 %	MK072824.1
		99,89 %	MK072824.1
		96,98 %	CP033438.1
		97,61 %	MK072824.1
		97,12 %	KX010104.1
		98,51 %	MH430032.1
		97,15 %	CP033438.1
2	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	96,14 %	MH936312.1
		95,83 %	MH973183.1
1	<i>Weissella thailandensis</i>	96,58 %	MF429335.1

Tabelle 11: Charakterisierung isolierter Bakterien aus der Präputialhöhle. Die fett markierten Isolate wurden für weiterführende Untersuchungen verwendet.

Probenanzahl	Identifizierte Spezies	Sequenz-Homologie	Access-Nummer
1	<i>Corynebacterium sp.</i>	99,15 %	GU904676.1
1	<i>Lactococcus garviae</i>	99,89 %	MK254968.1
1	<i>Streptococcus sp.</i>	99,74 %	MK652875.1
1	<i>Pediococcus sp.</i>	96,02 %	MG561214.1
11	<i>Pediococcus acidilactici</i>	99,89 %	CP025471.1
		97,61 %	MK072824.1
		97,12 %	MK072824.1
		98,51 %	JN039350.1
		96,00 %	MK072824.1
		96,73 %	CP033438.1
		95,88 %	KX010104.1
		97,35 %	KX010104.1
		97,75 %	KX010104.1
		96,75 %	MK719770.1
96,88 %	KX611572.1		
4	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	96,42 %	MK611140.1
		95,64 %	MK611140.1
1	<i>Weissella paramesenteroides</i>	100 %	MH844905.1
1	<i>Weissella hellenica</i>	93,70 %	LC096226.1

6.3 Einfrier- und Auftauqualität von Milchsäurebakterien in verschiedenen Verdünnern

Alle untersuchten Bakterien konnten nach dem Tiefgefrieren in den genutzten Verdünnern re-kultiviert werden. *L. mucosae* 8.1 zeigte als einziges Isolat ein größeres, jedoch nicht signifikantes, Wachstum nach dem Tiefgefrieren und Auftauen in PBS. Bei *L. mucosae* 8.2, *L. mucosae* 31, *Leuconostoc mesenteroides* und *L. buchneri* war kein Unterschied bezüglich des Wachstums in verschiedenen Verdünnern sichtbar (siehe **Abb. 5**).

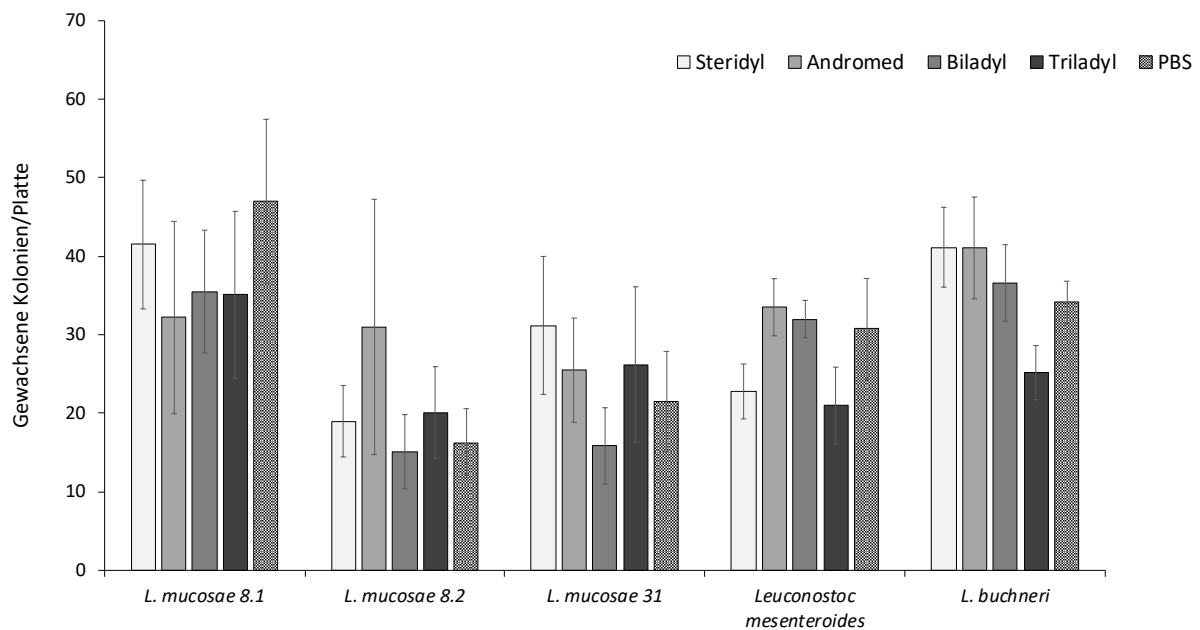


Abbildung 5: In verschiedenen Verdünnern tiefgefrorene und anschließend auf MRS-Agar re-kultivierte Isolate. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der ausgezählten Kolonien je Agar-Platte. Ausgewertet wurden verschiedene Verdünnungen: 4. dezimale Verdünnung bei *L. mucosae* 8.1, 8.2 und 31; 6. dezimale Verdünnung bei *Leuconostoc mesenteroides* und *L. buchneri*. n = 5 Ansätze.

6.4 Untersuchung von *Enterococcus faecalis*

6.4.1 Zell-Viabilität von endometrialen Epithelzellen

Die Ko-Kultur von endometrialen Epithelzellen mit *Enterococcus faecalis* führte bereits nach 24 Stunden zum Zelltod von mehr als 90 % der Zellen und zur Auflösung des Zellverbundes (siehe **Abb. 6**). Der Zelltod fand in allen MOIs und bei Zellen aller untersuchten Tiere statt. Dieses Isolat wurde nicht für weitere Untersuchungen verwendet.

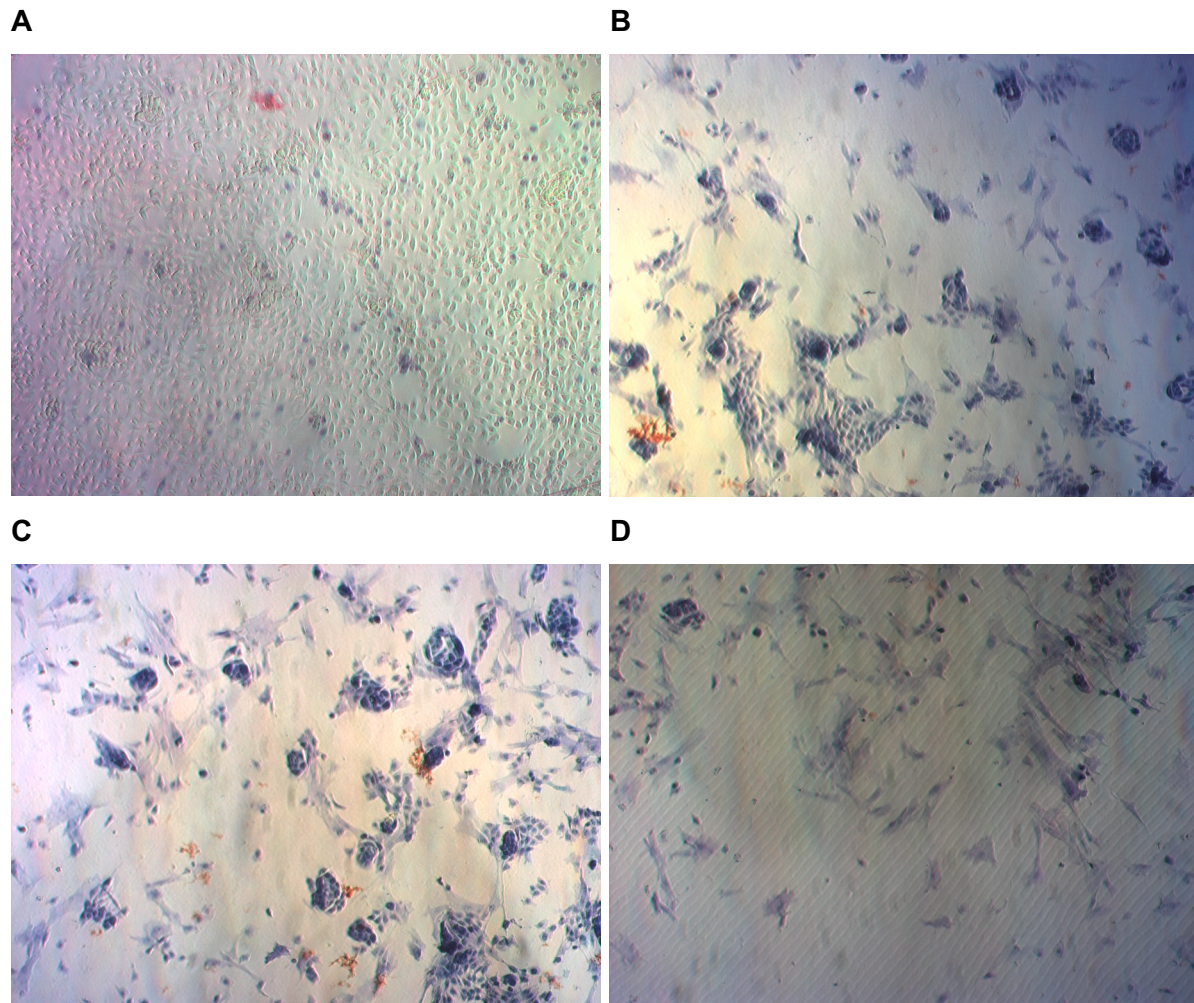


Abbildung 6: A) Kontrolle, 24h; B) MOI 1, 24h; C) MOI 5, 24h; D) MOI 10, 24h; Zell-Viabilität nach 24-stündiger Ko-Kultur von endometrialen Epithelzellen mit *Enterococcus faecalis*. 100-fache Vergrößerung. Exemplarische Aufnahmen von Zellen des gleichen Tieres.

6.5 Untersuchung von *Lactococcus garviae*

6.5.1 Zell-Viabilität von endometrialen Epithelzellen

Endometriale Epithelzellen, die mit *Lactococcus garviae* inkubiert wurden, zeigten bei allen untersuchten Tieren nach 24 und 48 Stunden in der MOI 1, MOI 5 und MOI 10 keine morphologischen Veränderungen. Nach 72 Stunden war in der MOI 1 und MOI 5 ein deutlich erhöhter Anteil nicht-vitaler Zellen sichtbar. In der MOI 10 waren die Zellen aller Tiere nicht mehr vital und nahezu vollständig von der Plastikoberfläche gelöst (siehe **Abb. 7**).

Dieses Isolat wurde nicht für weitere Untersuchungen verwendet.

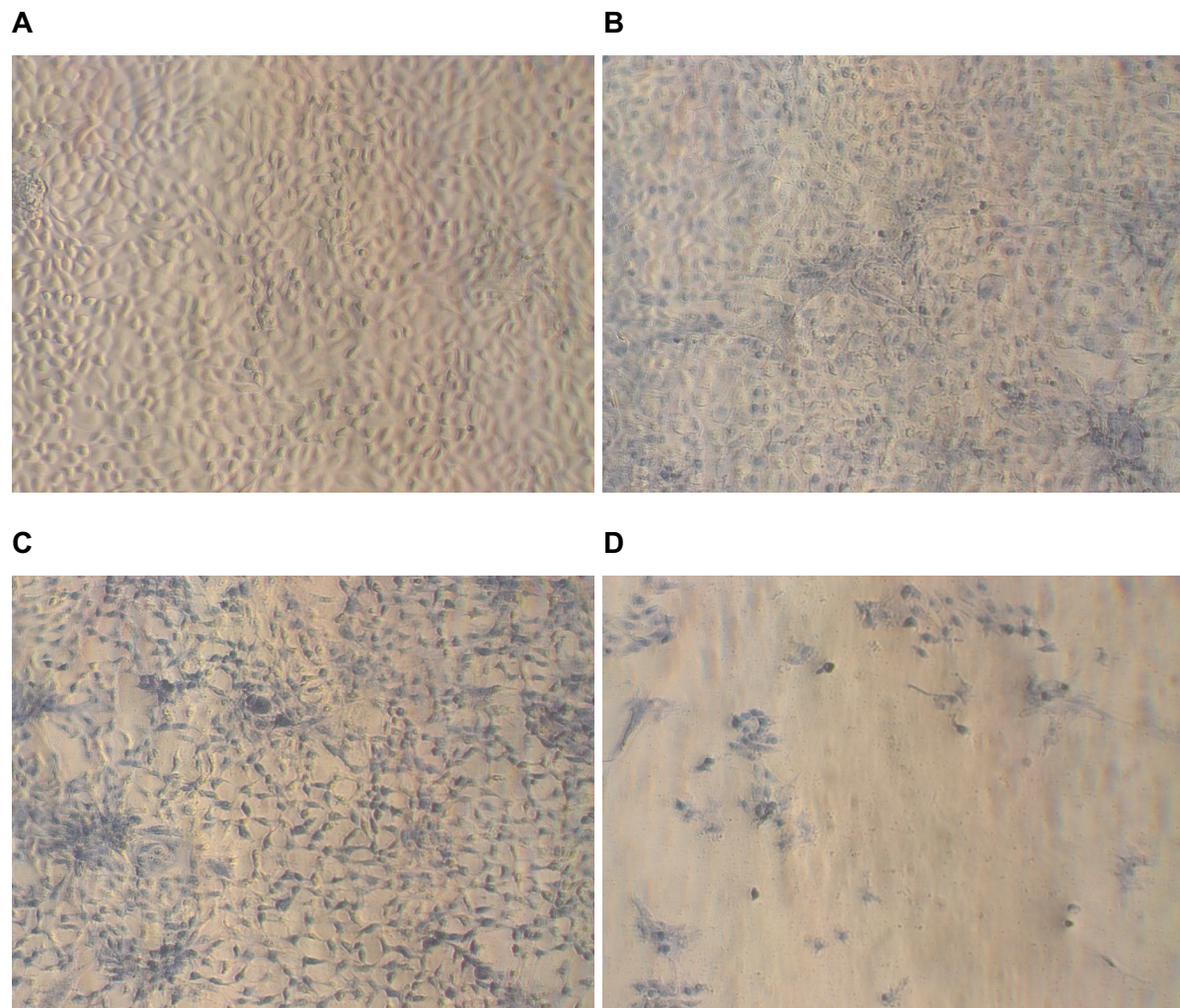


Abbildung 7: **A)** Kontrolle, 72h; **B)** MOI 1, 72h; **C)** MOI 5, 72h; **D)** MOI 10, 72h; Zell-Viabilität nach 72-stündiger Ko-Kultur von endometrialen Epithelzellen mit *Lactococcus garviae*. 100-fache Vergrößerung. Exemplarische Aufnahmen von Zellen des gleichen Tieres.

6.6 Untersuchung von *Weissella thailandensis*

6.6.1 Zell-Viabilität von endometrialen Epithelzellen

Endometriale Epithelzellen wurden mit *Weissella thailandensis* ko-kultiviert und nach 24 Stunden zeigte sich in der MOI 1 ein deutlich erhöhter Anteil nicht-vitaler Zellen. In der MOI 5 und in der MOI 10 waren die Zellen aller untersuchten Tiere vollständig von der Plastikoberfläche abgelöst (siehe **Abb. 8**). Nach 48 und 72 Stunden waren die Zellen in allen MOIs abgelöst und nicht mehr sichtbar.

Dieses Isolat wurde nicht für weitere Untersuchungen verwendet.

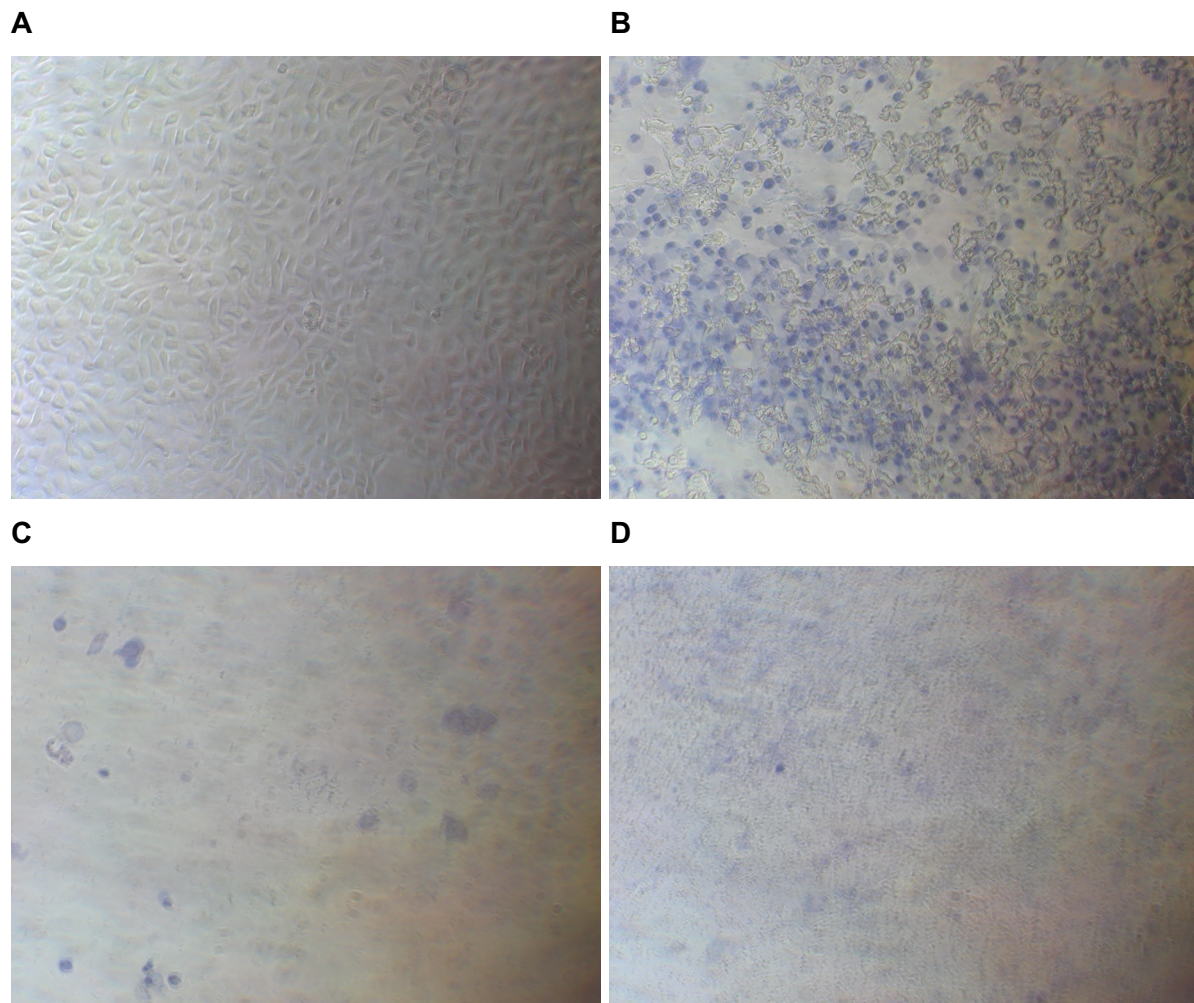


Abbildung 8: A) Kontrolle, 24h; B) MOI 1, 24h; C) MOI 5, 24h; D) MOI 10, 24h; Zell-Viabilität nach 24-stündiger Ko-Kultur von endometrialen Epithelzellen mit *Weissella thailandensis*. 100-fache Vergrößerung. Exemplarische Aufnahmen von Zellen des gleichen Tieres.

6.7 Untersuchung von *L. mucosae* 8.1

6.7.1 Zell-Viabilität von endometrialen Epithelzellen

Die Ko-Kultur endometrialer Epithelzellen mit *L. mucosae* 8.1 zeigte, dass nach 72 Stunden die Konfluenz des Zellrasens bei allen untersuchten Tieren geringer war als bei Kontrollzellen. Die Vitalität der Zellen war unverändert (siehe **Abb. 9**). Nach 24 und nach 48 Stunden waren, verglichen mit den Kontrollzellen, keine Veränderungen bezüglich der Konfluenz sichtbar.

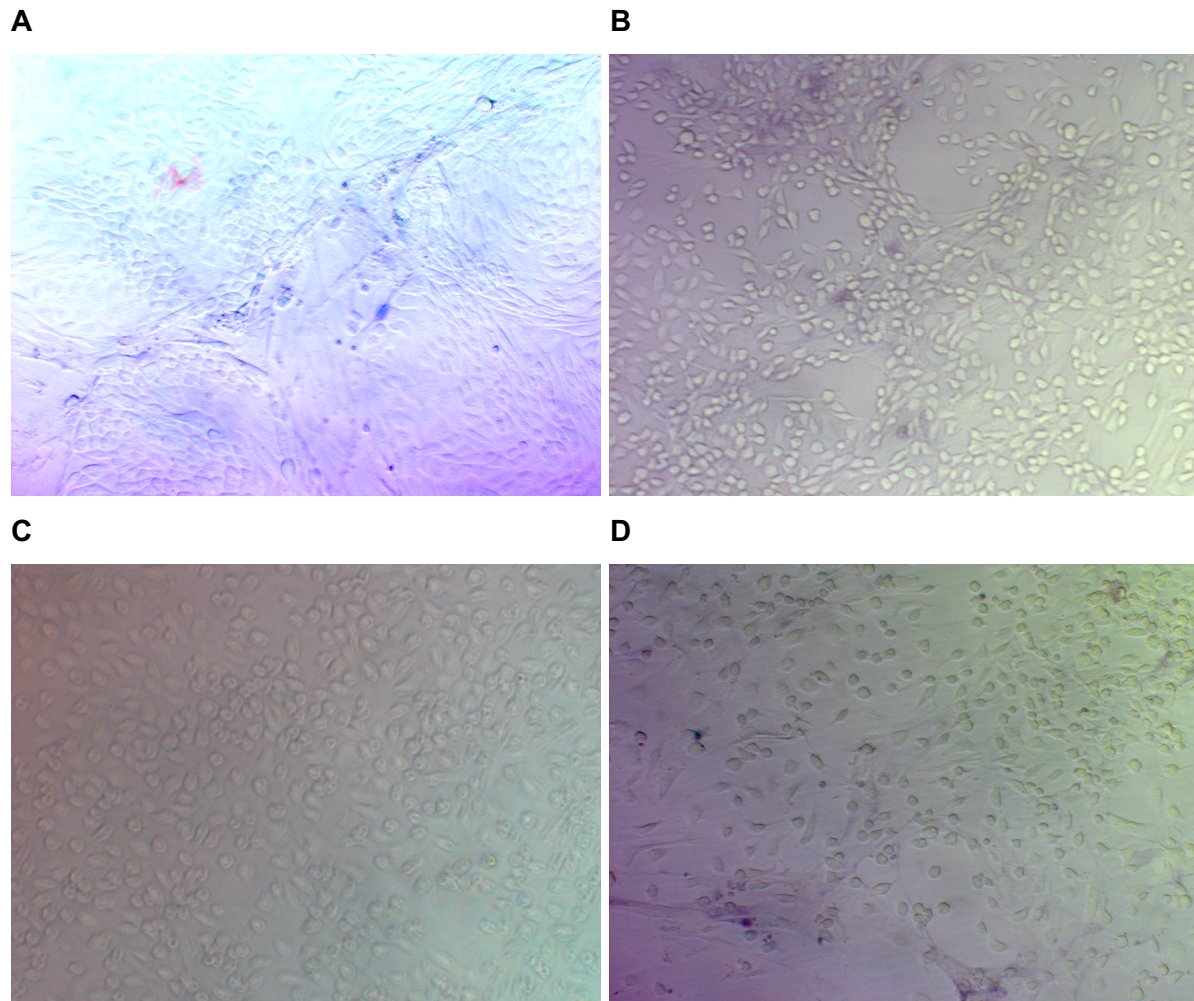


Abbildung 9: **A)** Kontrolle, 72h; **B)** MOI 1, 72h; **C)** MOI 5, 72h; **D)** MOI 10, 72h; Zell-Viabilität nach 72-stündiger Ko-Kultur von endometrialen Epithelzellen mit *L. mucosae* 8.1. 100-fache Vergrößerung. Exemplarische Aufnahmen von Zellen des gleichen Tieres.

6.7.2 mRNA-Expression endometrialer Epithelzellen

6.7.2.1 CXCL-mRNA-Expression

Die *CXCL1/2*-mRNA-Expression endometrialer Epithelzellen nach Ko-Kultur mit *L. mucosae 8.1* stieg nach 2 Stunden signifikant in der MOI 1, verglichen mit der Expression der Kontrollzellen; der Mittelwert der Erhöhung betrug das Zweifache. Nach 4 Stunden war die *CXCL1/2*-mRNA-Expression in allen MOIs signifikant um das 1,5- bis 3-fache höher. Nach 6 Stunden der Ko-Kultur zeigte sich eine signifikante Erhöhung der *CXCL1/2*-mRNA-Expression in der MOI 10 um mehr als das Dreifache, während in der MOI 1 und in der MOI 5 nur eine Erhöhung bei 4 der 5 Tiere sichtbar war ($P = 0,068$) (siehe **Abb. 10 A**).

Die *CXCL3*-mRNA-Expression war nicht signifikant verändert (siehe **Abb. 10 B**). Nach zweistündiger Ko-Kultur erhöhte sich die *CXCL3*-mRNA-Expression in der MOI 1 bei Zellen von 4 der 5 Tiere ($P = 0,068$) und in der MOI 1 nach 4 Stunden ($P = 0,063$).

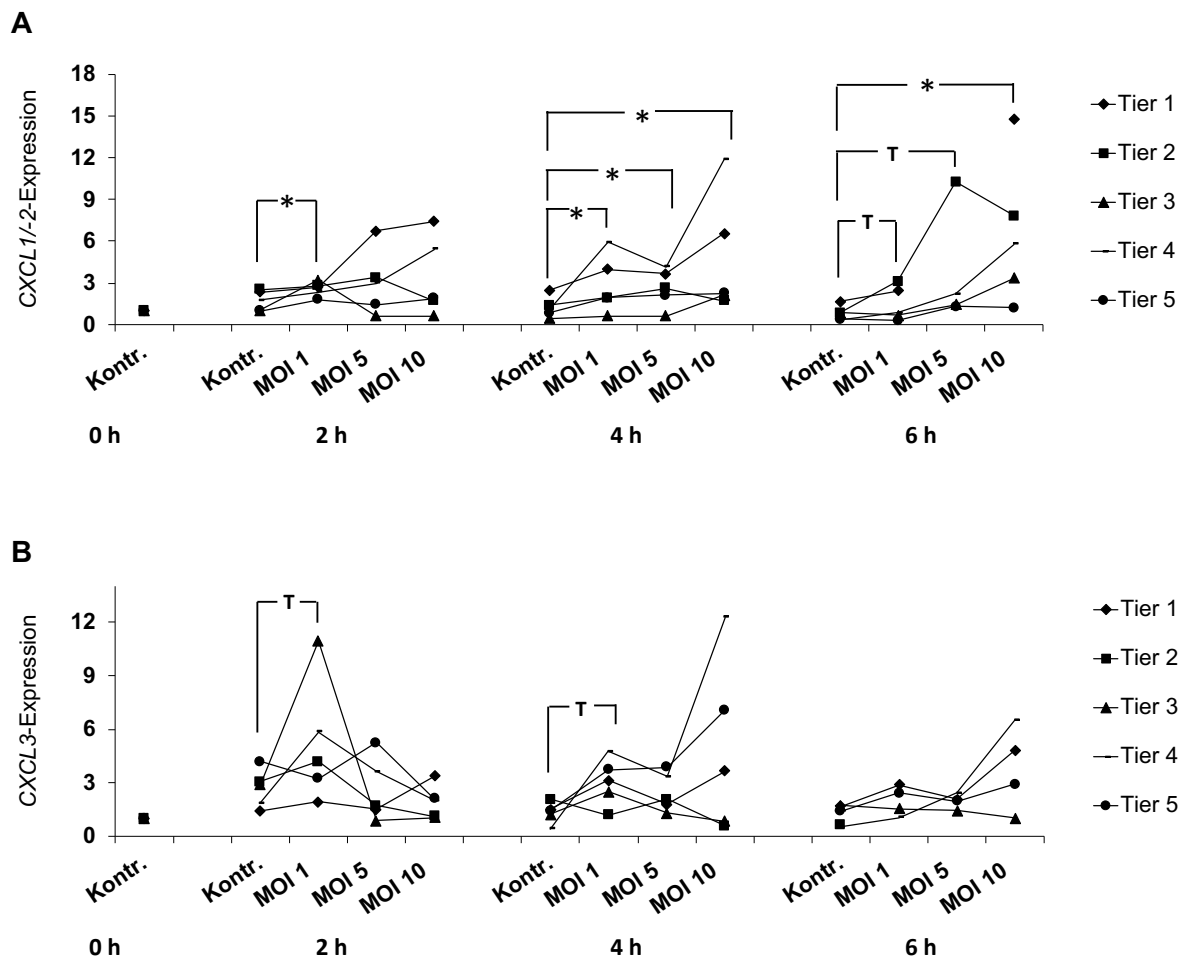


Abbildung 10: mRNA-Expression von **A) CXCL1/2**; kein Wert vorliegend bei Tier 1 in der MOI 5 nach 6 Stunden und **B) CXCL3** in bovinen endometrialen Epithelzellen nach Ko-Kultur mit *L. mucosae 8.1*. n = 5 Tiere.

Ergebnisse

Der Mittelwert der *CXCL5*-mRNA-Expression nach Ko-Kultur mit *L. mucosae 8.1* war nach 2 und 4 Stunden nicht signifikant verändert. In der MOI 10 wurde nach 6 Stunden ein signifikanter Anstieg festgestellt; der Mittelwert erhöhte sich um mehr als das Zweifache (siehe **Abb. 11**).

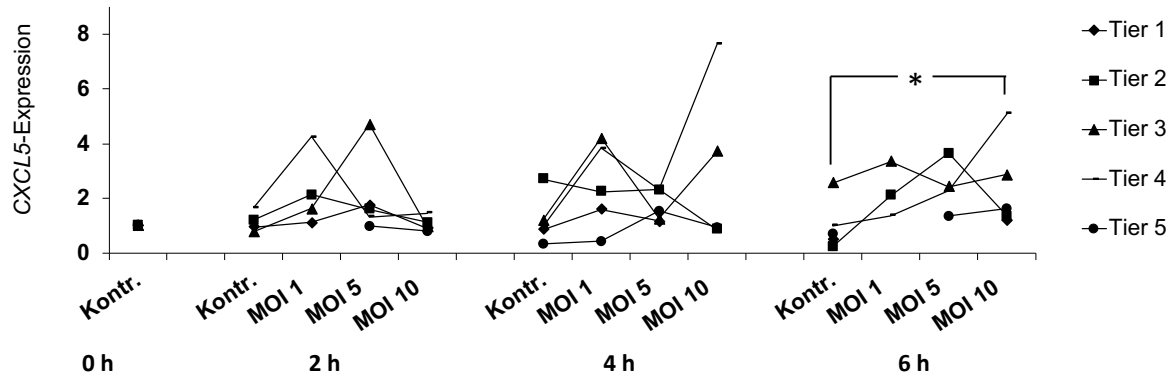


Abbildung 11: *CXCL5*-mRNA-Expression in bovinen endometrialen Epithelzellen nach Ko-Kultur mit *L. mucosae 8.1*; keine Werte vorliegend für Tier 5 in der MOI 1 nach 2 Stunden und für Tier 1 und 5 in der MOI 1 nach 6 Stunden. n = 5 Tiere.

6.7.2.2 *PTGS2*-mRNA-Expression

Nach Ko-Kultur mit *L. mucosae 8.1* war die *PTGS2*-mRNA-Expression zu keinem Zeitpunkt signifikant verändert (siehe **Abb. 12**). Die *PTGS2*-mRNA-Expression war nach 2 Stunden bei Tier 1 und nach 4 Stunden bei Tier 4 in der MOI 5 deutlich höher als bei den übrigen Tieren.

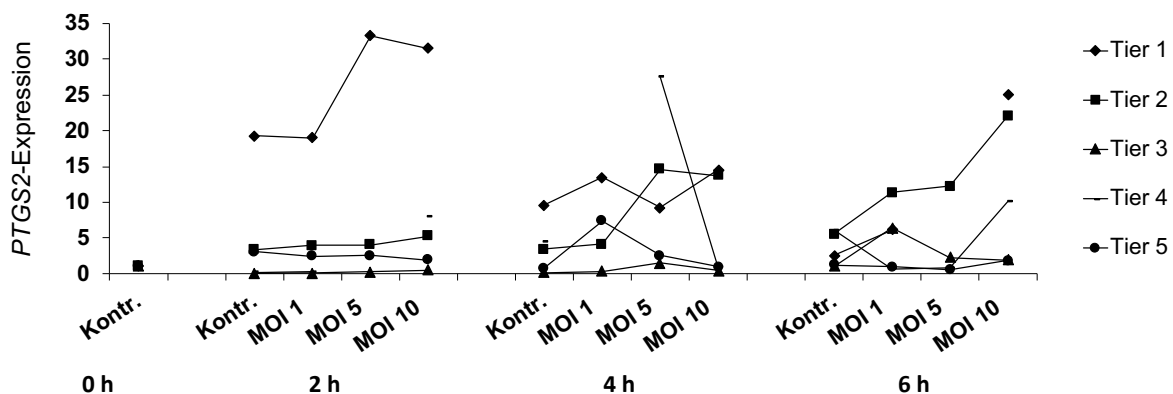


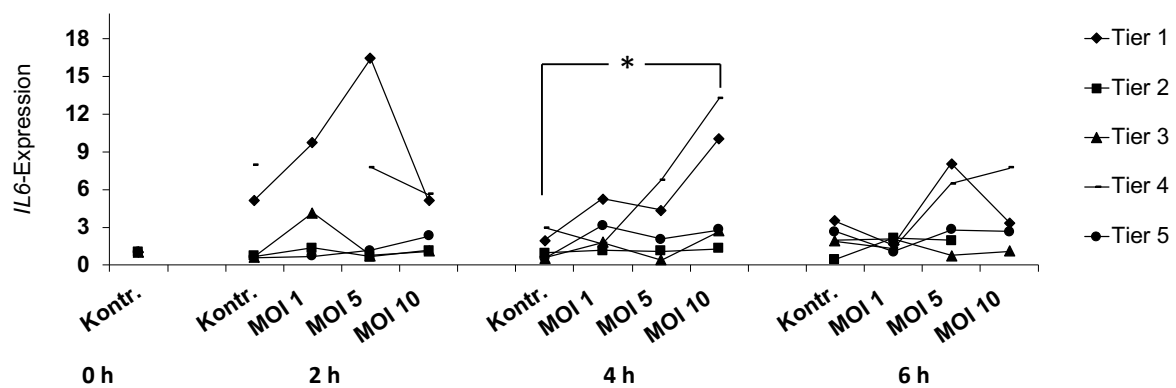
Abbildung 12: *PTGS2*-mRNA-Expression in bovinen endometrialen Epithelzellen nach Ko-Kultur mit *L. mucosae 8.1*; keine Werte vorliegend für Tier 4 in der MOI 5 nach 2 Stunden, für Tier 4 in der MOI 1 nach 4 Stunden und für Tier 1 in der MOI 5 nach 6 Stunden. n = 5 Tiere.

6.7.2.3 IL-mRNA-Expression

Die *IL6*-mRNA-Expression nach Ko-Kultur mit *L. mucosae 8.1* war nach 2 Stunden und nach 6 Stunden nicht signifikant verändert, aber bei Tier 1 nach 2 Stunden höher als bei den übrigen Tieren. Nach vierstündiger Ko-Kultur hingegen war die *IL6*-mRNA-Expression in der MOI 10 signifikant erhöht; der Mittelwert war vierfach höher (siehe **Abb. 13 A**).

Die *IL8*-mRNA-Expression der endometrialen Epithelzellen war nach 2 Stunden in der MOI 10 bei 3 der 5 Tiere erhöht ($P = 0,08$). Nach 4 Stunden und nach 6 Stunden war die *IL8*-mRNA-Expression in der jeweiligen MOI 10 signifikant höher. Der Mittelwert war zu beiden Zeitpunkten um das Fünffache erhöht (siehe **Abb. 13 B**).

A



B

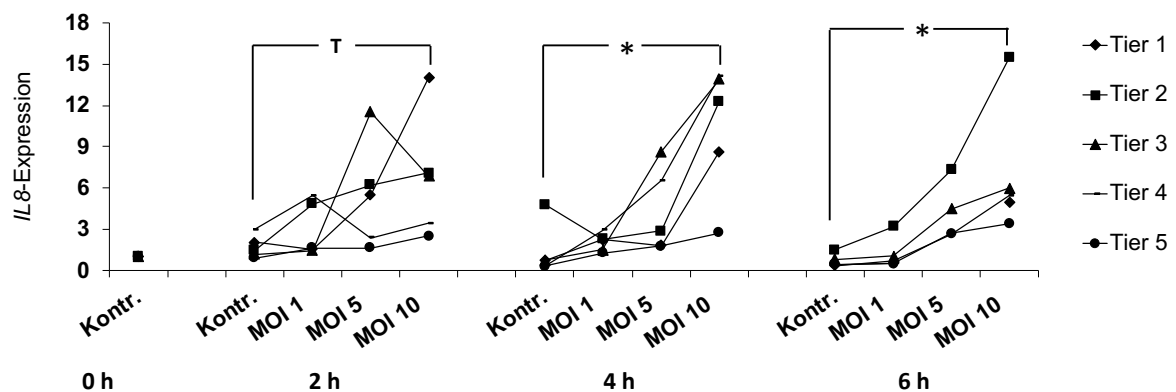


Abbildung 13: mRNA-Expression von **A)** *IL6*; kein Wert vorliegend für Tier 4 in der MOI 5 nach 2 Stunden und **B)** *IL8* in bovinen endometrialen Epithelzellen nach Ko-Kultur mit *L. mucosae 8.1*. $n = 5$ Tiere.

6.7.3 Motilität boviner Spermien nach Ko- Kultur mit *L. mucosae* 8.1

Die Gesamtmotilität, die zirkuläre Motilität, die Geschwindigkeit und die progressive Motilität der bovinen Spermien war nach Ko-Kultur mit *L. mucosae* 8.1 nicht signifikant verändert. Dies gilt für beide untersuchten Zeitpunkte und bakteriellen Konzentrationen. Die Werte für die progressive Motilität sind in nachfolgender Abbildung dargestellt (siehe **Abb. 14**). Die progressive Motilität von Spermien des Bullen E war vor allem nach 4 Stunden deutlich geringer als von Spermien anderer Bullen.

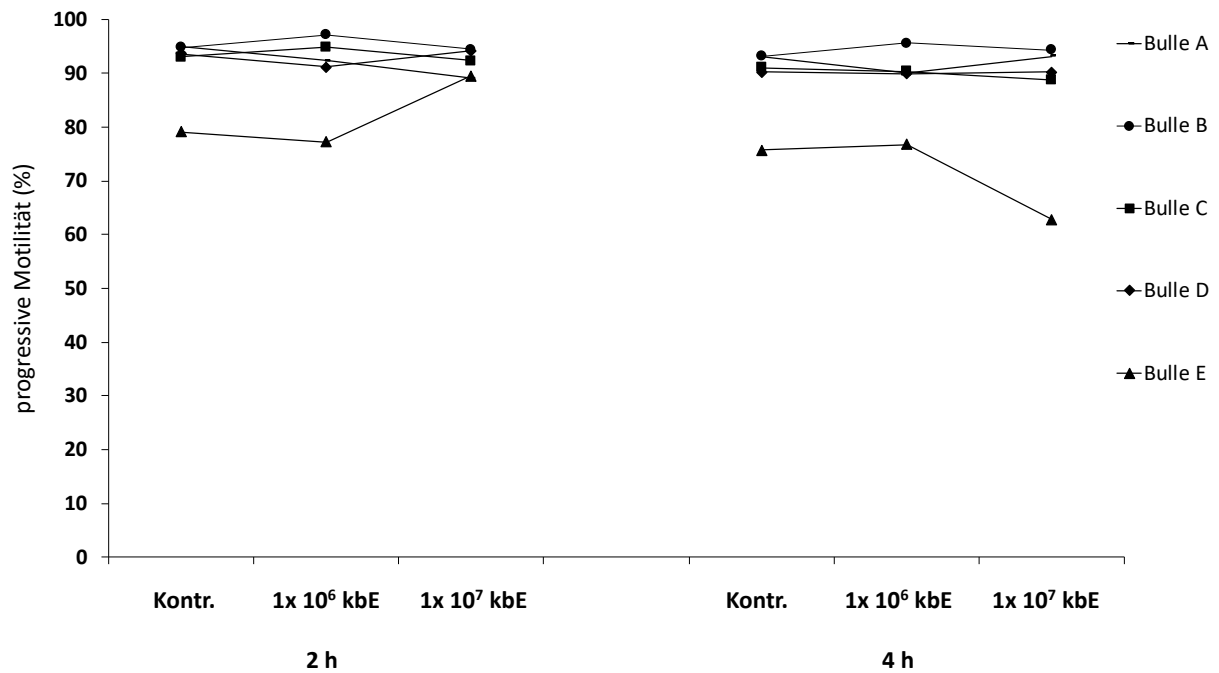


Abbildung 14: Progressive Motilität boviner Spermien nach Ko-Kultur mit *L. mucosae* 8.1 in Triladyl. n = 5 Bullen.

6.8 Untersuchung von *L. mucosae* 8.2

6.8.1 Zell-Viabilität von endometrialen Epithelzellen

L. mucosae 8.2 bewirkte bei den untersuchten endometrialen Epithelzellen aller Tiere keine mikroskopisch sichtbaren Veränderungen. Auch nach 72 Stunden war in der MOI 1, MOI 5 und MOI 10 keine Veränderung, verglichen mit den Kontrollzellen, sichtbar. Die Konfluenz des Zellrasens war in allen MOIs unverändert (siehe **Abb. 15**).

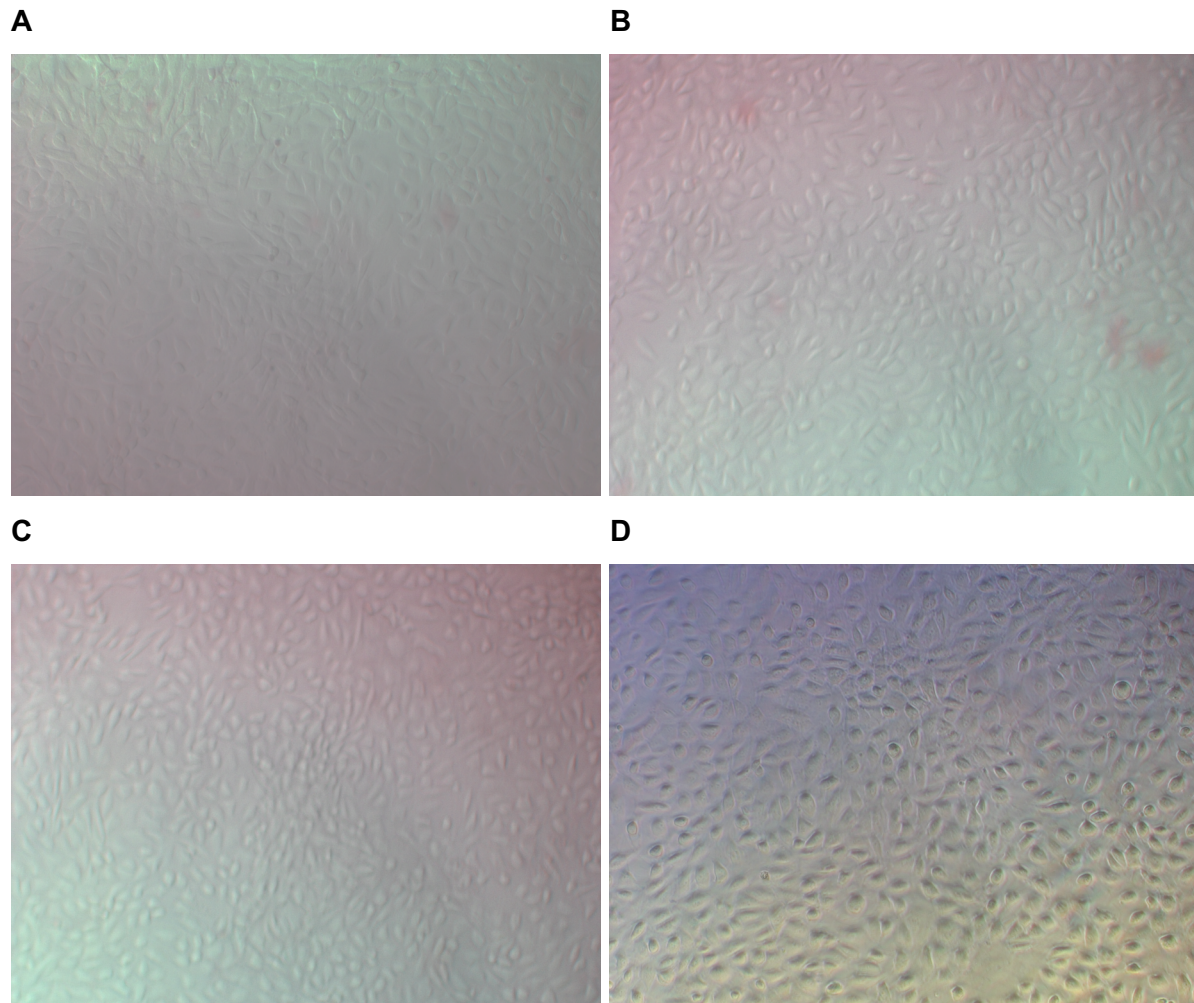


Abbildung 15: **A)** Kontrolle, 72h; **B)** MOI 1, 72h; **C)** MOI 5, 72h; **D)** MOI 10, 72h; Zell-Viabilität nach 72-stündiger Ko-Kultur von endometrialen Epithelzellen mit *L. mucosae* 8.2. 100-fache Vergrößerung. Exemplarische Aufnahmen von Zellen des gleichen Tieres.

6.8.2 mRNA-Expression endometrialer Epithelzellen

6.8.2.1 CXCL-mRNA-Expression

Die *CXCL1/-2*- und *CXCL3*-mRNA-Expression war nach Ko-Kultur mit *L. mucosae* 8.2 zu keinem untersuchten Zeitpunkt signifikant verändert (siehe **Abb. 16 A** und **B**). Die *CXCL1/-2*-mRNA-Expression war nach 6 Stunden bei Tier 2 in der MOI 10 und die *CXCL3*-mRNA-Expression bei Tier 3 in der MOI 1 höher als bei den übrigen Tieren.

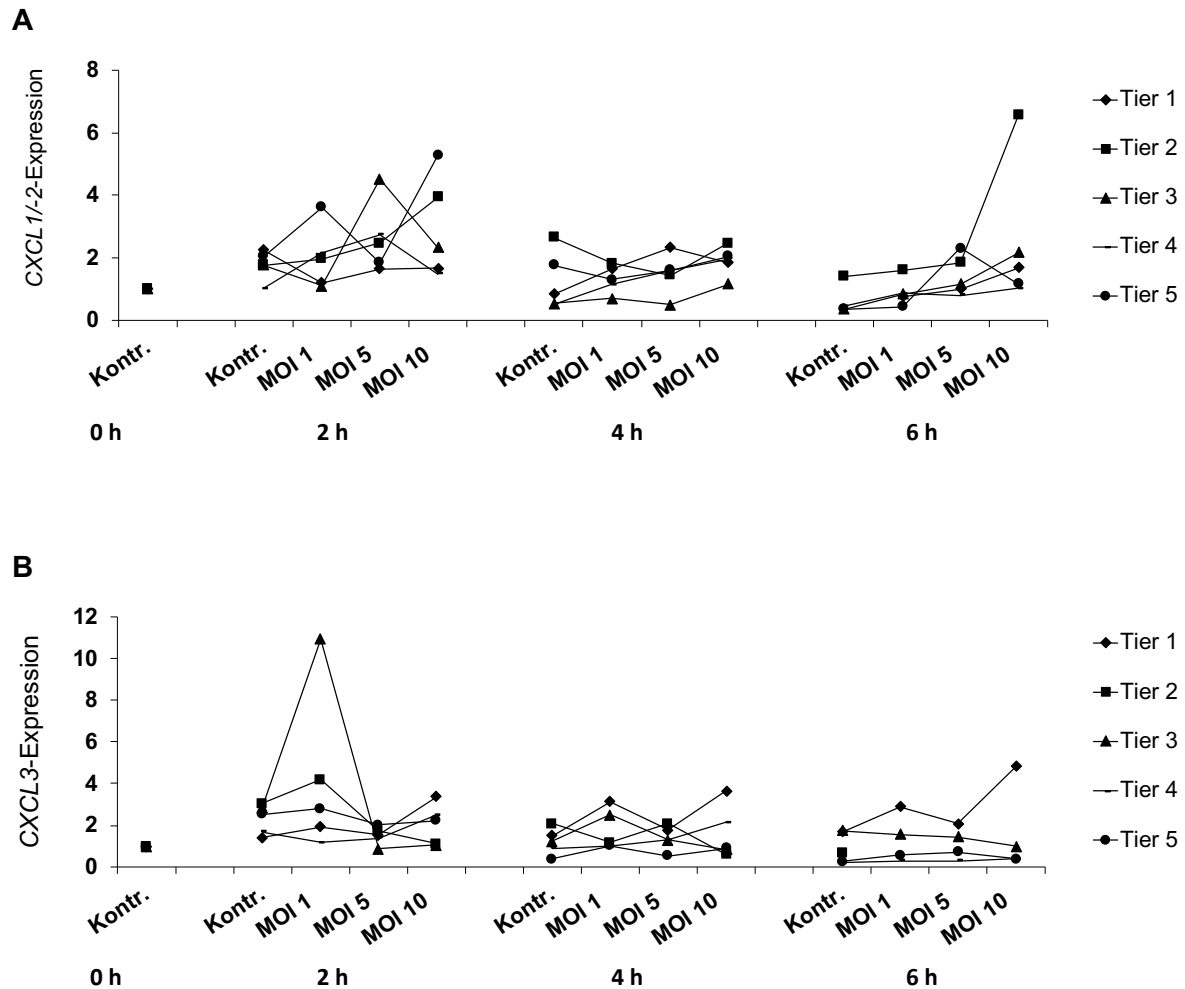


Abbildung 16: mRNA-Expression von **A) CXCL1/-2** und **B) CXCL3** in bovinen endometrialen Epithelzellen nach Ko-Kultur mit *L. mucosae* 8.2. n = 5 Tiere.

Nach Ko-Kultur mit *L. mucosae* 8.2 war die *CXCL5*-mRNA-Expression zu keinem der untersuchten Zeitpunkte signifikant verändert (siehe **Abb. 17**). Sie war nach 2 Stunden bei Tier 3 in der MOI 5 und MOI 10 höher als bei den übrigen Tieren.

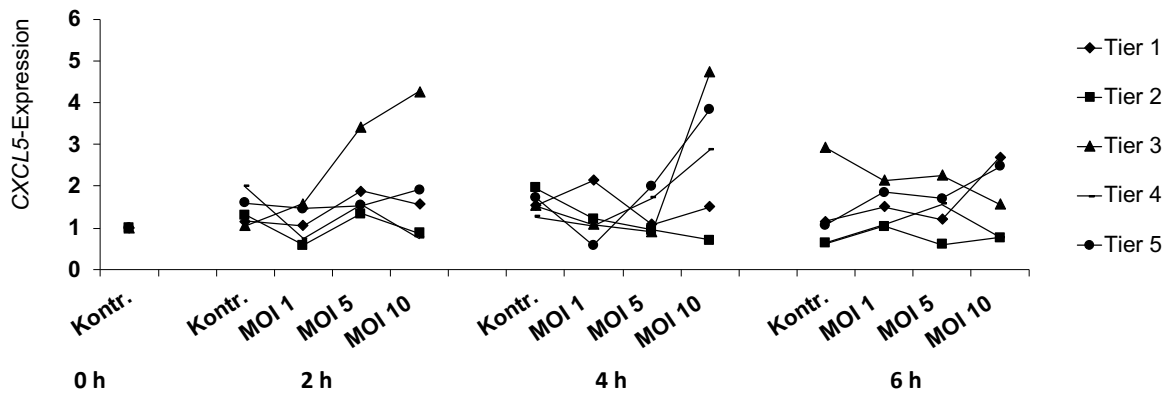


Abbildung 17: *CXCL5*-mRNA-Expression in bovinen endometrialen Epithelzellen nach Ko-Kultur mit *L. mucosae* 8.2. n = 5 Tiere.

6.8.2.2 *PTGS2*-mRNA-Expression

Zu keinem Zeitpunkt war die *PTGS2*-mRNA-Expression nach Ko-Kultur mit *L. mucosae* 8.2 signifikant verändert (siehe **Abb. 18**). Nach 2 Stunden war die *PTGS2*-mRNA-Expression bei Tier 4 in der MOI 5 und in der MOI 10 höher als bei den übrigen Tieren. Bei Tier 2 war die *PTGS2*-mRNA-Expression nach 4 Stunden in der MOI 1 und nach 6 Stunden in der MOI 10 höher als bei den übrigen Tieren.

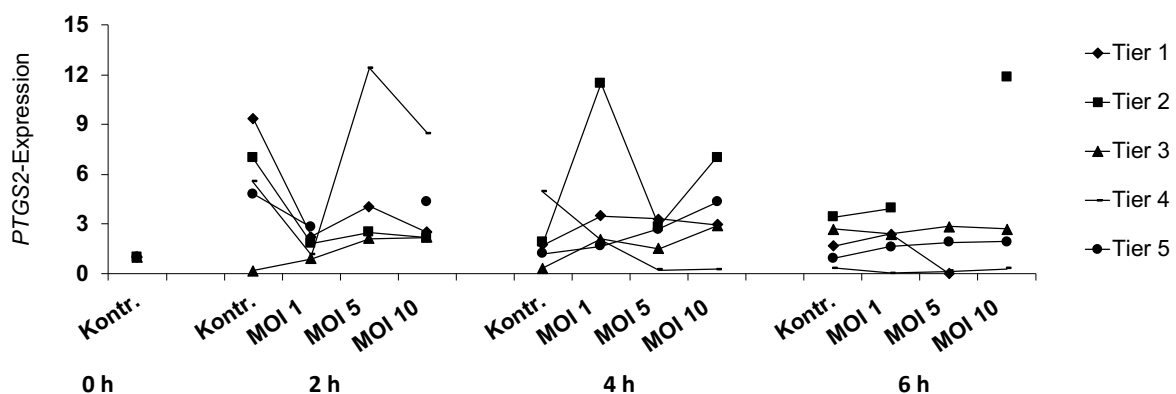


Abbildung 18: *PTGS2*-mRNA-Expression in bovinen endometrialen Epithelzellen nach Ko-Kultur mit *L. mucosae* 8.2; keine Werte vorliegend für Tier 4 in der MOI 5 nach 2 Stunden, für Tier 4 in der MOI 1 nach 4 Stunden und für Tier 1 in der MOI 5 nach 6 Stunden. n = 5 Tiere.

6.8.2.3 IL-mRNA-Expression

Die *IL6*- und *IL8*-mRNA-Expression war nach Ko-Kultur mit *L. mucosae* 8.2 zu allen untersuchten Zeitpunkten nicht signifikant verändert (siehe **Abb. 19 A** und **B**), aber die *IL8*-mRNA-Expression der Kontrollzellen war nach 2 Stunden bei Tier 1 deutlich höher als bei den übrigen Tieren.

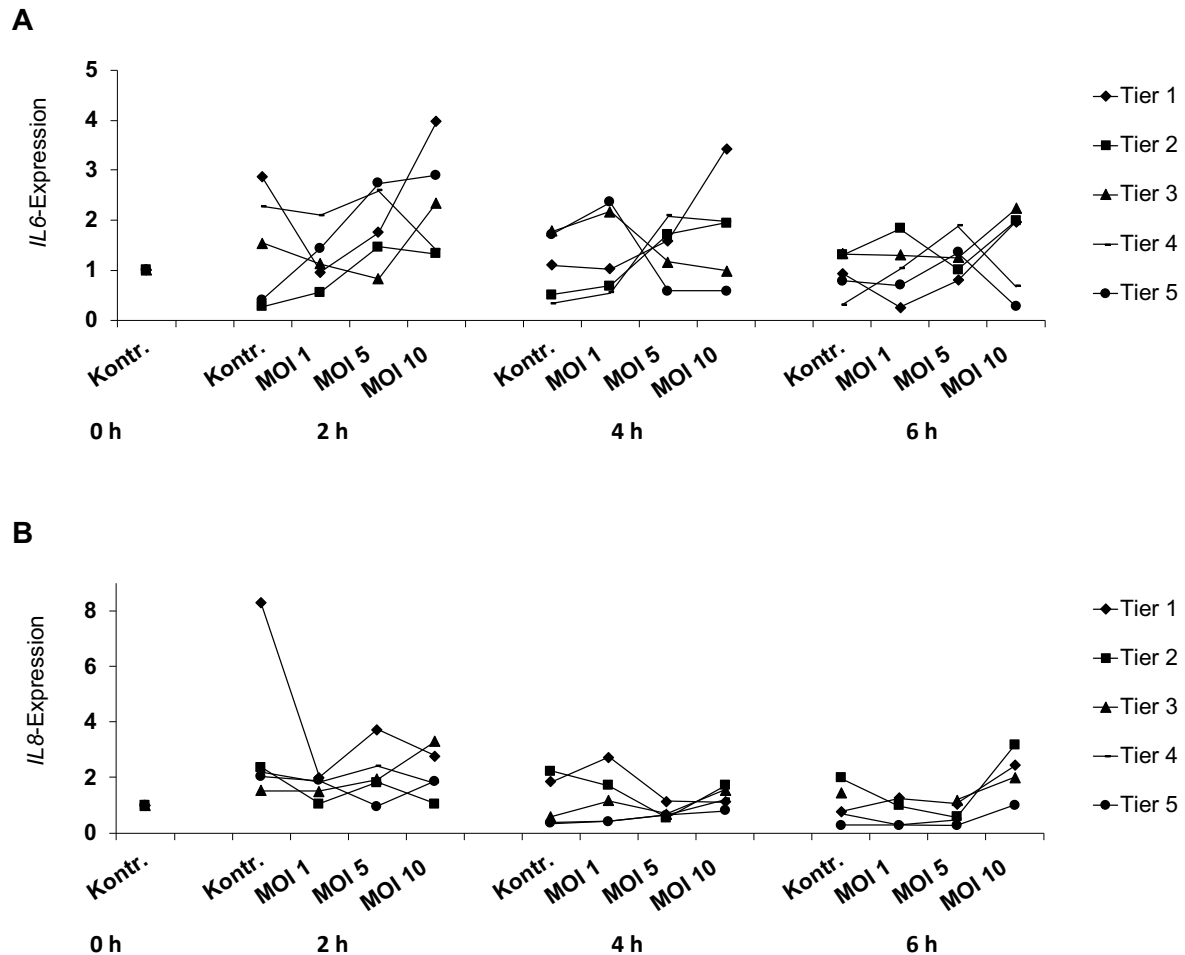


Abbildung 19: mRNA-Expression von **A)** *IL6* und **B)** *IL8* in bovinen endometrialen Epithelzellen nach Ko-Kultur mit *L. mucosae* 8.2; bei B) kein Wert vorliegend für Tier 3 in der MOI 1 nach 6 Stunden. n = 5 Tiere.

6.8.3 Motilität boviner Spermien nach Ko- Kultur mit *L. mucosae* 8.2

Die Gesamtmotilität, die zirkuläre Motilität und die Geschwindigkeit boviner Spermien war nach Ko-Kultur mit *L. mucosae* 8.2 nicht signifikant verändert. Die progressive Motilität boviner Spermien aller untersuchten Bullen verringerte sich hingegen nach 2 Stunden der Ko-Kultur mit *L. mucosae* 8.2 in einer Konzentration von 1×10^6 kbE signifikant. Der Mittelwert der progressiven Motilität verringerte sich im Vergleich zur Kontrolle um 0,95 %. Nach 4 Stunden war die progressive Motilität in beiden bakteriellen Konzentrationen nicht signifikant verändert. Die progressive Motilität von Spermien des Bullen E war grundsätzlich deutlich geringer als von Spermien anderer Bullen (siehe **Abb. 20**).

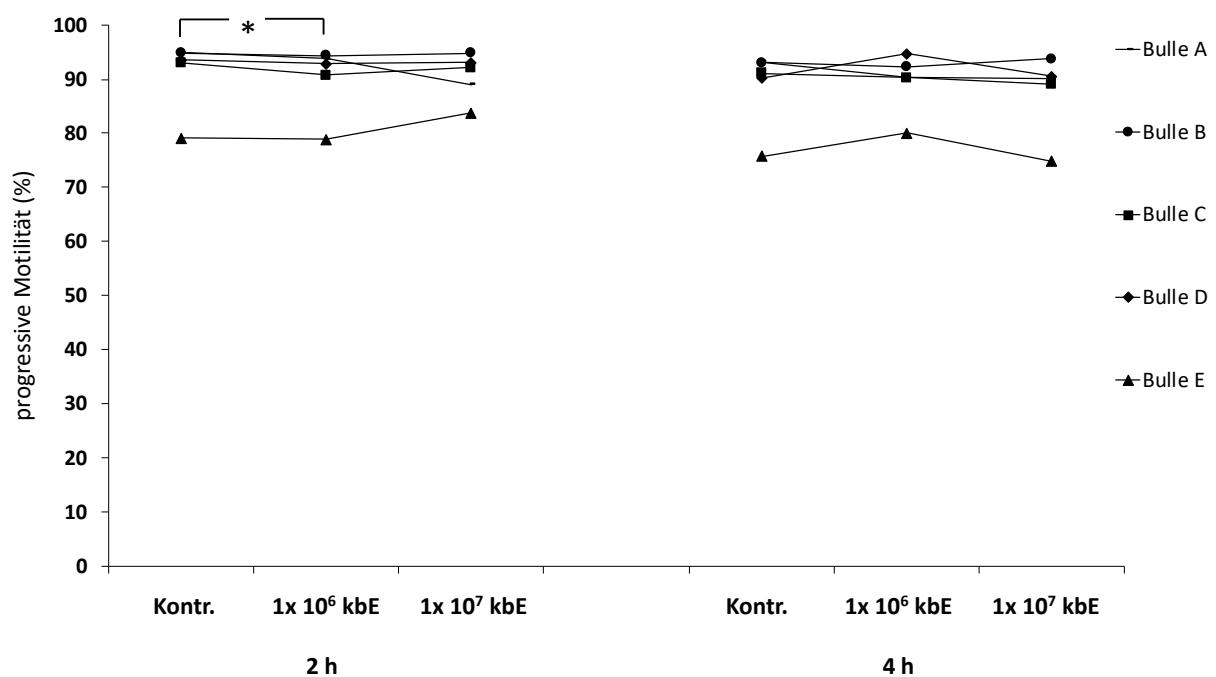


Abbildung 20: Progressive Motilität boviner Spermien nach Ko-Kultur mit *L. mucosae* 8.2 in Triladyl. n = 5 Bullen.

6.9 Untersuchung von *L. mucosae* 31

6.9.1 Zell-Viabilität von endometrialen Epithelzellen

Bei Zellen, die mit *L. mucosae* 31 ko-kultiviert wurden, konnten nach 24, 48 und 72 Stunden keine morphologischen Unterschiede bezüglich der Zell-Viabilität und der Konfluenz des Zellrasens beobachtet werden (siehe **Abb. 21**). Es gab keine morphologischen Unterschiede zwischen den Kontrollzellen und den mit Bakterien ko-kultivierten Zellen.

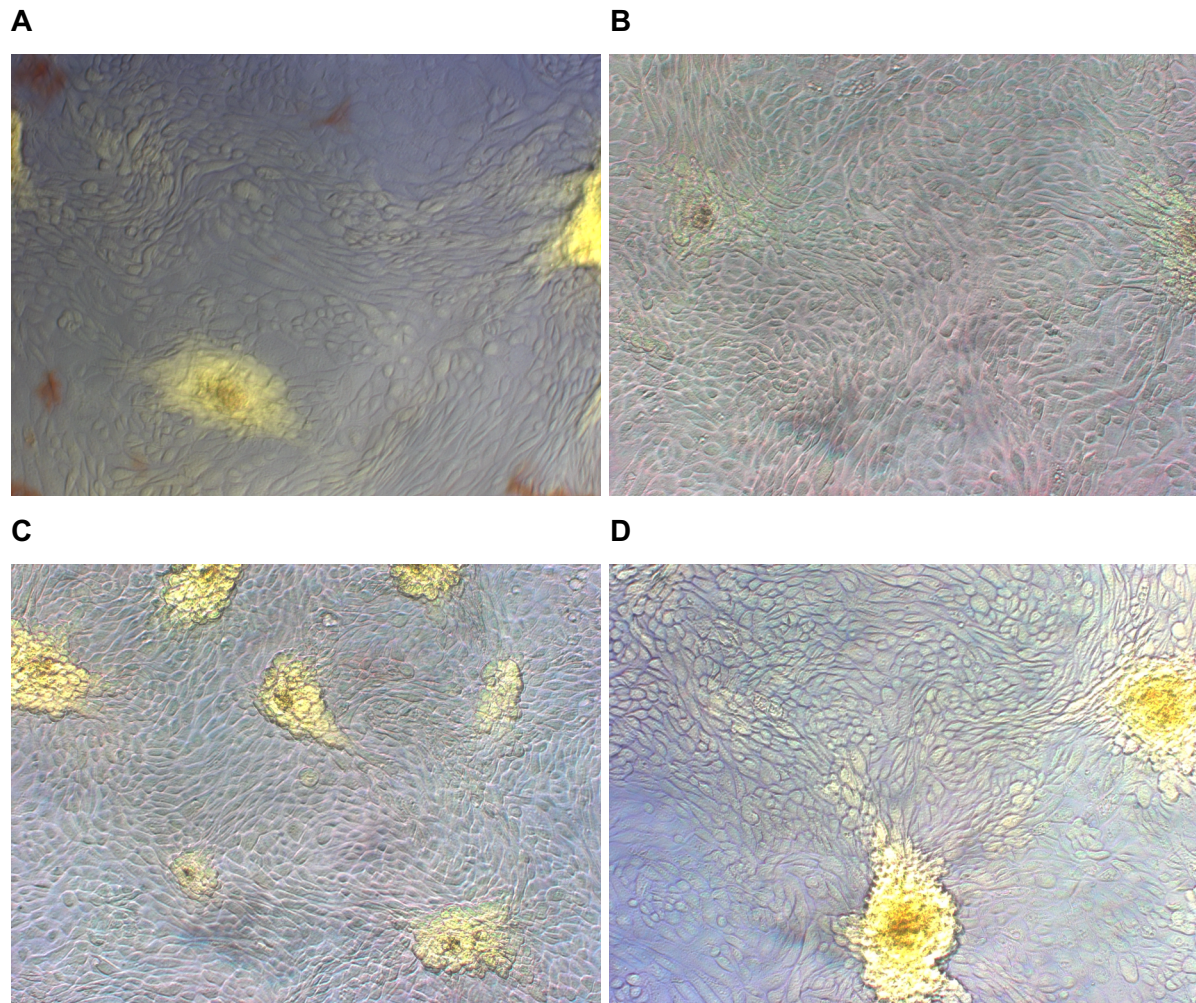


Abbildung 21: **A)** Kontrolle, 72h; **B)** MOI 1, 72h; **C)** MOI 5, 72h; **D)** MOI 10, 72h; Zell-Viabilität nach 72-stündiger Ko-Kultur von endometrialen Epithelzellen mit *L. mucosae* 31. 100-fache Vergrößerung. Exemplarische Aufnahmen von Zellen des gleichen Tieres.

6.9.2 mRNA-Expression endometrialer Epithelzellen

6.9.2.1 CXCL-mRNA-Expression

Die *CXCL1/2*-mRNA-Expression nach Ko-Kultur mit *L. mucosae 31* war nach 6 Stunden in der MOI 10 signifikant höher als bei den Kontrollzellen, während die *CXCL3*-mRNA-Expression nicht signifikant verändert war (siehe **Abb. 22 A** und **B**). Der signifikante Anstieg des Mittelwertes der *CXCL1/2*-mRNA-Expression nach 6 Stunden betrug das Zweifache.

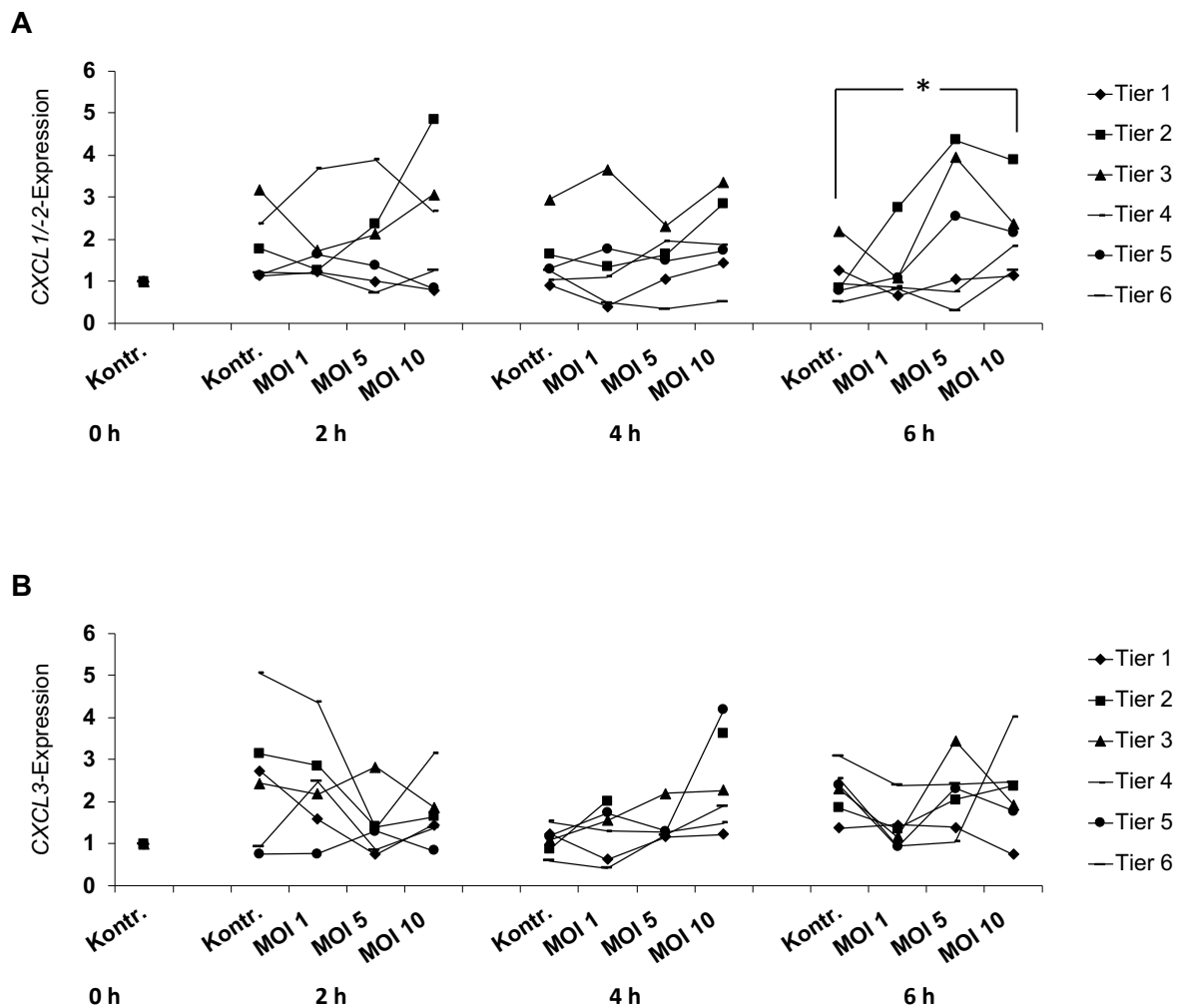


Abbildung 22: mRNA-Expression von **A) CXCL1/2** und **B) CXCL3** in bovinen endometrialen Epithelzellen nach Ko-Kultur mit *L. mucosae 31*; bei B) kein Wert vorliegend für Tier 2 in der MOI 5 nach 4 Stunden. n = 6 Tiere.

Ergebnisse

Zu allen untersuchten Zeitpunkten war die *CXCL5*-mRNA-Expression nach Ko-Kultur mit *L. mucosae* 31 nicht signifikant verändert (siehe **Abb. 23**). Bei Tier 3 war die *CXCL5*-mRNA-Expression nach 2 Stunden in der MOI 5 und in der MOI 10 deutlich höher als bei den anderen Tieren.

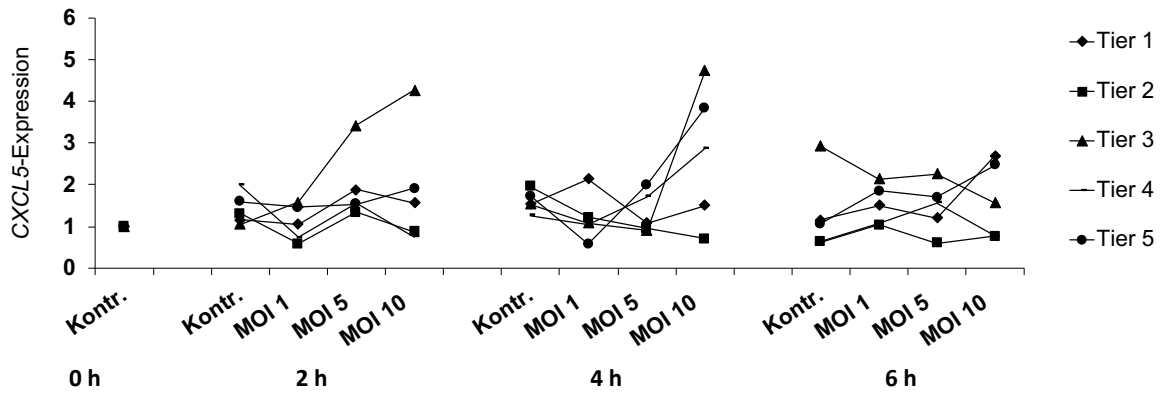


Abbildung 23: *CXCL5*-mRNA-Expression in bovinen endometrialen Epithelzellen nach Ko-Kultur mit *L. mucosae* 31. n = 5 Tiere.

6.9.2.2 *PTGS2* mRNA-Expression

Nach Ko-Kultur mit *L. mucosae* 31 war die *PTGS2*-mRNA-Expression zu keinem Zeitpunkt signifikant verändert (siehe **Abb. 24**). Die *PTGS2*-mRNA-Expression von Tier 2 war zu allen Zeitpunkten in der MOI 5 und MOI 10 höher als bei den übrigen Tieren.

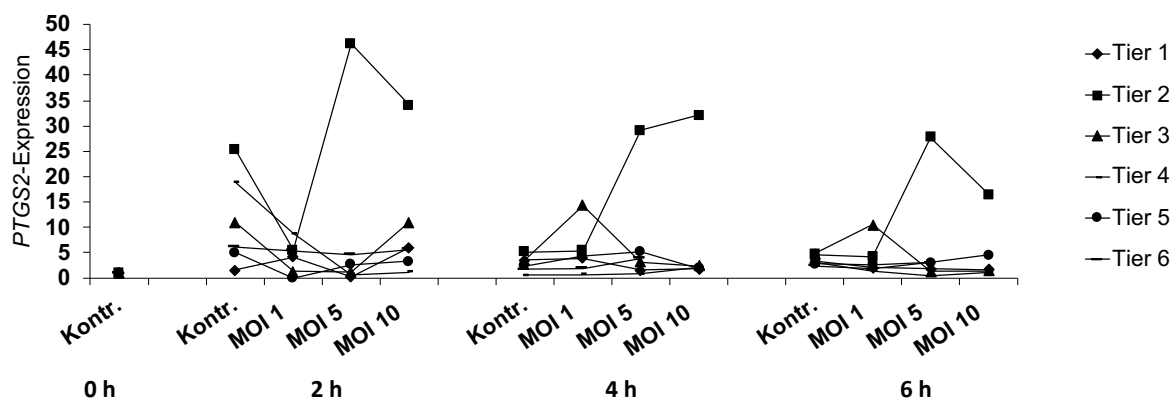


Abbildung 24: *PTGS2*-mRNA-Expression in bovinen endometrialen Epithelzellen nach Ko-Kultur mit *L. mucosae* 31. n = 6 Tiere.

6.9.2.3 IL-mRNA-Expression

Zu keinem der untersuchten Zeitpunkte war die *IL6*- und *IL8*-mRNA-Expression endometrialer Epithelzellen nach Ko-Kultur mit *L. mucosae 31* signifikant verändert (siehe **Abb. 25 A** und **B**). Bei Tier 2 war die *IL8*-mRNA-Expression nach 2 Stunden in der MOI 10 um etwa das Fünffache höher als bei den übrigen Tieren.

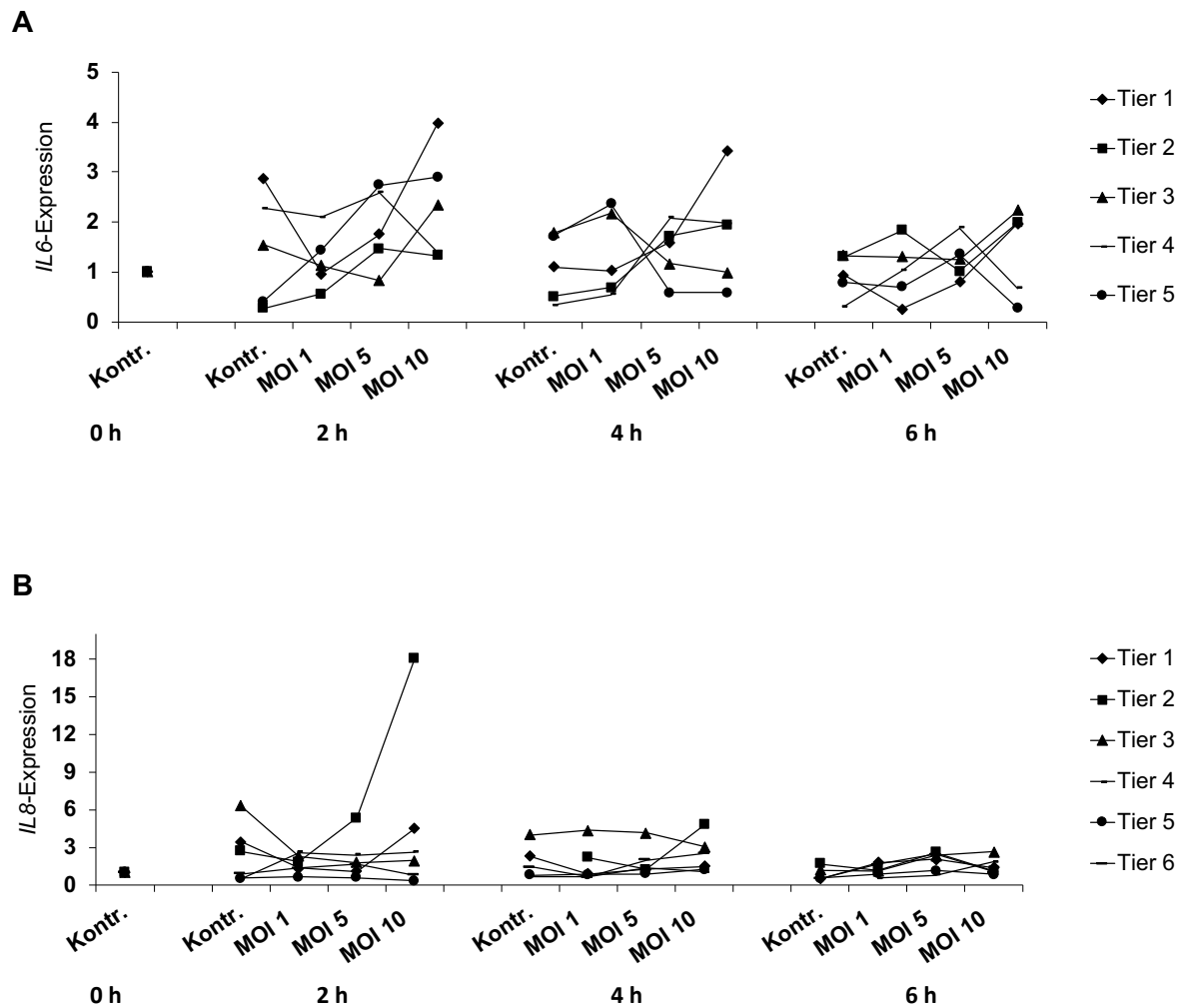


Abbildung 25: mRNA-Expression von **A) IL6** (n = 5 Tiere) und **B) IL8** in bovinen endometrialen Epithelzellen nach Ko-Kultur mit *L. mucosae 31*. n = 6 Tiere.

6.9.3 Motilität boviner Spermien nach Ko- Kultur mit *L. mucosae* 31

Die Gesamtmotilität, die zirkuläre Motilität und die Geschwindigkeit boviner Spermien nach Ko-Kultur mit *L. mucosae* 31 war nicht signifikant verändert. Die progressive Motilität der bovinen Spermien verringerte sich nach 2 und nach 4 Stunden in der Konzentration von 1×10^6 kbE signifikant. Nach 2 Stunden war die progressive Motilität um 5,5 % und nach 4 Stunden um 4,3 % verringert, verglichen mit den jeweiligen Kontrollen. In der Konzentration von 1×10^7 kbE veränderte sich die progressive Motilität zu beiden Zeitpunkten nicht signifikant (siehe **Abb. 26**).

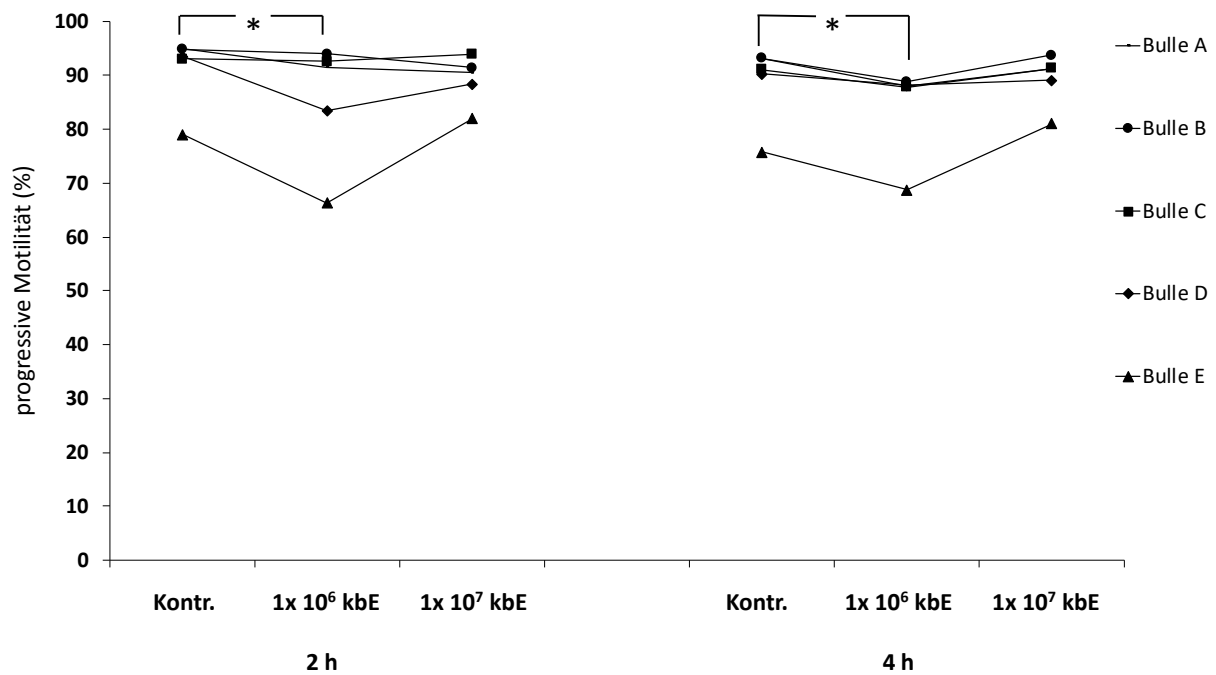


Abbildung 26: Progressive Motilität boviner Spermien nach Ko-Kultur mit *L. mucosae* 31 in Triladyl. n = 5 Bullen.

6.10 Untersuchung von *Leuconostoc mesenteroides*

6.10.1 Zell-Viabilität von endometrialen Epithelzellen

Das untersuchte Isolat *Leuconostoc mesenteroides* bewirkte zu allen Zeitpunkten keine Veränderungen bezüglich der Vitalität und der Konfluenz der Zellen (siehe **Abb. 27**). Auch hier war die Konfluenz des Zellrasens bei allen untersuchten Tieren und in allen MOIs, verglichen mit den Kontrollzellen, unverändert.

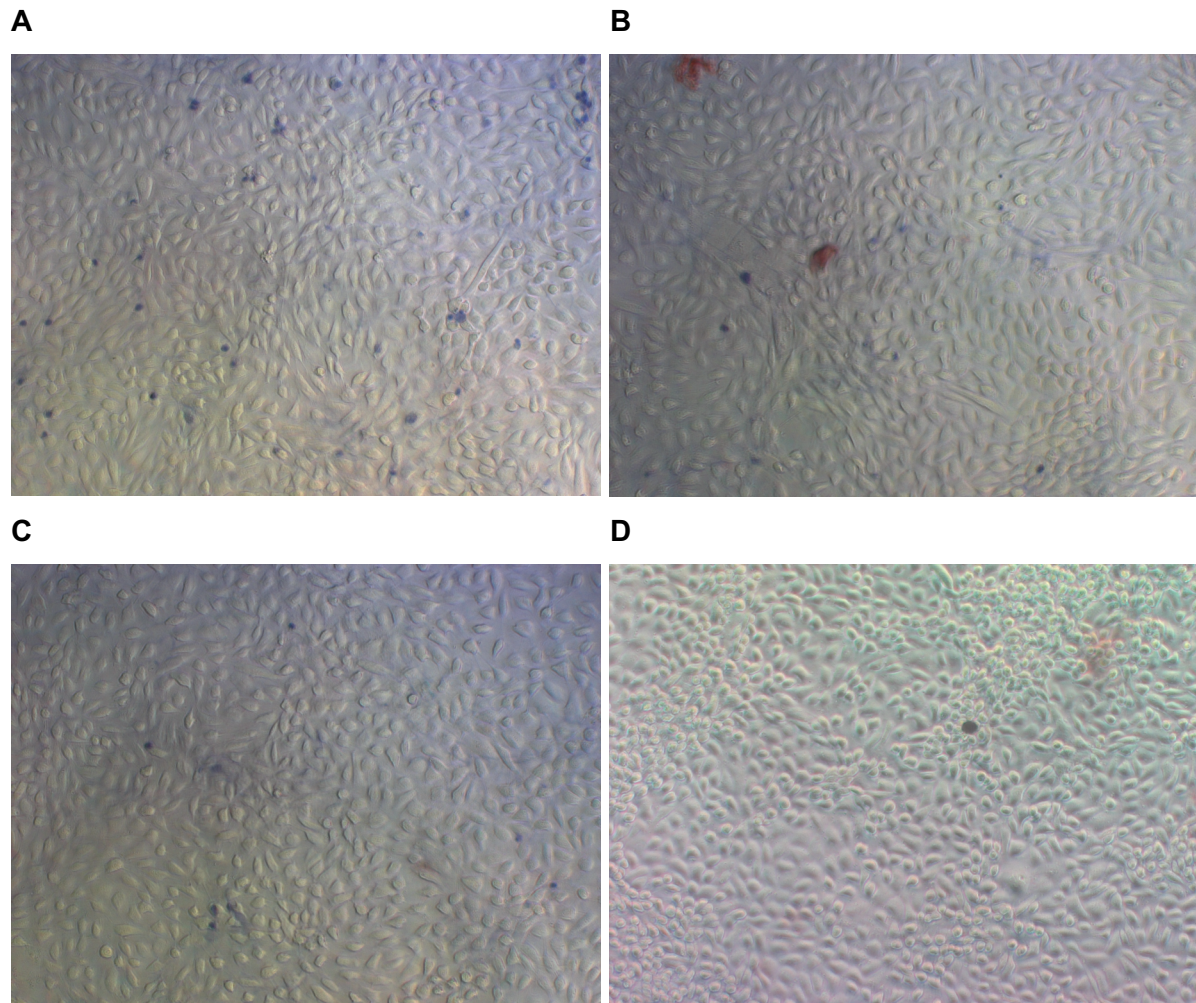


Abbildung 27: **A)** Kontrolle, 24h; **B)** MOI 1, 24h; **C)** MOI 5, 24h; **D)** MOI 10, 24h; Zell-Viabilität nach 72-stündiger Ko-Kultur von endometrialen Epithelzellen mit *Leuconostoc mesenteroides*. 100-fache Vergrößerung. Exemplarische Aufnahmen von Zellen des gleichen Tieres.

6.10.2 mRNA-Expression endometrialer Epithelzellen

6.10.2.1 CXCL-mRNA-Expression

Nach Ko-Kultur mit *Leuconostoc mesenteroides* war die CXCL1/-2-mRNA-Expression nach 2 und 4 Stunden nicht signifikant verändert. Nach 6 Stunden hingegen war die CXCL1/-2-mRNA-Expression in der MOI 10 um das 1,5-fache signifikant erhöht (siehe **Abb. 28 A**).

Die CXCL3-mRNA-Expression war nach Ko-Kultur mit *Leuconostoc mesenteroides* zu keinem untersuchten Zeitpunkt signifikant verändert (siehe **Abb. 28 B**).

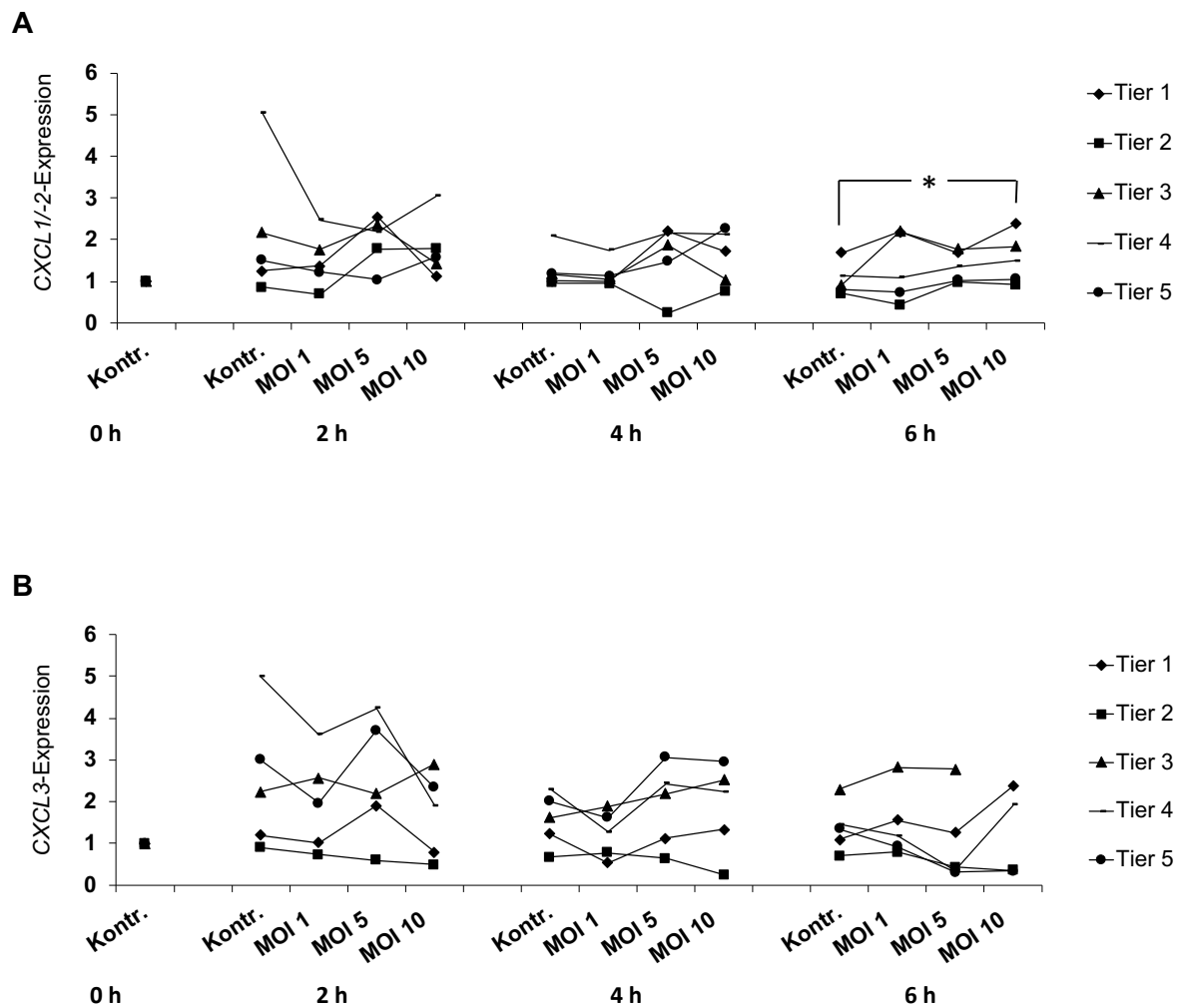


Abbildung 28: mRNA-Expression von **A)** CXCL1/-2 und **B)** CXCL3 in bovinen endometrialen Epithelzellen nach Ko-Kultur mit *Leuconostoc mesenteroides*; bei B) kein Wert vorliegend für Tier 3 nach 6 Stunden in der MOI 10. n = 5 Tiere.

4 Stunden nach Ko-Kultur mit *Leuconostoc mesenteroides* war der Mittelwert der *CXCL5*-mRNA-Expression in der MOI 5 signifikant um das Zweifache höher als bei den Kontrollzellen, aber nicht in der MOI 1 und MOI 10 (siehe **Abb. 29**).

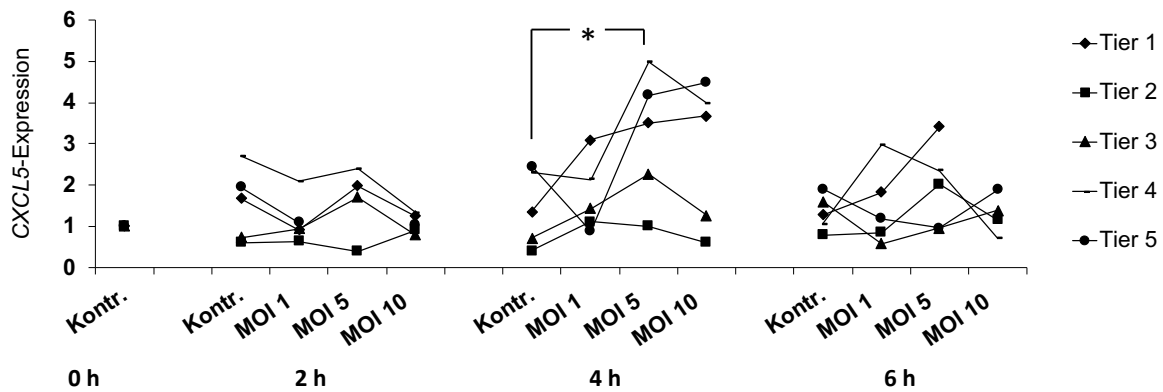


Abbildung 29: *CXCL5*-mRNA-Expression in bovinen endometrialen Epithelzellen nach Ko-Kultur mit *Leuconostoc mesenteroides*; kein Wert vorliegend für Tier 1 nach 6 Stunden in der MOI 10. n = 5 Tiere.

6.10.2.2 *PTGS2*-mRNA-Expression

Die *PTGS2*-mRNA-Expression nach Ko-Kultur mit *Leuconostoc mesenteroides* war nach 2 und nach 6 Stunden in keiner MOI signifikant verändert. Nach 4 Stunden war der Mittelwert der *PTGS2*-mRNA-Expression in der MOI 1 signifikant um das Zweifache erhöht (siehe **Abb. 30**).

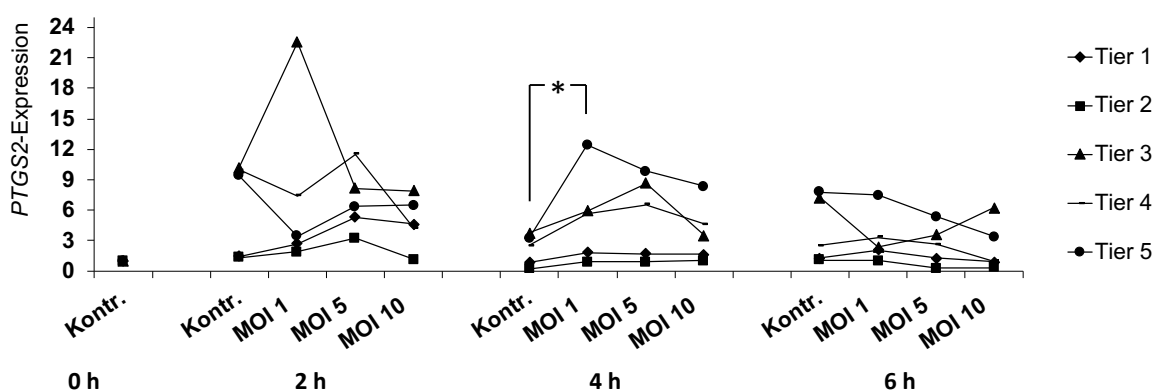


Abbildung 30: *PTGS2*-mRNA-Expression in bovinen endometrialen Epithelzellen nach Ko-Kultur mit *Leuconostoc mesenteroides*. n = 5 Tiere.

6.10.2.3 IL-mRNA-Expression

Nach Ko-Kultur mit *Leuconostoc mesenteroides* war die *IL6*- und *IL8*-mRNA-Expression zu allen untersuchten Zeitpunkten nicht signifikant verändert (siehe **Abb. 31 A** und **B**).

Die *IL8*-mRNA-Expression von Tier 4 war nach 2 Stunden deutlich höher als bei den übrigen Tieren.

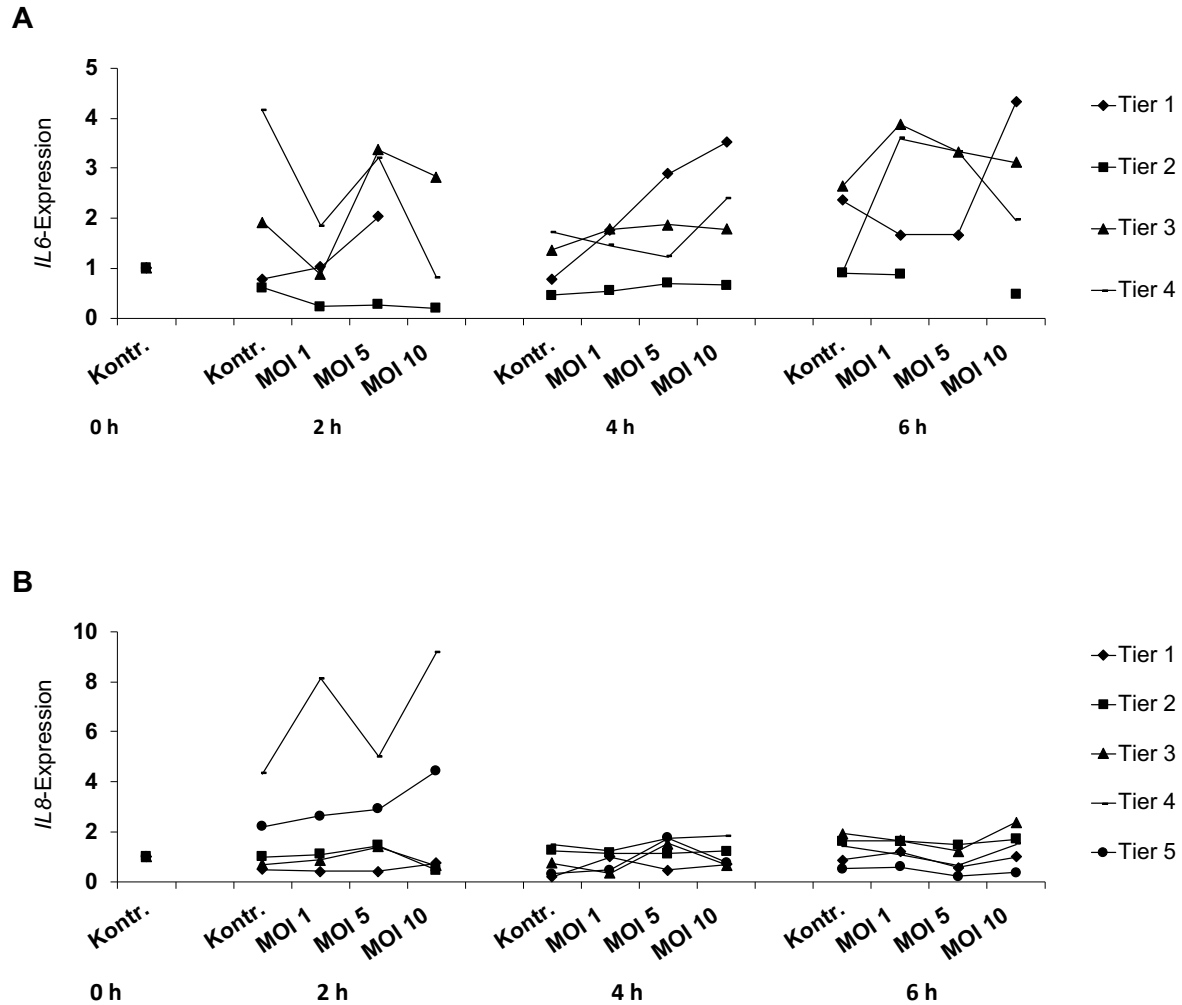


Abbildung 31: mRNA-Expression von **A) IL6** (n = 4 Tiere); kein Wert vorliegend für Tier 1 nach 2 Stunden in der MOI 1 und für Tier 2 nach 6 Stunden in der MOI 5 und **B) IL8** in bovinen endometrialen Epithelzellen nach Ko-Kultur mit *Leuconostoc mesenteroides*. n = 5 Tiere.

6.10.3 Motilität boviner Spermien nach Ko- Kultur mit *Leuconostoc mesenteroides*

Die Gesamtmotilität, die zirkuläre Motilität, die Geschwindigkeit und die progressive Motilität boviner Spermien war nach Ko-Kultur mit *Leuconostoc mesenteroides* zu beiden Zeitpunkten und in beiden bakteriellen Konzentrationen nicht signifikant verändert. Die progressive Motilität ist in folgender Abbildung dargestellt (siehe **Abb. 32**).

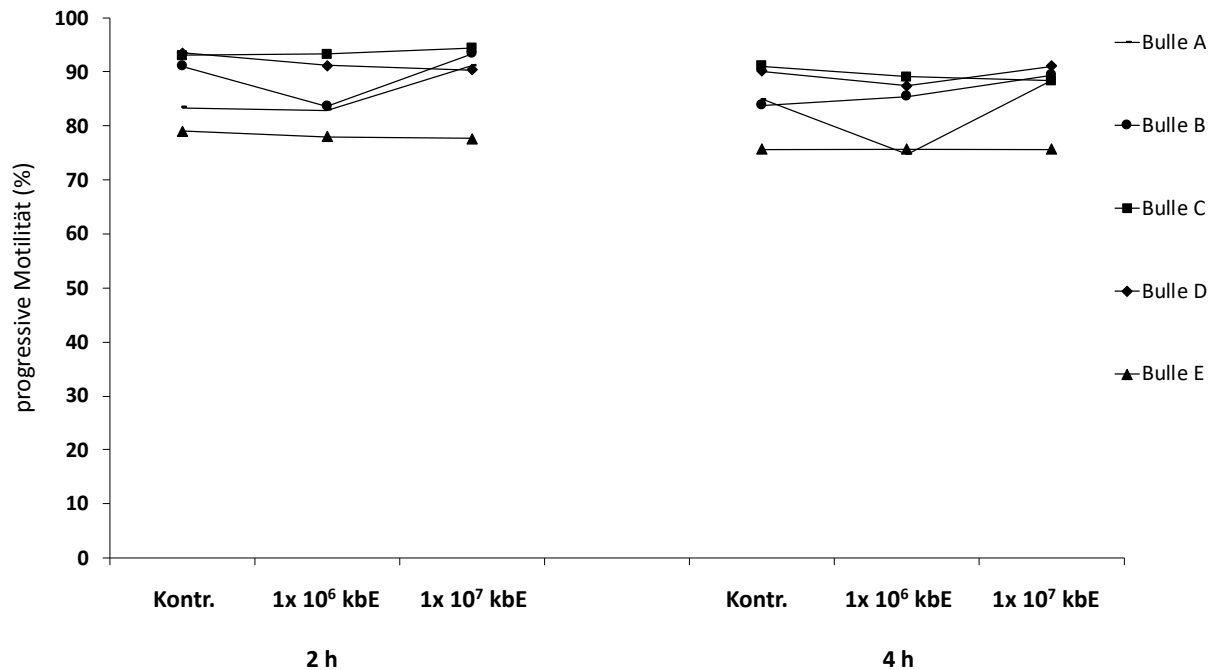


Abbildung 32: Progressive Motilität boviner Spermien nach Ko-Kultur mit *Leuconostoc mesenteroides* in Triladyl. n = 5 Bullen.

6.11 Untersuchung von *Pediococcus acidilactici*

6.11.1 Zell-Viabilität von endometrialen Epithelzellen

Pediococcus acidilactici führte in den ersten 24 und 48 Stunden nach Ko-Kultur mit endometrialen Epithelzellen in allen drei MOIs nicht zu morphologischen Veränderungen. Nach 72 Stunden hingegen war ein Großteil der Zellen aller untersuchten Tiere in der MOI 5 nicht mehr vital und die meisten Zellen in der MOI 10 waren von der Plastikoberfläche abgelöst (siehe **Abb. 33**).

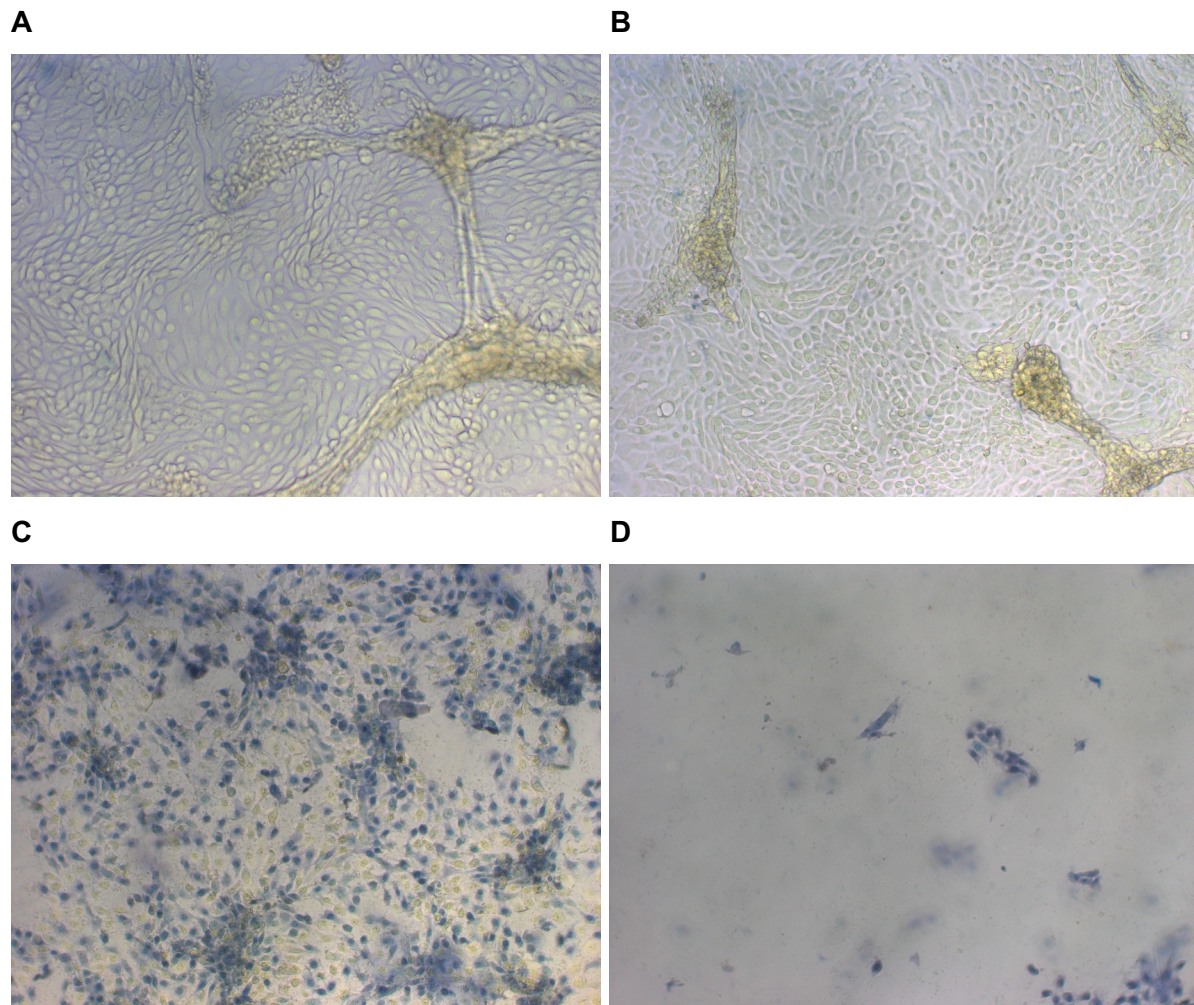


Abbildung 33: **A)** Kontrolle, 24h; **B)** MOI 10, 24h; **C)** MOI 5, 72h; **D)** MOI 10, 72h; Zell-Viabilität nach 72-stündiger Ko-Kultur von endometrialen Epithelzellen mit *Pediococcus acidilactici*. 100-fache Vergrößerung. Exemplarische Aufnahmen von Zellen des gleichen Tieres.

6.11.2 mRNA-Expression endometrialer Epithelzellen

6.11.2.1 CXCL-mRNA-Expression

Die *CXCL1/2*- und *CXCL3*-mRNA-Expression war nach Ko-Kultur mit *Pediococcus acidilactici* in allen MOIs zu keinem Zeitpunkt signifikant verändert. Nach 6 Stunden der Ko-Kultur war der Mittelwert der *CXCL1/2*-mRNA-Expression in der MOI 10 um das Zweifache erhöht ($P = 0,068$). Nach 4 Stunden der Ko-Kultur war die *CXCL3*-mRNA-Expression bei Tier 3 in der MOI 10 deutlich höher als bei den übrigen Tieren (siehe **Abb. 34 A und B**).

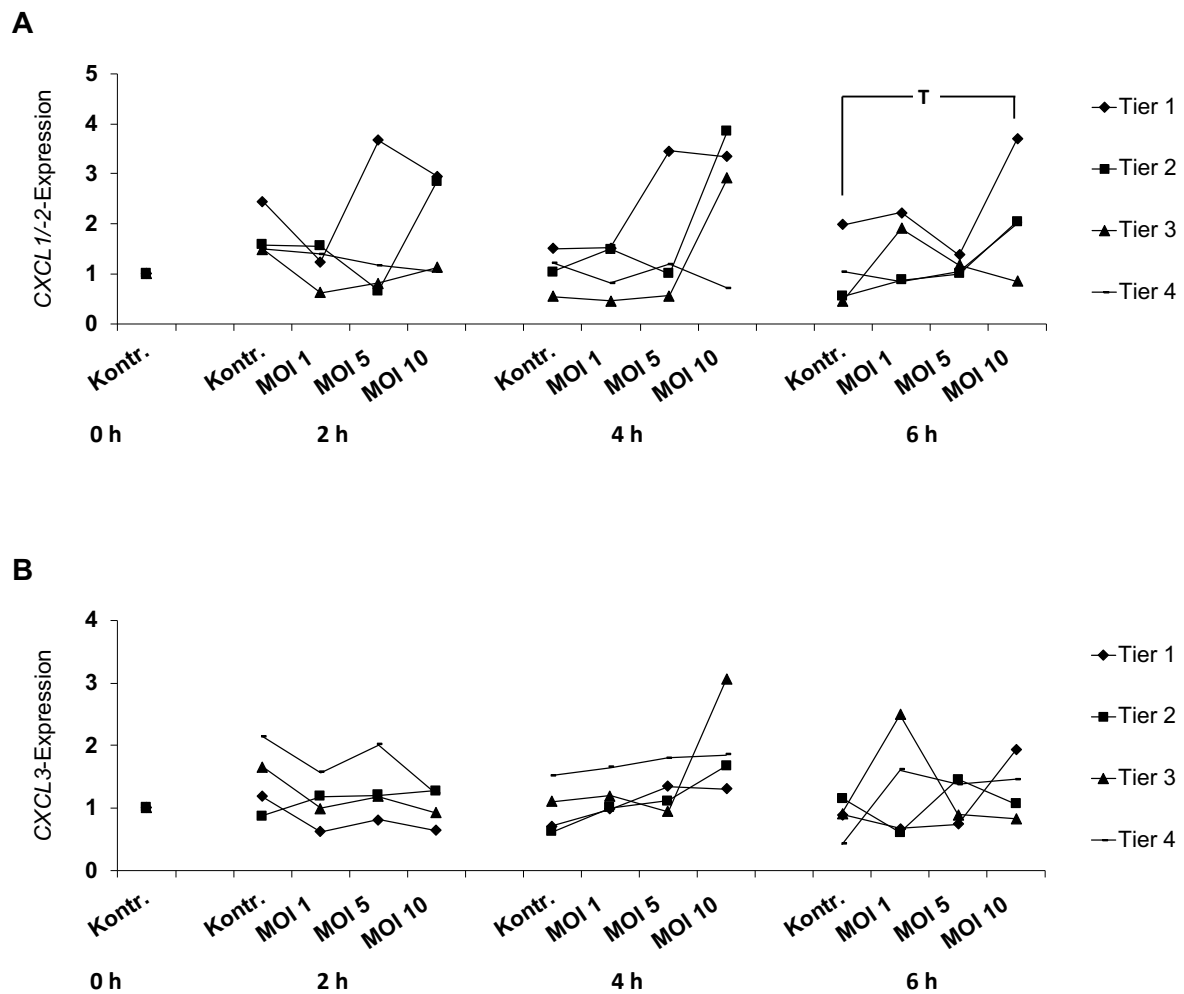


Abbildung 34: mRNA-Expression von **A) CXCL1/2** und **B) CXCL3** in bovinen endometrialen Epithelzellen nach Ko-Kultur mit *Pediococcus acidilactici*. n = 4 Tiere.

Ergebnisse

Die *CXCL5*-mRNA-Expression war nach Ko-Kultur mit *Pediococcus acidilactici* ebenfalls zu keinem der untersuchten Zeitpunkte signifikant verändert (siehe **Abb. 35**).

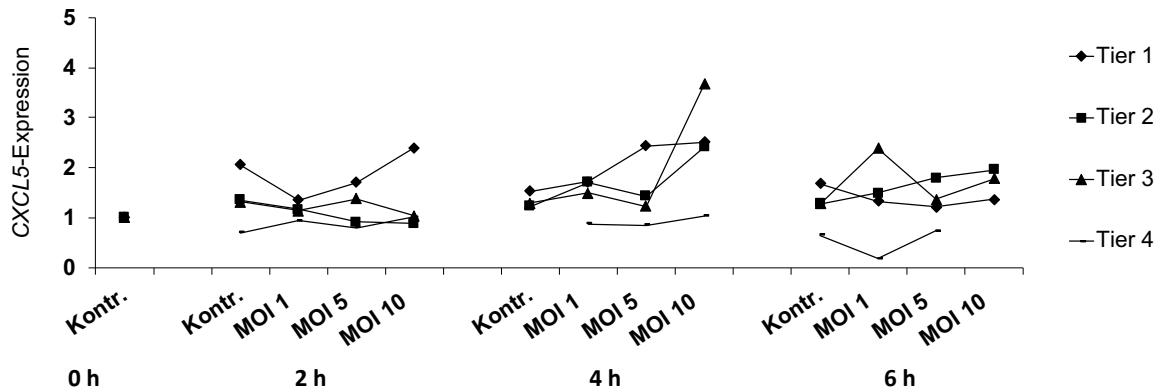


Abbildung 35: *CXCL5*-mRNA-Expression in bovinen endometrialen Epithelzellen nach Ko-Kultur mit *Pediococcus acidilactici*; kein Wert vorliegend für Tier 4 nach 4 Stunden in der Kontrollgruppe und nach 6 Stunden in der MOI 10. n = 4 Tiere.

6.11.2.2 *PTGS2*-mRNA-Expression

Nach Ko-Kultur mit *Pediococcus acidilactici* war die *PTGS2*-mRNA-Expression zu keinem Zeitpunkt signifikant verändert (siehe **Abb. 36**). Die *PTGS2*-mRNA-Expression war nach 2 Stunden bei Tier 2 in allen MOIs und bei Tier 1 in der MOI 10 höher als bei den anderen untersuchten Tieren.

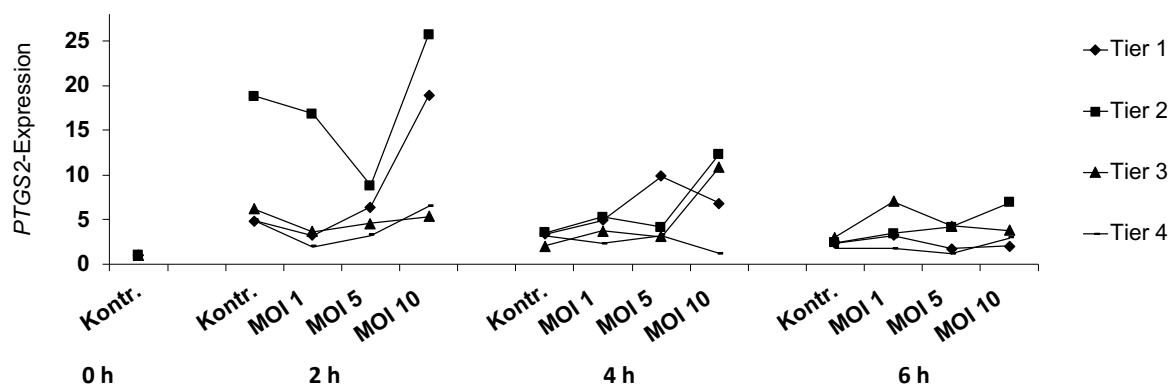


Abbildung 36: *PTGS2*-mRNA-Expression in bovinen endometrialen Epithelzellen nach Ko-Kultur mit *Pediococcus acidilactici*. n = 4 Tiere.

6.11.2.3 IL-mRNA-Expression

Die *IL6*-mRNA-Expression war nach Ko-Kultur mit *Pediococcus acidilactici* zu keinem Zeitpunkt signifikant verändert (siehe **Abb. 37 A**). Die *IL6*-mRNA-Expression war bei Tier 1 nach 2 und 4 Stunden höher als bei den übrigen Tieren.

Die *IL8*-mRNA-Expression war ebenfalls nicht signifikant verändert (siehe **Abb. 37 B**). Nach 4 Stunden war der Mittelwert der *IL8*-mRNA-Expression in der MOI 10 um das Dreifache erhöht ($P = 0,068$). Nach 6 Stunden war die *IL8*-mRNA-Expression bei Tier 1 in allen MOIs kontinuierlich höher als bei den übrigen Tieren.

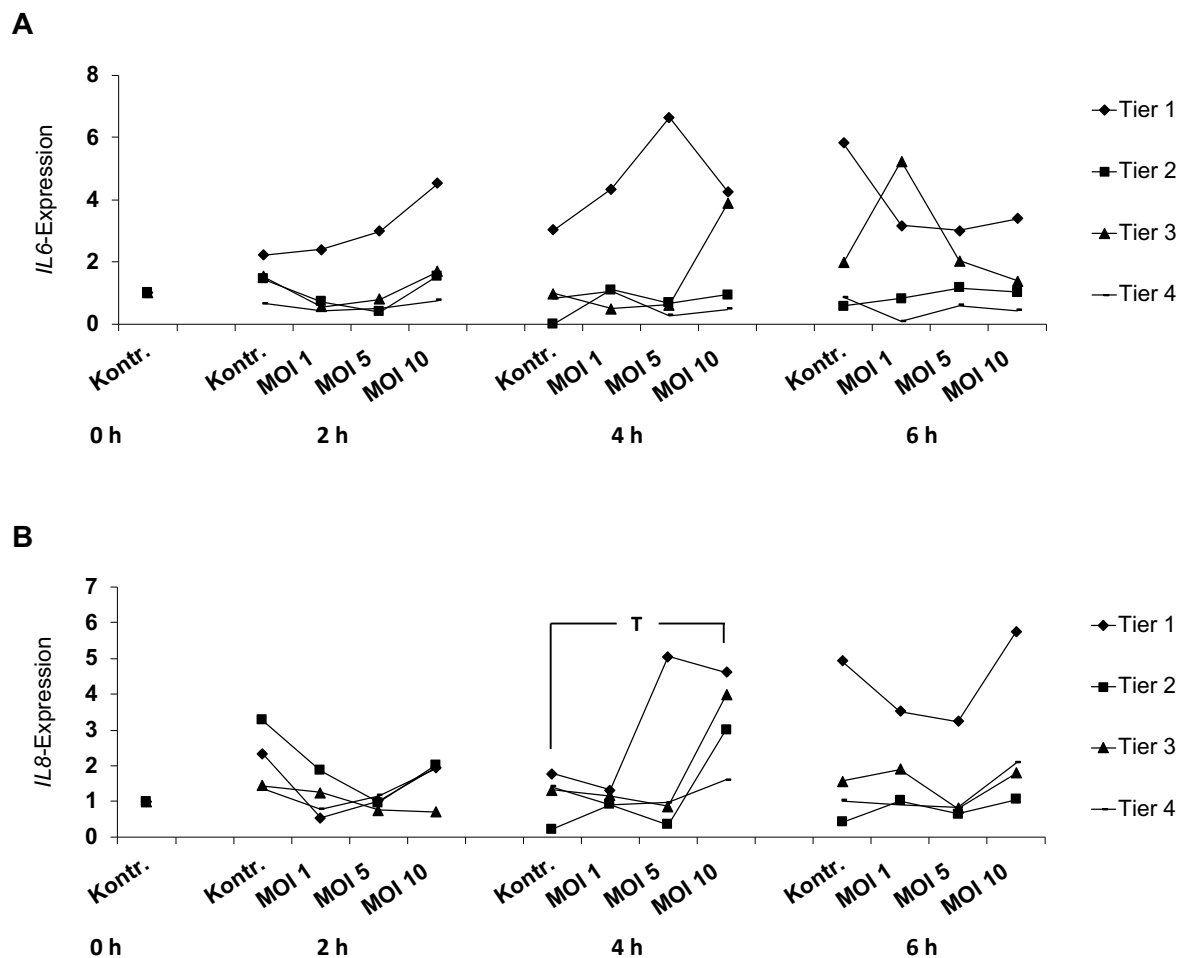


Abbildung 37: mRNA-Expression von **A)** *IL6* und **B)** *IL8* in bovinen endometrialen Epithelzellen nach Ko-Kultur mit *Pediococcus acidilactici*. n = 4 Tiere.

6.12 Untersuchung von *Pediococcus pentosaceus*

6.12.1 Zell-Viabilität von endometrialen Epithelzellen

Nach Ko-Kultur von Zellen mit *Pediococcus pentosaceus* waren nach 24 Stunden in allen MOIs keine Veränderungen der Zellen sichtbar. Nach 48 Stunden waren, außer bei Zellen eines Tieres, bei 3 Tieren ebenfalls keine morphologischen Veränderungen sichtbar (siehe **Abb. 38**). Bei Zellen eines Tieres waren im Gegensatz dazu deutliche Unterschiede zu den Kontrollzellen erkennbar. Das Cytoplasma der Zellen war in der MOI 1 und MOI 5 vergrößert; in der MOI 10 waren nahezu alle Zellen nicht mehr vital (siehe **Abb. 39**). Die gleichen Veränderungen wurden nach 72 Stunden beobachtet.

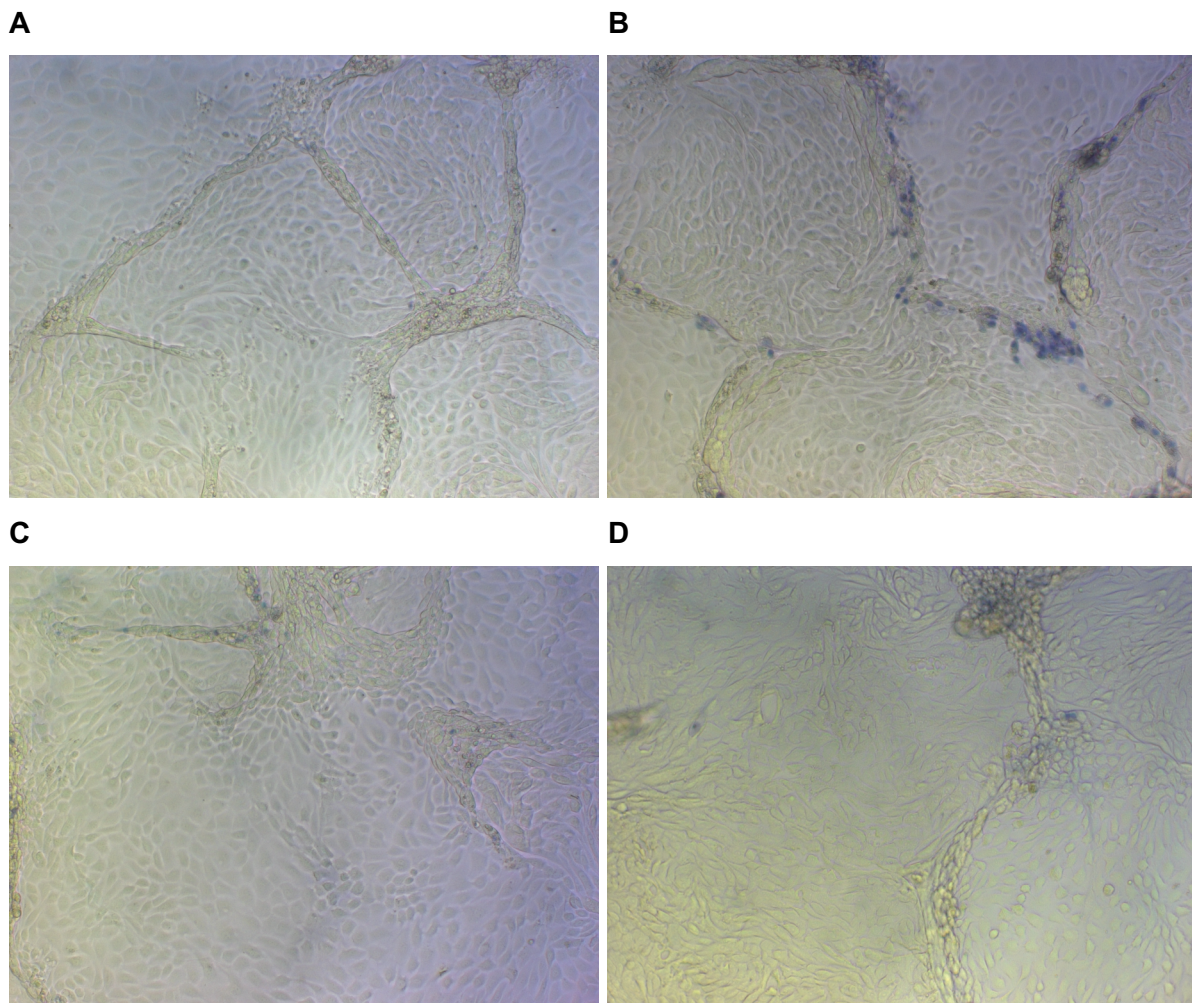


Abbildung 38: **A)** Kontrolle, 48h; **B)** MOI 1, 48h; **C)** MOI 5, 48h; **D)** MOI 10, 48h; Zell-Viabilität nach 48-stündiger Ko-Kultur von endometrialen Epithelzellen mit *Pediococcus pentosaceus*. 100-fache Vergrößerung. Exemplarische Aufnahmen von Zellen des gleichen Tieres.

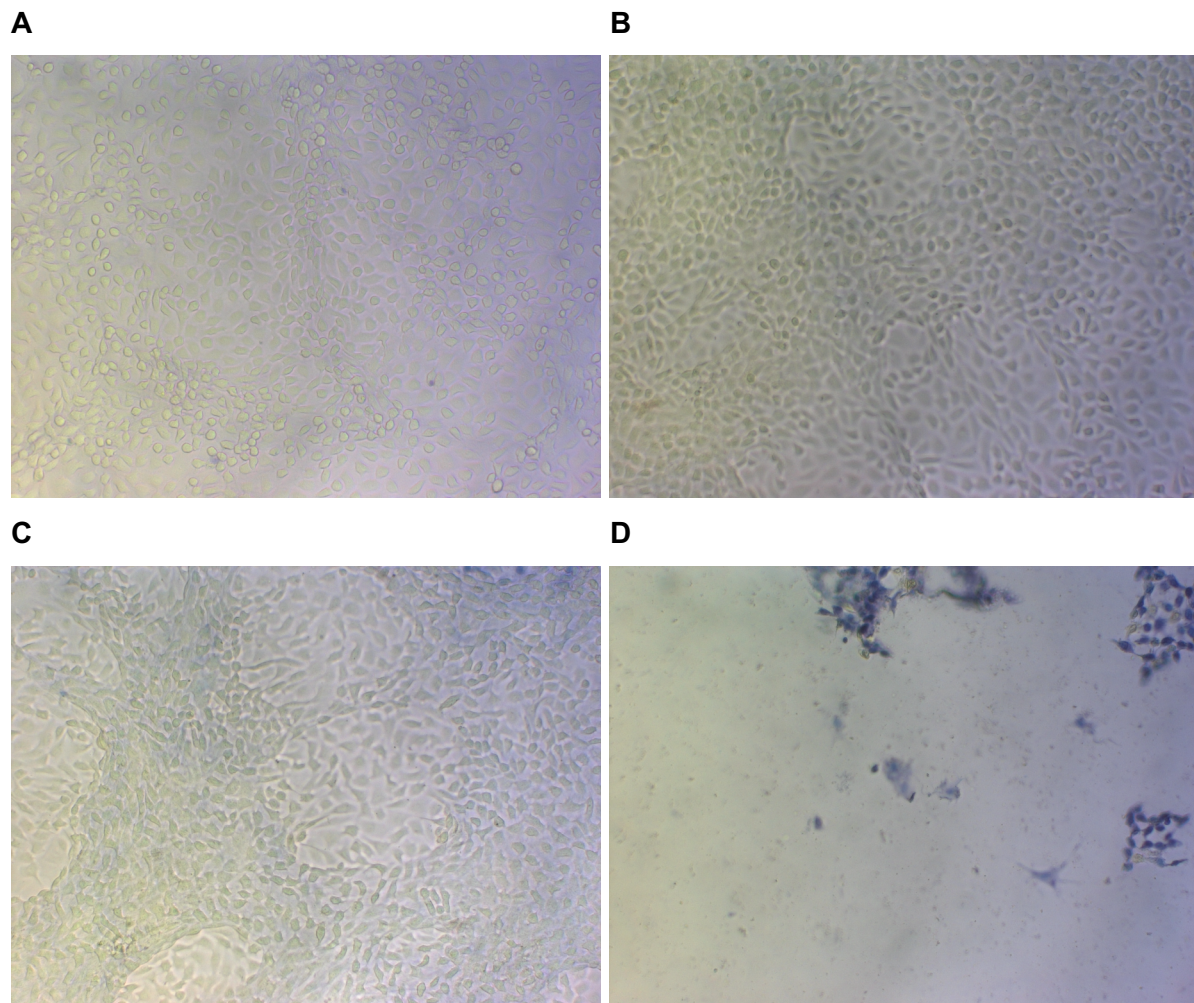


Abbildung 39: A) Kontrolle, 48h; **B)** MOI 1, 48h; **C)** MOI 5, 48h; **D)** MOI 10, 48h; Zell-Viabilität nach 48-stündiger Ko-Kultur von endometrialen Epithelzellen mit *Pediococcus pentosaceus*. 100-fache Vergrößerung. Exemplarische Aufnahmen von Zellen des gleichen Tieres.

6.12.2 mRNA-Expression endometrialer Epithelzellen

6.12.2.1 CXCL-mRNA-Expression

Die *CXCL1/2*- und *CXCL3*-mRNA-Expression war nach Ko-Kultur mit *Pedococcus pentosaceus* in allen MOIs und zu allen untersuchten Zeitpunkten nicht signifikant verändert (siehe **Abb. 40 A** und **B**). Der Mittelwert der *CXCL1/2*-mRNA-Expression war nach 2 Stunden in der MOI 10 nahezu zweifach erhöht ($P = 0,068$).

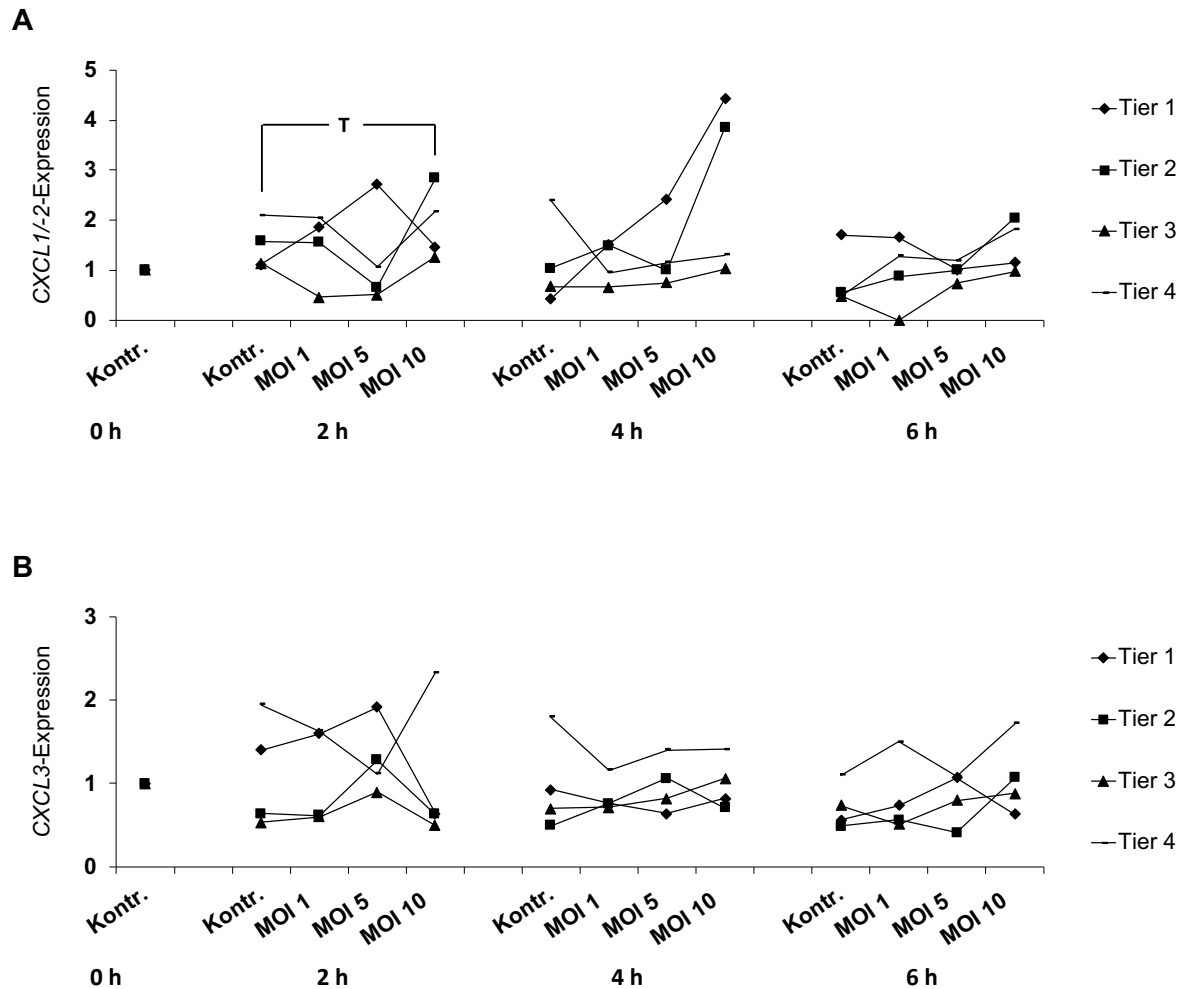


Abbildung 40: mRNA-Expression von **A) CXCL1/2** und **B) CXCL3** in bovinen endometrialen Epithelzellen nach Ko-Kultur mit *Pedococcus pentosaceus*. n = 4 Tiere.

Ebenfalls zu keinem untersuchten Zeitpunkt signifikant verändert war die *CXCL5*-mRNA-Expression (siehe **Abb. 41**). Der Kontrollwert der *CXCL5*-mRNA-Expression war nach 4 Stunden bei Tier 4 deutlich höher als bei den übrigen Tieren.

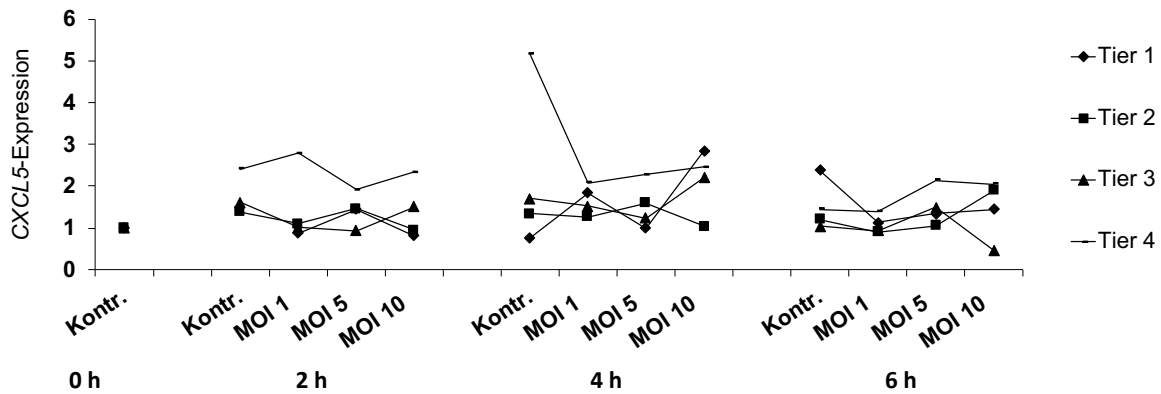


Abbildung 41: *CXCL5*-mRNA-Expression in bovinen endometrialen Epithelzellen nach Ko-Kultur mit *Pedococcus pentosaceus*. n = 4 Tiere.

6.12.2.2 *PTGS2*-mRNA-Expression

Die *PTGS2*-mRNA-Expression war nach Ko-Kultur mit *Pedococcus pentosaceus* zu allen Zeitpunkten nicht signifikant verändert (siehe **Abb. 42**). Die *PTGS2*-mRNA-Expression bei Tier 1 war nach 4 Stunden in der MOI 5 und MOI 10 höher als bei den übrigen Tieren.

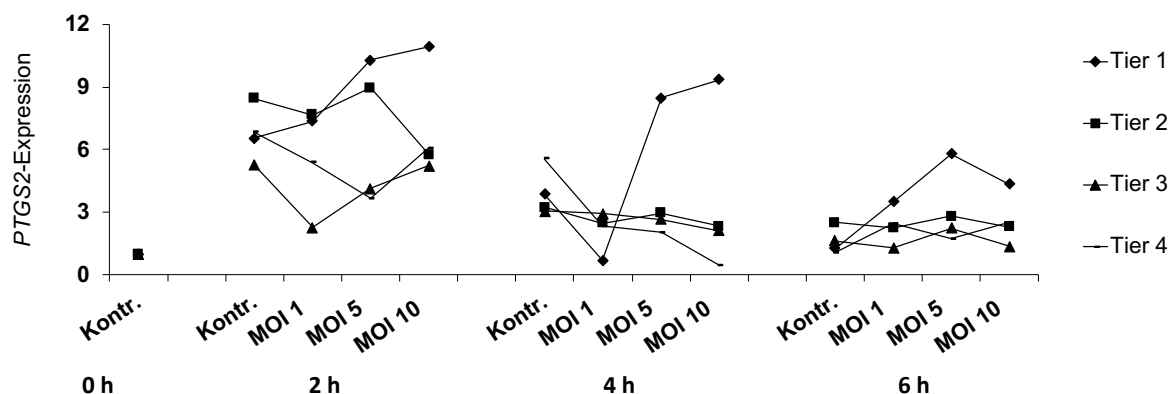


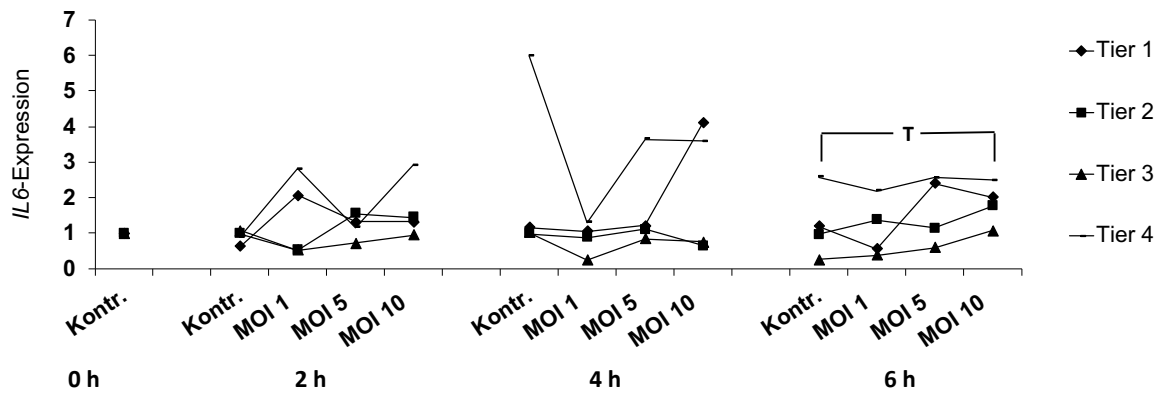
Abbildung 42: *PTGS2*-mRNA-Expression in bovinen endometrialen Epithelzellen nach Ko-Kultur mit *Pedococcus pentosaceus*. n = 4 Tiere.

6.12.2.3 IL-mRNA-Expression

Nach 2 und 4 Stunden der Ko-Kultur mit *Pediococcus pentosaceus* war die *IL6*-mRNA-Expression nicht signifikant verändert (siehe **Abb. 43 A**); nur der Kontrollwert von Tier 4 war nach 4 Stunden deutlich höher als die Kontrollwerte der anderen Tiere. Nach 6 Stunden hingegen war der Mittelwert der *IL6*-mRNA-Expression in der MOI 10 um das 1,5-fache erhöht ($P = 0,068$).

Ebenfalls zu keinem Zeitpunkt signifikant verändert war die *IL8*-mRNA-Expression (siehe **Abb. 43 B**). Die *IL8*-mRNA-Expression von Tier 1 war nach 2 und nach 6 Stunden in der MOI 5 und MOI 10 höher als bei den anderen Tieren.

A



B

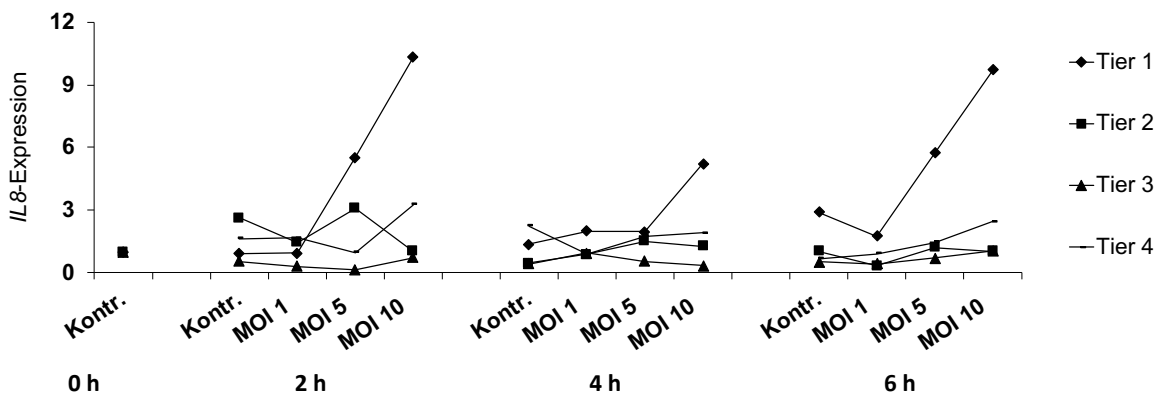


Abbildung 43: mRNA-Expression von **A) IL6** und **B) IL8** in bovinen endometrialen Epithelzellen nach Ko-Kultur mit *Pediococcus pentosaceus*. n = 4 Tiere.

6.13 Untersuchung von *Weissella hellenica*

6.13.1 Zell-Viabilität von endometrialer Epithelzellen

Nach 24- und 48-stündiger Ko-Kultur mit *Weissella hellenica* waren in allen drei MOIs, im Vergleich zu den Kontrollzellen, keine Veränderungen sichtbar (siehe **Abb. 44 B**). Nach 72 Stunden hingegen waren bei 2 von 4 Tieren in der MOI 5 und vor allem MOI 10 nahezu 100 % der Zellen nicht mehr vital. Die Konfluenz des Zellrasens war aufgelöst (siehe **Abb. 44 C und D**).

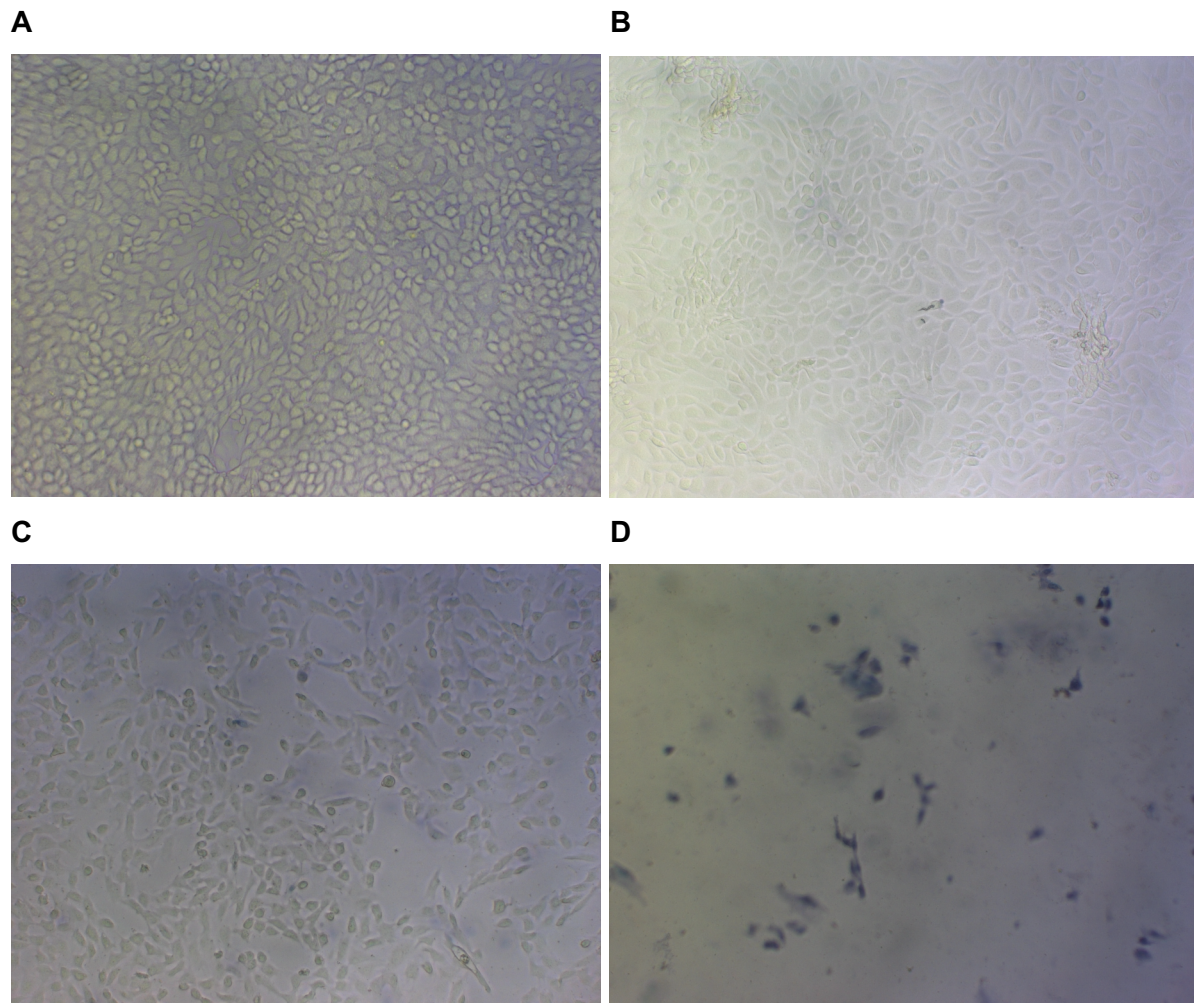


Abbildung 44: A) Kontrolle, 72h; B) MOI 10, 48h; C) MOI 5, 72h; D) MOI 10, 72h; Zell-Viabilität nach 24-stündiger Ko-Kultur von endometrialen Epithelzellen mit *Weissella hellenica*. 100-fache Vergrößerung. Exemplarische Aufnahmen des gleichen Tieres.

6.13.2 mRNA-Expression endometrialer Epithelzellen

6.13.2.1 CXCL-mRNA-Expression

Die *CXCL1/2*- und *CXCL3*-mRNA-Expression war nach Ko-Kultur mit *Weissella hellenica* zu keinem Zeitpunkt signifikant verändert (siehe **Abb. 45 A** und **B**). Nach zwei Stunden war die *CXCL1/2*-mRNA-Expression bei Tier 1 in der MOI 5 und MOI 10, bei Tier 4 nur in der MOI 10 höher als bei den übrigen Tieren. Nach 4 Stunden war die *CXCL1/2*-mRNA-Expression bei Tier 1 in der MOI 5 und in der MOI 10 deutlich erhöht.

Nach 2 Stunden war die *CXCL3*-mRNA-Expression bei Tier 4 in der MOI 10 höher als bei den übrigen Tieren.

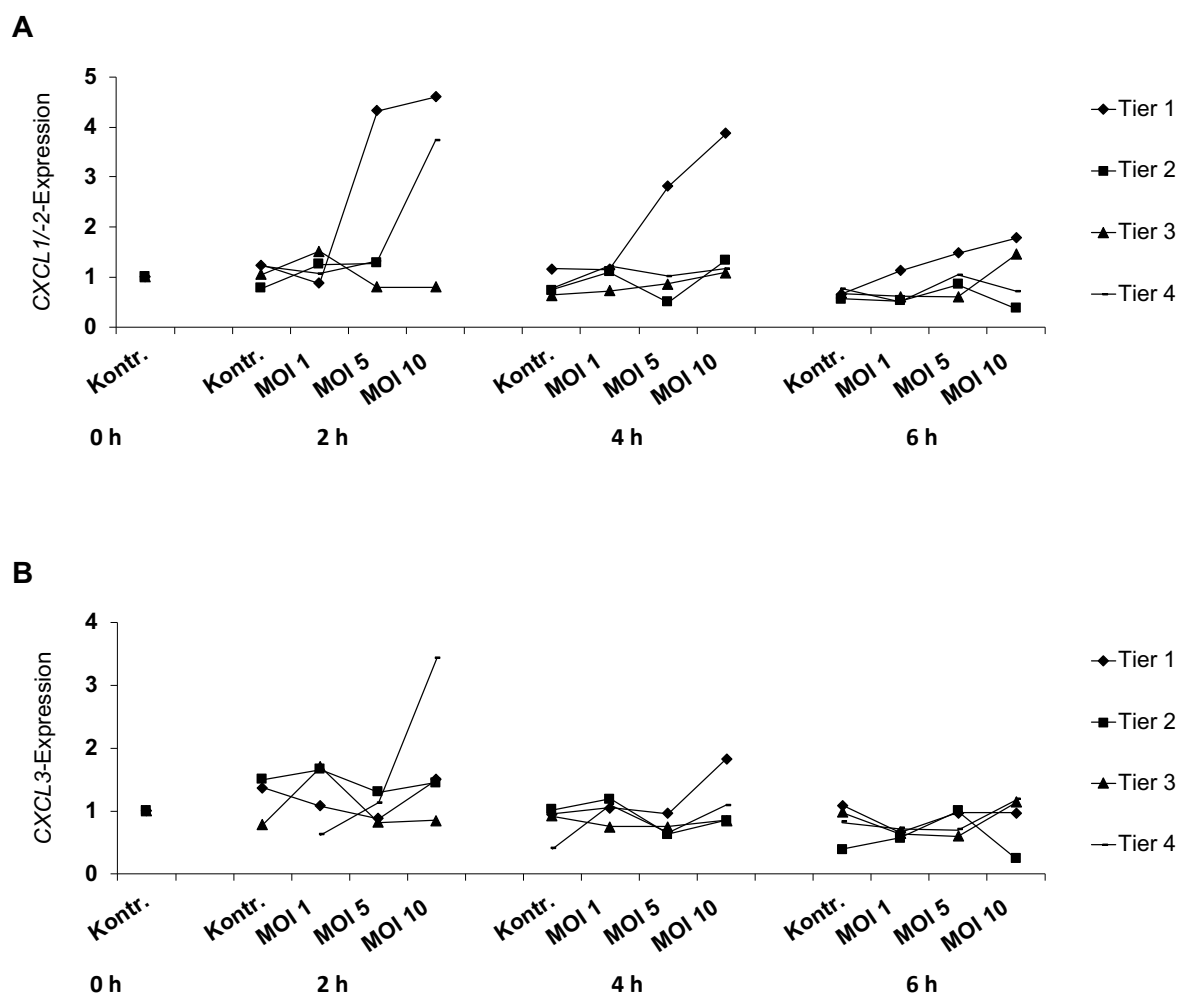


Abbildung 45: mRNA-Expression von **A)** *CXCL1/2*; kein Wert vorliegend für Tier 2 nach 2 Stunden in der MOI 10 und **B)** *CXCL3* in bovinen endometrialen Epithelzellen nach Ko-Kultur mit *Weissella hellenica*; bei B) kein Wert vorliegend für Tier 4 nach 2 Stunden in der Kontrollgruppe. n = 4 Tiere.

Die *CXCL5*-mRNA-Expression war auch zu allen untersuchten Zeitpunkten nicht signifikant verändert (siehe **Abb. 46**). Nach 2 Stunden war die *CXCL5*-mRNA-Expression von Tier 4 in der MOI 10 etwa doppelt so hoch wie die Expression der anderen Tiere.

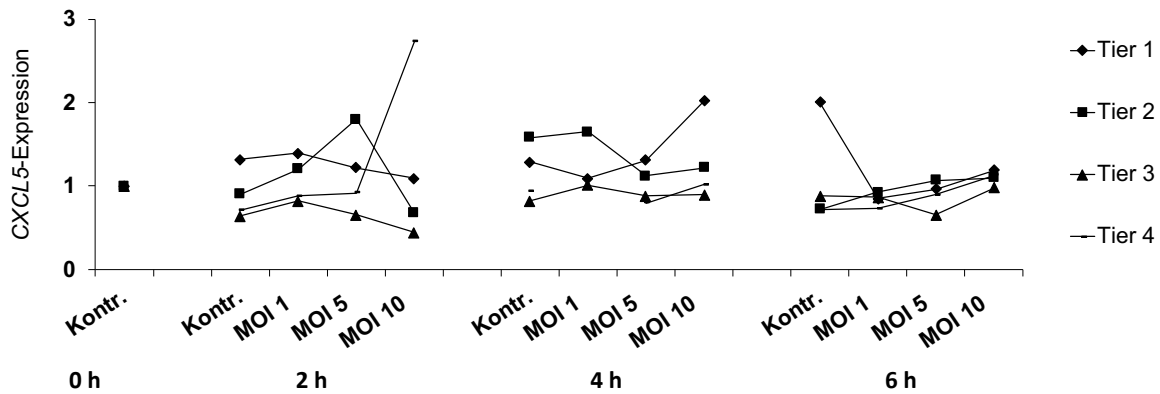


Abbildung 46: *CXCL5*-mRNA-Expression in bovinen endometrialen Epithelzellen nach Ko-Kultur mit *Weissella hellenica*; kein Wert vorliegend für Tier 4 nach 4 Stunden in der MOI 1. n = 4 Tiere.

6.13.2.2 *PTGS2*-mRNA-Expression

Nach Ko-Kultur mit *Weissella hellenica* war die *PTGS2*-mRNA-Expression zu allen Zeitpunkten nicht signifikant verändert (siehe **Abb. 47**). Bei Tier 1 war die *PTGS2*-mRNA-Expression in allen MOIs und zu allen Zeitpunkten höher als bei den übrigen Tieren.

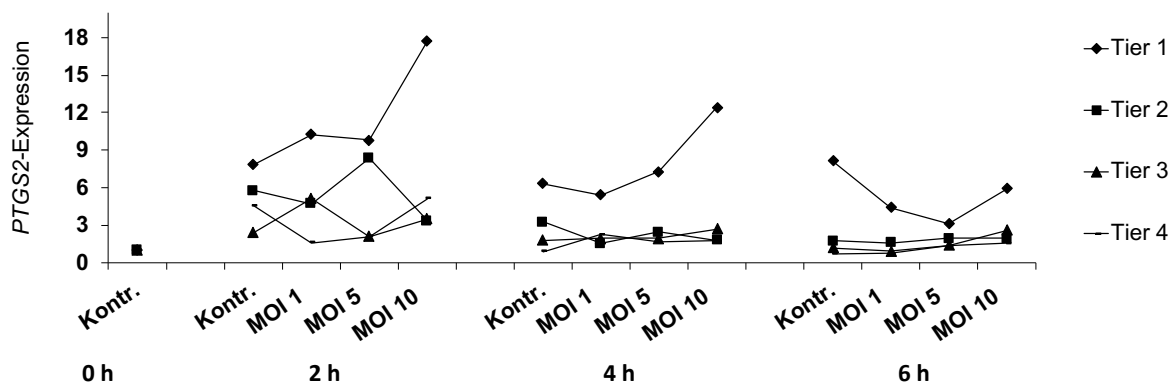


Abbildung 47: *PTGS2*-mRNA-Expression in bovinen endometrialen Epithelzellen nach Ko-Kultur mit *Weissella hellenica*. n = 4 Tiere.

6.13.2.3 IL-mRNA-Expression

Die *IL6*-mRNA-Expression war nach Ko-Kultur mit *Weissella hellenica* zu keinem der untersuchten Zeitpunkte signifikant verändert (siehe **Abb. 48 A**). Die *IL6*-mRNA-Expression war bei Tier 1 nach 4 Stunden in der MOI 10 um das Dreifache höher als bei den übrigen Tieren.

Ebenfalls zu keinem Zeitpunkt signifikant verändert war die *IL8*-mRNA-Expression, jedoch bei Tier 3 nach 4 und 6 Stunden kontinuierlich höher als bei den übrigen Tieren (siehe **Abb. 48 B**).

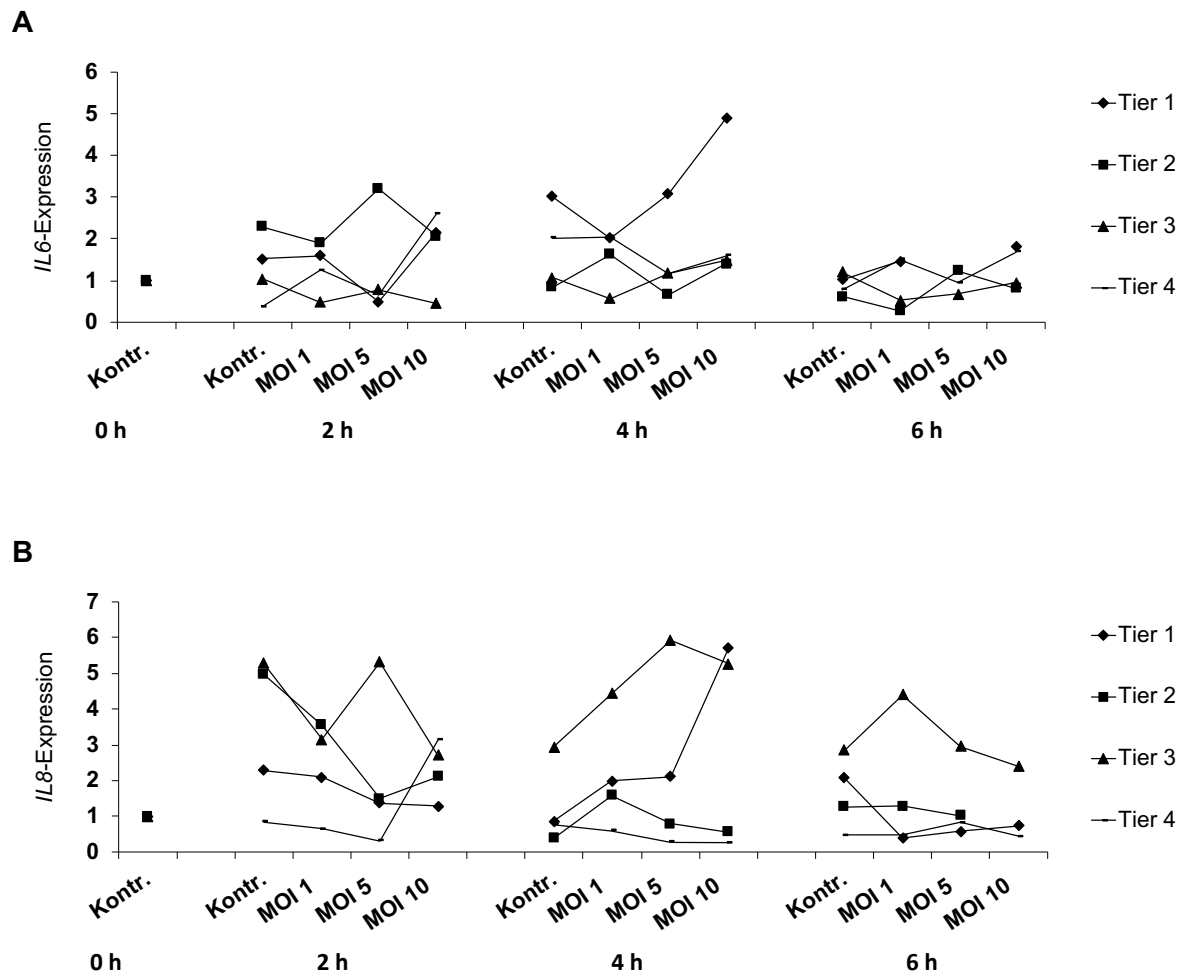


Abbildung 48: mRNA-Expression von **A) *IL6***; kein Wert vorliegend für Tier 1 nach 6 Stunden in der MOI 5 und **B) *IL8*** in bovinen endometrialen Epithelzellen nach Ko-Kultur mit *Weissella hellenica*; bei B) kein Wert vorliegend für Tier 2 nach 6 Stunden in der MOI 10. n = 4 Tiere.

6.14 Untersuchung von *L. buchneri*

6.14.1 Motilität boviner Spermien nach Ko- Kultur mit *L. buchneri*

Die Gesamtmotilität, die zirkuläre Motilität, die Geschwindigkeit und die progressive Motilität boviner Spermien veränderte sich nach Ko- Kultur mit *L. buchneri*, isoliert aus dem bovinen Uterus (Gärtner et al. 2015), zu beiden Zeitpunkten und in beiden bakteriellen Konzentrationen nicht signifikant. Die Mittelwerte der progressiven Motilität waren, verglichen mit der jeweiligen Kontrolle, unverändert (siehe **Abb. 49**).

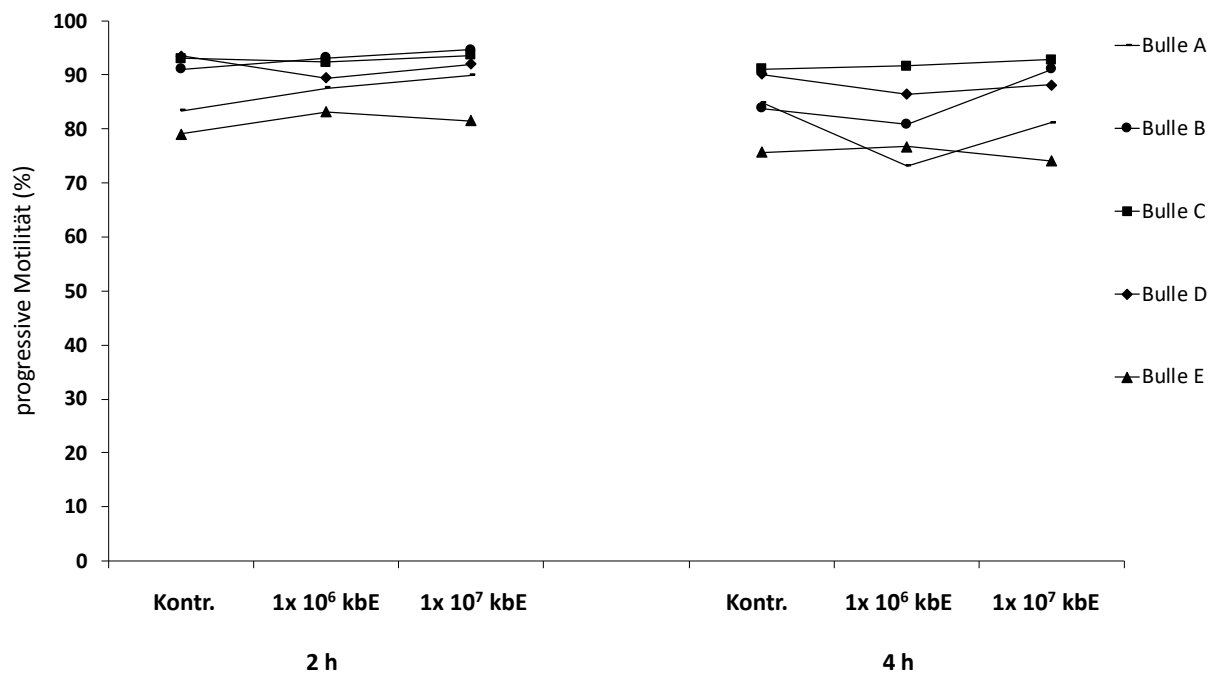


Abbildung 49: Progressive Motilität boviner Spermien nach Ko-Kultur mit *L. buchneri* in Triladyl. n = 5 Bullen.

6.15 Übersicht der Ergebnisse

In der nachfolgenden **Tabelle 12** werden die Ergebnisse über die untersuchten Bakterien zusammengefasst. Genaue Details sind den oben genannten Ergebnissen zu entnehmen.

Tabelle 12: Zusammenfassung der Ergebnisse

Untersuchtes Isolat	Isolationsort	Veränderungen der Zellviabilität nach Ko-Kultur	Veränderung der mRNA-Expression v. Epithelzellen	Veränderung der Motilität boviner Spermien
<i>Enterococcus faecalis</i>	Seminalplasma	Zelltod nach 24 h in allen MOIs	nicht untersucht	nicht untersucht
<i>Lactococcus garviae</i>	Präputialhöhle	Zelltod nach 72 h in allen MOIs	nicht untersucht	nicht untersucht
<i>Weissella thailandensis</i>	<i>Glans penis</i>	Zelltod nach 24 h in allen MOIs	nicht untersucht	nicht untersucht
<i>L. mucosae</i> 8.1	Seminalplasma	verringerte Konfluenz nach 72 h in allen MOIs	CXCL1/-2 ↑, CXCL5 ↑, IL6 ↑, IL8 ↑	nicht signifikant verändert
<i>L. mucosae</i> 8.2	Seminalplasma	nein	nicht signifikant verändert	progressive Motilität nach 2 und 4 h ↓
<i>L. mucosae</i> 31	Seminalplasma	nein	CXCL1/-2 ↑	progressive Motilität nach 2 h ↓
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Seminalplasma	nein	CXCL1/-2 ↑, CXCL5 ↑, PTGS2 ↑	nicht signifikant verändert
<i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>Glans penis</i>	Zelltod nach 72 h in der MOI 5 + 10	nicht signifikant verändert	nicht untersucht
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Präputialhöhle	Zelltod nach 48 h bei nur einem Tier	nicht signifikant verändert	nicht untersucht
<i>Weissella hellenica</i>	Präputialhöhle	Zelltod nach 72 h bei 50 % der Tiere	nicht signifikant verändert	nicht untersucht
<i>L. buchneri</i>	boviner Uterus	nein (Gärtner et al. 2015)	nicht signifikant verändert (Gärtner et al. 2015)	nicht signifikant verändert

7 Diskussion

7.1 Tiermaterial und Methodik

Für die mikrobiologischen Untersuchungen des männlichen Genitaltraktes wurden das Seminalplasma von Zuchtbullen und die Schleimhäute von Penis und Präputium bei Mastbullen untersucht.

Während dieser Untersuchungen wurden spezielle Selektivmedien für die Anzucht von Milchsäurebakterien verwendet. Somit wurden vorhandene Bakterien anderer Ordnungen nicht, oder nur unter suboptimalen Bedingungen, kultiviert. Mit molekularbiologischen Verfahren wäre es zwar möglich gewesen, Milchsäurebakterien mit einer höheren Sensitivität nachzuweisen, aber für diese Studie waren für weitere Versuche vitale und kultivierbare Bakterien obligat.

Obwohl die Anzucht der Bakterien unter den gleichen Bedingungen stattfand, können die mikrobiologischen Ergebnisse aus dem Seminalplasma der Zuchtbullen und den Schleimhäuten der Mastbullen aufgrund verschiedener Faktoren nicht direkt miteinander verglichen werden. Rasse, Alter und Nutzungsrichtung der beprobten Tiere sind bei den beiden Tiergruppen unterschiedlich. Die beprobten Mastbullen waren ca. 18 Monate alt und von unterschiedlichen Rassen. Die Zuchtbullen der Rasse Holstein-Friesian, deren Seminalplasma untersucht wurde, waren mindestens 2 Jahre alt. Die Zusammensetzung und das Volumen des Ejakulates variieren deutlich, abhängig vom Alter und anderen Faktoren (Vince et al. 2018). Klimatische Bedingungen und die Absamfrequenz haben Einfluss auf die Zusammensetzung des Ejakulates und damit möglicherweise auf die mikrobiologische Beschaffenheit (Murphy et al. 2018).

Zusätzlich ist der Genitaltrakt von Mastbullen häufig mit Fäkalien kontaminiert, sodass nicht ausgeschlossen werden kann, dass Bakterien aufgrund einer potentiellen Verschmutzung isoliert wurden. Mastbullen werden in konventioneller Tierhaltung auf Vollspaltenböden gehalten, sodass deren ventrales Abdomen beim Liegen mit Kot in Kontakt kommt. Beispielsweise gehören *Pedococcus spp.* und *L. mucosae* zur intestinalen Mikroflora (Rodriguez-Palacios et al. 2009, London et al. 2014) und könnten somit aufgrund der Verschmutzung eine Kontamination darstellen. Zuchtbullen hingegen werden unter anderen Bedingungen gehalten und weisen einen weitaus geringeren Verschmutzungsgrad auf.

In einer Untersuchung bezüglich solcher bakterieller Kontaminationen wurde unspezifisch die Gesamtanzahl an Mikroorganismen im bovinen Ejakulat untersucht (Sannat et al. 2015). Es wurden Unterschiede zwischen verschiedenen Rassen festgestellt. Beispielsweise wiesen Jersey-Bullen signifikant höhere bakterielle Belastungen auf als Bullen der Rasse Holstein-Friesian. Das Ejakulat von Tieren unter 4 und über 6 Jahren wies eine höhere Anzahl an kbE/ml auf als das Ejakulat von Tieren in einem Alter von 5 Jahren. Da nicht zwischen

pathogenen und apathogenen Bakterien unterschieden wurde, können diese Ergebnisse nicht auf das Vorkommen von Milchsäurebakterien und damit nicht auf die Ergebnisse dieser vorliegenden Studie bezogen werden, aber es kann dennoch davon ausgegangen werden, dass zumindest die unterschiedlichen Rassen zu verschiedenen Ergebnissen geführt haben. Eine weitere Studie hat die Anzahl an kbE/ml im Ejakulat von Büffeln ermittelt, nachdem die Präputialhöhle zuvor mit verschiedenen Lösungen gereinigt wurde. Hier stellte man fest, dass die bakterielle Kontamination des Ejakulates nach Spülung des Präputiums mit Kaliumpermanganat signifikant verringert war (Meena et al. 2015). Diese Untersuchung kann ein Hinweis dafür sein, dass isolierte Bakterien vornehmlich aus der Präputialhöhle stammen und eine Kontamination im Ejakulat darstellen. Das in der Präputialhöhle enthaltene Smegma kann als Nährsubstrat für bakterielles Wachstum dienen. Solch eine desinfizierende Reinigung des Genitaltraktes wird jedoch in Deutschland nicht routinemäßig durchgeführt, sodass das Ejakulat durch an den Schleimhäuten des Genitales haftende Bakterien kontaminiert werden könnte. Auch die in dieser Studie untersuchten Zuchtbullen wurden vor der Samengewinnung nicht gereinigt. Jedoch ist bislang völlig unbekannt, ob die vom Genitaltrakt des Bullen isolierten Spezies tatsächlich Kontaminationen darstellen, oder ob sie in der Lage sind, sich an den Schleimhäuten anzusiedeln und sogar Biofilme zu bilden. Ein Hinweis dafür könnte sein, dass in humanem Ejakulat bei bis zu 25 % der Probanden *Lactobacillus spp.* identifiziert werden konnten (Mandar et al. 2017). Somit ist denkbar, dass Milchsäurebakterien auch im männlichen Genitaltrakt Schleimhäute besiedeln und potentiell Schutz vor Pathogenen bieten. Die während dieser Studie entnommenen Probenmaterialien wurden mit leichten Modifikationen, wie bereits beschrieben, in Selektivmedien für die Kultivierung von Milchsäurebakterien inkubiert (Gärtner et al. 2015). Das Probenmaterial wurde, sowohl aerob als auch anaerob, in MRS-Bouillon/-Agar, LB-Bouillon, Rogosa-Agar und Rogosa SL-Agar inkubiert. Um das Volumen des untersuchten Seminalplasmas zu erhöhen, wurden die Proben mit sterilem PBS verdünnt. Hierdurch wurde möglicherweise der pH-Wert des Seminalplasmas verändert. Dies könnte unter anderem eine Ursache für die geringere Anzahl an isolierten Milchsäurebakterien aus dem Seminalplasma sein, verglichen mit den Schleimhäuten der Mastbullen.

Neben der Zusammensetzung der verschiedenen Nährmedien und Agar-Platten unterschieden sich diese in ihrem pH-Wert. Der pH-Wert von MRS beträgt 6,2, während er bei Rogosa und Rogosa SL 5,5 beträgt. Der pH-Wert von LB-Medium beträgt 7,0. Gärtner et al. (2015) konnten die meisten Isolate aus dem bovinen Uterus auf dem auch in dieser Untersuchung genutzten Rogosa SL-Agar kultivieren, während in dieser vorliegenden Studie die meisten Milchsäurebakterien in MRS-Agar/-Bouillon kultivierbar waren. Dieser Unterschied könnte im unterschiedlichen pH-Wert zwischen bovinem Uterus und männlichem Genitaltrakt begründet sein. Der pH-Wert des bovinen Ejakulates beträgt 7,2 bis 7,4 (Shum et al. 2011).

Der pH-Wert des bovinen Uterus wird hingegen mit 6,96 angegeben (Hugentobler et al. 2004). Somit weist der pH-Wert des MRS-Bouillons eine höhere Ähnlichkeit zum physiologischen pH-Wert der bovinen Ejakulates auf.

Weiterhin unterscheidet sich die Zusammensetzung der Saccharide in den genutzten Medien und Agar-Platten. MRS und Rogosa beinhalten nur Glucose (20 g/l), während Rogosa SL Dextrose (10 g/l), Arabinose (5 g/l) und Saccharose (5 g/l) beinhaltet. Im LB-Medium sind hingegen neben Trypton und Hefeextrakt keine Saccharide enthalten. Milchsäurebakterien sind obligat auf die Fermentation von Sacchariden, bevorzugt auf Glucose, angewiesen (Zhang & Vadlani 2015). Somit ist ersichtlich, dass LB-Medium kein optimales Nährsubstrat darstellt, während die anderen genutzten Selektivmedien ausreichend Saccharide enthalten. Im Fokus stehende Milchsäurebakterien hätten potentiell in größerer Anzahl identifiziert werden können, wenn entnommene Proben zuvor in unspezifischen Nährmedien angereichert worden wären. Allerdings besteht damit das Risiko, vermehrt pathogene Spezies zu kultivieren, sodass hier auf eine Voranreicherung verzichtet wurde.

Herangewachsene Kolonien wurden je dreimal vereinzelt, um sicherzustellen, nur Einzelkolonien zu isolieren. Eine Kontamination anderer Bakterien konnte so weitestgehend minimiert werden. Die isolierte DNA wurde via 16S-rDNA-Primern vervielfältigt, anschließend sequenziert und mit der Gen-Datenbank abgeglichen. Dies stellt eine zuverlässige und etablierte Methode für die Identifizierung von Milchsäurebakterien dar (Weisburg et al. 1991). Isolate, die zuvor auf diese Weise als *L. mucosae* identifiziert wurden, zeigten jedoch unterschiedliche Koloniemorphologien und wurden deshalb mit einem weiterem *Lactobacillus*-spezifischem Primer vervielfältigt (Dubernet et al. 2002). So stellte sich heraus, dass ein Isolat, welches zuvor als *L. mucosae* 8 identifiziert wurde, durch die weiterführende Untersuchung als *Enterococcus faecalis* identifiziert wurde. *L. mucosae* 8.1 und *L. mucosae* 8.2 konnten durch diese zusätzliche Untersuchung durch eine zu 100 % miteinander übereinstimmende Basensequenz als vermutlich identisch identifiziert werden.

Darüber hinaus ist bei mikrobiologischen Untersuchungen zu bedenken, dass generell davon ausgegangen wird, nur etwa 1 % aller bakteriellen Spezies kultivieren zu können (Kaeberlein et al. 2002).

Als weitere Materialien tierischen Ursprungs dienten bovine Uteri. Für diese Ko-Kultur-Versuche von Milchsäurebakterien mit endometrialen Epithelzellen wurden Schlachtrinder unmittelbar nach dem Entbluten herangezogen und nach erfolgreicher Kultivierung für Experimente verwendet, wie bereits zuvor beschrieben wurde (Gärtner et al. 2015).

Durch die damit verbundene große Anzahl an endometrialen Epithelzellen unterschiedlicher Tiere konnten in dieser Studie individuelle Reaktionsmuster zwischen den verschiedenen Tieren beobachtet werden. Bei der Nutzung von Zelllinien würden solch individuelle Reaktionen auf die Bakterien nicht deutlich werden.

7.2 Milchsäurebakterien im Genitaltrakt

7.2.1 Milchsäurebakterien im männlichen Genitaltrakt

Seit Längerem nutzt man Milchsäurebakterien als Probiotika und als Arzneimittel gegen pathogene Erreger in der Human- und Tiermedizin (Adetoye et al. 2018, Aristimuno Fico seco et al. 2018). Die antibakteriellen Stoffwechselprodukte dieser Bakterien sind zum Beispiel Wasserstoffperoxid, Essigsäure, Milchsäure und weitere Moleküle mit bakteriziden Wirkungen (Atassi et al. 2006). *L. amylovorus* und *L. salivarius* wurden in einer Untersuchung bereits aus dem Gastrointestinaltrakt des Rindes isoliert und zeigten *in vitro* eine bakterizide Wirkung gegen *Salmonella spp.*, indem sie deren Wachstum nach Ko-Inkubation signifikant hemmten (Adetoye et al. 2018). Die in dieser vorliegenden Studie untersuchten Milchsäurebakterien wurden allerdings bislang nicht auf deren potentiell bakterizide Wirkung untersucht.

Die zur Konservierung von Sperma-Pailletten üblicherweise eingesetzte Wirkstoffkombination führt in der Regel zu einer Elimination vorhandener Bakterien. Mehrere Studien deuten trotz dieser Maßnahme auf bakterielle Kontaminationen von Sperma-Pailletten hin. *Stenotrophomonas maltophilia* wurde mehrmals in über bereits mehrere Jahre kryokonservierten Sperma-Pailletten identifiziert und führte *in vitro* zu einer verringerten Fertilisationsrate (Bielanski et al. 2003). Auch *Pseudomonas spp.*, welche resistent gegen die eingesetzten Wirkstoffe Lincomycin und Spectinomycin waren, wurden aus kryokonservierten Pailletten isoliert (Kilburn et al. 2013).

Im Fokus der Wissenschaft standen bislang meist pathogene Bakterien aus dem bovinen männlichen Genitaltrakt, welche venerische Erkrankungen hervorrufen. Zu diesen venerisch übertragbaren Pathogenen gehören unter anderem *Brucella abortus*, *Campylobacter fetus* und *Listeria monocytogenes* (Heinemann et al. 2000, Nardi Junior et al. 2017, Haapala et al. 2018).

Im Gegensatz dazu existieren keine Veröffentlichungen über simultane Effekte ähnlicher bakterieller Spezies aus dem Genitaltrakt des Bullen. Im Seminalplasma der Zuchtbullen konnten neben *Enterococcus spp.* und *Streptococcus spp.* nur bei 3 Tieren weitere Familien der Ordnung *Lactobacillales* isoliert werden. Das Seminalplasma der Bullen stammte größtenteils von Tieren, deren Ejakulat aufgrund ihres jungen Alters noch nicht kommerziell vermarktet wurde. *L. mucosae* beispielsweise wurde bislang nicht aus dem bovinen männlichen Genitaltrakt isoliert, kommt aber im Gastrointestinaltrakt des Rindes vor (London et al. 2014). *Leuconostoc mesenteroides* wurde ebenfalls bislang nicht im Zusammenhang mit bovinem Seminalplasma beschrieben.

Von den Schleimhäuten aller beprobten Mastbullen konnten größtenteils *Pediococcus spp.* isoliert werden. *Pediococcus spp.* gehören zum vaginalen Mikrobiom des Rindes (Wang et al. 2013), wurden aber noch nicht vom Genitaltrakt des Bullen isoliert. *Pediococcus pentosaceus* wurde auch aus dem bovinen Uterus isoliert (Gärtner et al. 2015). Dass Milchsäurebakterien

von den Schleimhäuten aller Mastbullen isoliert wurden, könnte ein Hinweis dafür sein, dass dort, ähnlich wie im weiblichen Genitaltrakt, ein protektiver Biofilm existiert.

Beim Eber konnten in einer kürzlich veröffentlichten Studie bereits *Lactobacillus spp.* in größerer Anzahl im Seminalplasma nachgewiesen werden. In 27 % der untersuchten Seminalplasmaproben von Zuchtebern konnten Milchsäurebakterien nachgewiesen werden. Die Isolate *L. animalis*, *L. reuteri* und *Weissella minor* wurden weiterführend untersucht. Zwar wurde nicht deren Einfluss auf endometriale Epithelzellen untersucht, aber auf die Vitalität von porcinen Spermien. Dabei wurde festgestellt, dass die progressive Motilität der Spermien in Anwesenheit verschiedener *Lactobacillus spp.* nach mehrtägiger Ko-Kultur abnimmt (Schulze et al. 2018). Eine mögliche Erklärung könnte deren Produktion von Laktat sein, wodurch das Milieu deutlich verändert wird, während Spermien sensibel auf eventuelle Veränderungen des pH-Wertes reagieren. Vor allem das Isolat *L. buchneri*, isoliert aus dem bovinen Uterus, führte zu einer signifikanten Verringerung des pH-Wertes. Die anderen untersuchten *Lactobacillus spp.* führten lediglich zu einer geringfügigen Veränderung des pH-Wertes. Die genaue Ursache für die pH-Wertverringerung ist nicht bekannt. Endometriale Epithelzellen sind potentiell resistenter gegenüber einer leichten Ansäuerung des uterinen Milieus, da der uterine pH-Wert physiologisch geringer ist als der pH-Wert des Seminalplasmas (Hugentobler et al. 2004, Shum et al. 2011). Außerdem wurden in dieser Untersuchung Spermien über mehrere Tage inkubiert, wie es beim Schwein bei der Lagerung von Sperma zur künstlichen Besamung üblich ist. Beim Rind hingegen werden Spermien direkt nach der Samengewinnung kryokonserviert, sodass solch eine lange Inkubation mit den Bakterien nicht von praktischer Relevanz ist. Die Messung des pH-Wertes wurde in dieser vorliegenden Untersuchung nicht durchgeführt. Schulze et al. (2018) untersuchten die bakteriellen Isolate zusätzlich auf die Produktion von Ethanol, konnten dies aber bei keinem der Isolate feststellen.

Im Gegensatz zur Veterinärmedizin existieren einige humanmedizinische Studien über das Mikrobiom im Genitaltrakt des Mannes. In einer solchen humanmedizinischen Untersuchung konnte festgestellt werden, dass im Ejakulat gesunder Probanden mehr *Lactobacillus spp.* isoliert werden können als bei Patienten, die an einer Prostatitis leiden (Mandar et al. 2017). Die Gattung *Lactobacillus* wurde bei 25,2 % der gesunden Probanden identifiziert, während sie bei erkrankten Probanden nur bei 19 % identifiziert wurde. Es wurden nur die Spezies *L. iners* und *L. crispatus* identifiziert. Da pathogene Erreger meist retrograd die Prostata infizieren, könnte diese Studie darauf hinweisen, dass am Genitaltrakt adhärierende Milchsäurebakterien einen Schutz vor Pathogenen bieten können. Zusätzlich wurde bei an Prostatitis leidenden Patienten eine höhere bakterielle Diversität festgestellt. Dies unterstützt die Hypothese, dass *Lactobacillus spp.*, in großer Menge existierend, auch im männlichen Genitaltrakt protektiv wirken.

Eine andere humanmedizinische Studie befasste sich mit der Relation zwischen der Vitalität von Spermien und potentiell im Ejakulat vorliegenden Bakterien (Weng et al. 2014). Die am häufigsten isolierte Gattung in dieser Untersuchung war ebenfalls *Lactobacillus*. *Lactobacillus spp.* wurden auch hier bei 19 % der Probanden identifiziert, darunter *L. crispatus*, *L. acidophilus* und *L. gallinarum*. Probanden mit hohem Anteil befruchtungsfähiger Spermien wiesen mehr Milchsäurebakterien im Ejakulat auf als Probanden mit mangelhafter Spermienqualität. Allerdings konnte eine andere aktuelle Untersuchung keinen Zusammenhang zwischen den vorkommenden Bakterien im humanen Ejakulat und pathologisch veränderten Spermienparametern zeigen (Baud et al. 2019).

In dieser vorliegenden Studie über den bovinen Genitaltrakt konnte nun gezeigt werden, dass sowohl im Seminalplasma als auch auf Schleimhäuten des Genitales des Bullen Milchsäurebakterien existieren. Einige dieser Milchsäurebakterien führten bezüglich der Viabilität von endometrialen Epithelzellen nicht zu Veränderungen. Andere Isolate führten vor allem in hohen MOIs und nach längerer Inkubationszeit zu einer verringerten Zell-Viabilität und zu Veränderungen bezüglich der Konfluenz. Besonders zu erwähnen sind *Pediococcus pentosaceus* und *Weissella hellenica*. Bei diesen beiden Isolaten waren individuelle Reaktionen der endometrialen Epithelzellen verschiedener Rinder sichtbar. Bei Zellen mancher Tiere kam es zu einem hochgradigen Zelltod, während es bei anderen Tieren nicht zu Veränderungen der Zell-Viabilität kam.

Auch die mRNA-Expression pro-inflammatorischer Faktoren war bei einigen untersuchten Isolaten unverändert, beziehungsweise nur geringfügig erhöht. Meist kam es lediglich zu Veränderungen einzelner Faktoren in hohen MOIs. Signifikante Erhöhungen mehrerer pro-inflammatorischer Faktoren zu unterschiedlichen Zeitpunkten und MOIs waren nur bei dem Isolat *L. mucosae 8.1* detektierbar.

Die genaue Herkunft der aus dem Seminalplasma isolierten Bakterien lässt sich durch diese Untersuchung nicht abschließend klären, da die vom Penis und Präputium isolierten Spezies nicht identisch mit denen aus dem Seminalplasma waren. Beim Menschen können laut verschiedener Studien bei etwa 20 % der Probanden *Lactobacillus spp.* aus dem Ejakulat isoliert werden (Weng et al. 2014, Mandar et al. 2017). In dieser Untersuchung konnten hingegen nur bei 10 % der untersuchten Zuchtbullen Milchsäurebakterien aus dem Seminalplasma isoliert werden, wohingegen bei allen untersuchten Mastbullen Milchsäurebakterien von den Schleimhäuten des Genitaltraktes identifiziert werden konnten.

7.2.2 Milchsäurebakterien im weiblichen Genitaltrakt

Im weiblichen Genitaltrakt sind Milchsäurebakterien inzwischen detailliert untersucht und erste Studien über deren therapeutisches Potenzial existieren bereits. Die Anzahl der

Untersuchungen hierüber ist deutlich größer, weshalb hier nur einige Beispiele erwähnt werden können.

Mithilfe von Cytobrush-Proben wurden die Isolate *L. buchneri*, *L. ruminis*, *L. plantarum*, *L. amylovorus*, *L. similis*, *Weissella paramesenteroides* und *Pediococcus pentosaceus* aus gesunden Uteri von Milchkühen isoliert (Gärtner et al. 2015).

Eine *in vitro* eingesetzte Kombination aus *Lactobacillus spp.* und *Pediococcus acidilactici* verringerte inflammatorische Prozesse endometrialer Epithelzellen signifikant, die zuvor mit *E. coli* infiziert wurden (Genis et al. 2017). Gärtner et al. (2015) konnten bei der Untersuchung von *L. buchneri* keine Erhöhung der mRNA-Expression pro-inflammatorischer Faktoren feststellen.

In vivo konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass die Anwesenheit von *Lactobacillus spp.* im bovinen Uterus zu einer positiven Stimulation des angeborenen Immunsystems führt, indem die intrauterine Applikation der Bakterien zu einer Infiltration des Endometriums mit mononukleären Zellen führte (Kummer et al. 1997). Kürzlich wurde festgestellt, dass die intravaginale Applikation von Milchsäurebakterien um den Kalbezeitpunkt die Prävalenz von Metritiden senkt (Genis et al. 2018). Ähnliche Effekte konnten zuvor nach ebenfalls intravaginaler Instillation von *L. sakei* und *Pediococcus acidilactici* von Deng et al. (2014) gezeigt werden. Die nur einmalige intrauterine Applikation von *L. buchneri* im späten Puerperium führte sogar zu einer signifikanten Verkürzung der Gützeit bei Tieren, die an einer subklinischen Endometritis erkrankt waren (Peter et al. 2018).

Die genannten Beispiele des positiven Effekts solcher Milchsäurebakterien in Bezug auf uterine Erkrankungen machen deren Potential deutlich. Einige der im weiblichen Genitaltrakt genannten Spezies, wie beispielsweise *Pediococcus acidilactici*, wurden auch in dieser Studie aus dem männlichen Genitaltrakt isoliert und untersucht.

7.3 Zellkulturmodelle

Die Kultur boviner endometrialer Epithelzellen ist seit vielen Jahren möglich und wurde immer weiter entwickelt (Figge 1960, Fortier et al. 1988, Gärtner et al. 2015).

Auch in dieser Studie wurden für die Untersuchung verschiedener Milchsäurebakterien Primärkulturen von Schlachtrindern angelegt. Dadurch konnten individuelle Unterschiede bezüglich der Reaktion auf vorhandene Bakterien untersucht werden. Bei der Ko-Kultur von *Weissella hellenica* mit endometrialen Epithelzellen verschiedener Rinder war die Zell-Viabilität eines Tieres unverändert, während die Zellen aller anderen untersuchten Rinder spätestens nach 72 Stunden nicht mehr vital waren. Diese Ergebnisse deuten auf individuelle Reaktionsmuster auf potentielle Pathogene hin, die immer noch nicht im Detail untersucht sind (Sheldon et al. 2019).

In Bezug auf die mRNA-Expression pro-inflammatorischer Faktoren konnten teils deutliche Unterschiede zwischen den endometrialen Epithelzellen verschiedener Tiere gezeigt werden. Endometriales Epithelzellgewebe unterliegt hormonell bedingten zyklischen Schwankungen und zeigt dadurch zyklusabhängig unterschiedliche Entzündungsmuster (Borges et al. 2012). Saut et al. (2014) konnten jedoch *in vitro* keine Veränderungen bezüglich eines Entzündungsgeschehens bei Anwesenheit von Steroidhormonen erkennen. In dieser Untersuchung war beispielsweise die *IL6*-mRNA-Expression endometrialer Epithelzellen nach Ko-Kultur mit *Leuconostoc mesenteroides* bei einem Tier deutlich höher exprimiert als bei den übrigen untersuchten Tieren. Die Ursache für solche teils unterschiedlichen inflammatorischen Reaktionen *in vitro* sind bislang ebenfalls ungeklärt. Diskutiert werden tier-individuelle Mechanismen der Resistenz beziehungsweise Toleranz von Zellen gegenüber bakteriellen Oberflächen. Möglicherweise sind nicht alle endometrialen Epithelzellen jedes Individuums in der Lage, anwesende Bakterien zu erkennen und damit eine inflammatorische Reaktion zu induzieren.

Die Zellkultur bietet, im Gegensatz zu Gewebe-Explants die Möglichkeit, die Reaktion einzelner Zelltypen, wie hier ausschließlich der endometrialen Epithelzellen, zu untersuchen (Miller et al. 2007). Jedoch wurde in einer Untersuchung gezeigt, dass die Zerkleinerung eines Zellgewebes zur Kultivierung bestimmter Zellen dessen immunologische Prozesse verändert und somit keine reelle immunologische Reaktion widerspiegelt. Es wurden intakte endometriale Gewebe und Zellen aus zerkleinertem Endometrium mit den gleichen Bakterien infiziert. Hierbei wurde festgestellt, dass das intakte Endometrium die pro-inflammatorischen Faktoren *IL1B*, *IL6* und *IL8* in geringerer Menge synthetisiert als das zuvor zerkleinerte Endometrium (Borges et al. 2012). Auch Sheldon et al. (2010) stellten dar, dass die endometriale Epithelzellkultur *in-vivo*-Untersuchungen nicht ersetzen kann, da das Endometrium, anders als viele andere Gewebetypen, sehr stark durch hormonelle Veränderungen während des Sexualzyklus beeinflusst wird. Fischer et al. (2010) stellten ebenfalls *in vivo* eine Erhöhung der *CXCL5*- und *IL8*-mRNA-Expression während der Ovulation fest, verglichen mit der Lutealphase. *In vitro* konnte man bei Anwesenheit von LPS eine stärkere Erhöhung der *IL6*- und *IL8*-Synthese endometrialer Epithelzellen in der prä-ovulatorischen Phase feststellen als in anderen Phasen des Sexualzyklus (Borges et al. 2012). Bei der endometrialen Monokultur wird nicht berücksichtigt, dass Interaktionen zwischen Epithelzellen und vor allem Leukozyten essenziell für ein Entzündungsgeschehen sind. Ibrahim et al. (2017) zeigten, dass die Anwesenheit von PBMCs in einer endometrialen Epithelzellkultur nach Infektion mit *T. pyogenes* eine Erhöhung der mRNA-Expression von beispielsweise *IL8* und *PTGS2*, verglichen mit einer infizierten Kontrollgruppe ohne PBMCs, zur Folge hatte. Möglicherweise wären auch in dieser Untersuchung bei Anwesenheit von

PBMCs andere Ergebnisse bezüglich eines molekularen Entzündungsgeschehens erzielt worden.

Die Uteri für die Gewinnung der Zellen wurden während des Schlachtprozesses unmittelbar nach der Evisceration entnommen. Nur Zellen von Tieren, die keine Anzeichen von uterinen Pathologien zeigten, wurden kultiviert. Es wurden Uteri von Tieren entnommen, die noch nie trächtig waren und von Tieren, die bereits mehrere Kälber geboren hatten. Auch wurden Uteri aller unterschiedlichen Zyklusstände für die Zellkultur herangezogen. Es konnten während der Untersuchungen keine offensichtlichen Unterschiede diesbezüglich festgestellt werden. Allerdings wurden in dieser Untersuchung keine statistischen Analysen diesbezüglich vorgenommen, da die Anzahl der Organe zu gering war. Die Ko-Kultur von Epithel aus der Zellkultur mit verschiedenen Bakterien hat sich in dieser Studie als sehr nützlich herausgestellt, um Bakterien anhand ihrer eventuellen Pathogenität zu klassifizieren. In anderen Studien, die sich mit ähnlichen Interaktionen von Bakterien und deren Wirten befassten, wurde auf Gewebekulturen in Form von sogenannten Explants des Endometriums zurückgegriffen (Miller et al. 2007). Der Vorteil dieser Explants besteht darin, dass eine zelluläre Mischkultur untersucht werden kann. Hierbei besteht aber gleichzeitig der Nachteil, dass auch subepitheliale Zellen in direkten Kontakt mit Bakterien gelangen, was in einem gesunden Organismus nur in geringer Weise der Realität entspricht.

Gärtner et al. (2015) isolierten unter anderem *L. buchneri* aus dem bovinen Uterus und kultivierten dieses Isolat mit endometrialen Epithelzellen *in vitro*. Hierbei veränderte sich nach maximal 6 Stunden die mRNA-Expression pro-inflammatorischer Mediatoren, wie *IL1A*, *IL1B* und *IL6*, nicht. Peter et al. (2018) applizierten das gleiche Isolat intrauterin und untersuchten diese Tiere via Cytobrush-Probe auf Veränderungen der mRNA-Expression 7 bis 21 Tage nach der *L. buchneri*-Applikation. *In vivo* hingegen war die mRNA-Expression von *IL1B* und *IL8* vier Wochen nach Applikation von *L. buchneri* signifikant verringert, verglichen mit Kontrolltieren. Diese Ergebnisse zeigen, dass die endometriale Epithelzellkultur eine zuverlässige Methode darstellt, ein apathogenes Isolat, wie *L. buchneri*, *in vitro* zu untersuchen, bevor es *in vivo* angewendet wird. Die Unterschiede bezüglich der mRNA-Expression zwischen den beiden Studien beruhen unter anderem auf verschiedenen Untersuchungszeitpunkten. In der Zellkultur können solch langfristige Einflüsse von Bakterien nicht untersucht werden, da die Nutzungszeit der kultivierten Zellen begrenzt ist.

7.4 Einfluss von Milchsäurebakterien auf endometriale Epithelzellen

Bei den im bovinen Endometrium relevanten Bakterien unterscheidet man nach Sheldon et al. (2002) grundsätzlich zwischen 3 Gruppen: Zur ersten Gruppe gehören pathogene Bakterien, die endometriale Läsionen hervorrufen. Bei der zweiten Gruppe handelt es sich um potentiell pathogene Bakterien, die grundsätzlich keine endometrialen Läsionen hervorrufen, aber

gelegentlich aus infizierten Uteri isoliert werden. Zur dritten Gruppe gehören opportunistische Spezies, die keine endometrialen Läsionen hervorrufen. Milchsäurebakterien werden grundsätzlich zur dritten Gruppe gezählt, die keine endometrialen Läsionen hervorrufen. *Lactobacillus spp.*, *Pediococcus spp.* und *Leuconostoc spp.* werden von der „European Food Safety Authority“ als für Menschen und andere Säugetiere ungefährliche Mikroorganismen eingestuft (Koutsoumanis 2019).

Vor allem *Lactobacillus spp.* scheinen laut vorherigen Untersuchungen einen immuno-modulatorischen Einfluss auf endometriale Epithelzellen *in vitro* zu besitzen. *L. amylovorus* und *L. ruminis* führten bei Ko-Kultur mit endometrialen Epithelzellen zu einem Anstieg der mRNA-Expression pro-inflammatorischer Faktoren (Gärtner et al. 2015). Darüber hinaus wurde in einer anderen Untersuchung festgestellt, dass die Anwesenheit von *L. rhamnosus* die Synthese von pro-inflammatorischen Faktoren endometrialer Epithelzellen hemmt, die zuvor mit *E. coli* infiziert wurden (Liu et al. 2016). Peter et al. (2018) fanden heraus, dass die uterine Prävalenz von *Histophilus somni* bei Kühen geringer war, die zuvor intrauterin mit *L. buchneri* behandelt wurden.

Zell-Viabilitäten nach Ko-Kultur mit verschiedensten *Lactobacillales* zeigten teils diverse Unterschiede auf. Einige der untersuchten Isolate führten bereits nach 24 Stunden zum Absterben endometrialer Epithelzellen. Dies zeigt, dass bakterielle Spezies, für die bislang keine pathogene Wirkung bekannt war, pathogene Effekte auf das Endometrium haben können. Die Ko-Kultur von endometrialen Epithelzellen mit beispielsweise *Lactococcus garviae* oder *Weissella thailandensis* führte in dieser Studie zu einer deutlich erhöhten Anzahl nicht-vitaler Zellen. Diese Isolate führten somit *in vitro* zu endometrialen Läsionen. Ob die ko-kultivierten Bakterien direkt zytotoxisch waren, oder ob deren Stoffwechselprodukte zum Zelltod geführt haben, konnte in dieser Untersuchung bislang nicht festgestellt werden. Um die Gründe hierfür genau zu evaluieren, müssen erneut endometriale Epithelzellen mit Bakterien ko-kultiviert und das Epithelzellkulturmedium auf beispielsweise Milchsäure und Ethanol untersucht werden.

Vergleicht man das Auftreten pathogener Effekte der Bakterien, konnte man Unterschiede zwischen den Tieren beobachten. Einige der untersuchten Isolate führten bei endometrialen Epithelzellen mancher Rinder zu einem Zellsterben, während Zellen anderer Rinder unbeeinflusst blieben. Dieser Effekt könnte darauf hindeuten, dass die gleiche Spezies in der Lage ist, bei manchen Tieren eine klinische Infektion *in vivo* auszulösen, wohingegen andere Tiere eine Art der Immunität zu besitzen scheinen. Dieser Effekt war bei der Ko-Kultur von endometrialen Epithelzellen mit *Weissella hellenica* zu sehen. Solche individuellen Reaktionen werden auch *in vivo* beobachtet, da Pathogene, wie *T. pyogenes* und *Fusobacterium spp.*, auch aus gesunden Uteri isoliert werden und nicht zwangsläufig zu einer klinischen Infektion

führen (Santos & Bicalho 2012). Diese zellulären Mechanismen der Resistenz und Toleranz gegenüber Bakterien sind noch nicht im Detail untersucht (Sheldon et al. 2019).

Auch konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass anscheinend identische Spezies unterschiedliche Effekte bezüglich der Zellviabilität auslösen. *L. mucosae* 8.1 beispielsweise führte einerseits zu einem deutlichen Zelltod, wobei ein anderes Isolat der gleichen Spezies (*L. mucosae* 31) keine Viabilitätsänderungen hervorrief. Jedoch ist durch die hier genutzte Sequenzierungsmethode nicht eindeutig sichergestellt, dass die beiden Isolate tatsächlich identisch sind. Für eine exakte Charakterisierung muss das gesamte Genom der Bakterien untersucht und miteinander verglichen werden. Für die Isolate *L. mucosae* 8.1 und *L. mucosae* 8.2 wurde eine zusätzliche Sequenzierung mit einem *Lactobacillus*-spezifischem Primer durchgeführt, um die Spezieszugehörigkeit zu verifizieren.

Im Gegensatz dazu wurden mehrere bakterielle Isolate untersucht, die keinerlei mikroskopische Veränderungen der Zellen hervorrufen und somit als kommensal zu bezeichnen sind. Dazu zählten *L. mucosae* 31 und *Leuconostoc mesenteroides*. Unklar ist durch diese Untersuchung allerdings, ob die untersuchten Bakterien in der Lage sind, in der Ko-Kultur zu überleben oder sich sogar zu vermehren. Es wurde nur zu Beginn der Ko-Kultur die bakterielle Konzentration (kbE/ml) definiert, nicht aber die Veränderung dieser nach 72 Stunden. Es muss ebenso berücksichtigt werden, dass bei solch einer Untersuchung *in vitro* die Stoffwechselprodukte der Milchsäurebakterien im Nährmedium verbleiben und nicht, wie *in vivo*, über das venöse System abtransportiert werden. Somit befindet sich vermutlich nach 72-stündiger Ko-Kultur eine erhöhte Konzentration von beispielsweise Milchsäure im Zellkulturmedium. Milchsäurebakterien selbst sind azidophil und somit resistenter gegenüber einer Verringerung des pH-Wertes als andere bakterielle Spezies (Bohn et al. 2017).

Damit kann durch Betrachtung der Zellviabilität nicht zuverlässig bestimmt werden, ob die Bakterien selbst zu einem Zelltod führen, oder die Stoffwechselprodukte dieser Bakterien. Schulze et al. (2018) stellten jedoch fest, dass die Isolate *Weissella minor*, *L. animalis* und *L. reuteri* in Ko-Kultur mit porcinen Spermien den pH-Wert über mehrere Stunden nicht verändern und kein zytotoxisches Ethanol produzieren. Die Untersuchung der Zellviabilität in der Zellkultur dient dennoch sehr gut dazu, kommensale Spezies zu identifizieren, die keine zellulären Veränderungen hervorrufen. Bei ähnlichen Untersuchungen mit *Bacillus pumilus* konnte bereits nach wenigen Stunden eine vermehrte Anzahl nicht-vitaler endometrialer Epithelzellen beobachtet werden (Gärtner et al. 2016).

7.5 Pro-inflammatorische Cytokine, Chemokin-Liganden und Enzyme

In dieser Studie wurde die mRNA-Expression der pro-inflammatorischen Faktoren *CXCL1/-2*, *CXCL3*, *CXCL5*, *IL6*, *IL8* und *PTGS2* von endometrialen Epithelzellen nach Ko-Kultur mit

verschiedenen Milchsäurebakterien evaluiert. Zwar wurden die hier untersuchten Bakterien aus dem bovinen männlichen Genitaltrakt isoliert, aber deren Einfluss auf endometriale Epithelzellen *in vitro* lässt sich mit inflammatorischen Prozessen durch Bakterien aus dem uterinen Lumen vergleichen.

Wie bereits geschildert, werden Bakterien aus dem Uterus in 3 Gruppen unterteilt (Sheldon et al. 2002). Hier untersuchte Milchsäurebakterien werden grundsätzlich zur Gruppe solcher Bakterien gezählt, die keine endometrialen Läsionen hervorrufen. Allerdings führten vor allem *Pediococcus spp.*, *Lactococcus spp.* und *Weissella spp.* zu einer erhöhten Anzahl nicht-vitaler endometrialer Epithelzellen, jedoch ohne signifikante Erhöhung der mRNA-Expression pro-inflammatorischer Faktoren. *Bacillus pumilus* hingegen, isoliert aus dem bovinen Uterus, führte in einer anderen Untersuchung ebenfalls nach 24 Stunden zu einem Zelltod, aber innerhalb von 2 Stunden zu einem signifikanten Anstieg der *IL6*-, *IL8*-, *PTGS2*- und *CXCL*-mRNA-Expression (Gärtner et al. 2016).

Endometriale Epithelzellen erkennen bakterielle Antigene, also LPS gram-negativer und Zellwandbestandteile gram-positiver Bakterien, über die TLR 1, 2 und 6 (Turner et al. 2014). In dieser Untersuchung konnte gezeigt werden, dass die mRNA-Expression pro-inflammatorischer Faktoren mit der Stärke der makroskopischen Zellveränderungen korreliert. Solche Bakterien, welche mikroskopisch zu einer erhöhten Prozentzahl nicht-vitaler Zellen und morphologischen Veränderungen führten, bewirkten meist eine stärkere Erhöhung der mRNA-Expression der untersuchten pro-inflammatorischen Faktoren *CXCL1/-2*, *CXCL3*, *CXCL5*, *IL6*, *IL8* und *PTGS2*. Allerdings führten auch Isolate, wie zum Beispiel *Leuconostoc mesenteroides*, zu einer signifikanten Erhöhung der *IL8*-mRNA-Expression, ohne morphologische Veränderungen bezüglich der Zellviabilität zu verursachen.

Weissella spp., *Pediococcus spp.*, *Lactococcus sp.*, und teilweise *L. mucosae* führten zu deutlich erhöhten Expressionen bereits nach zweistündiger Inkubation. Im Gegensatz dazu bewirkten *Leuconostoc mesenteroides* und *L. mucosae* 31 deutlich geringfügigere Veränderungen. Dass *Lactobacillales* immuno-modulatorische Eigenschaften in unterschiedlichen Organen besitzen, ist aber bereits bekannt (Beecher et al. 2009, Gärtner et al. 2015, Genis et al. 2016). Es konnte gezeigt werden, dass zum Beispiel *L. buchneri* keine Veränderung der mRNA-Expression endometrialer Epithelzellen bewirkt, während *L. ruminis* und *L. amylovorus* eine deutliche pro-inflammatorische Reaktion auf molekularer Ebene zur Folge haben (Gärtner et al. 2015). Genis et al. (2016) zeigten *in vitro*, dass *L. rhamnosus* die mRNA-Expression pro-inflammatorischer Faktoren von endometrialen Epithelzellen, die mit *E. coli* infiziert wurden, um das bis zu 85-fache senkt.

Eine unzureichende Immunreaktion des Endometriums *in vivo* wird häufig als Auslöser für eine chronische Infektion des Uterus auch nach Abschluss des klinischen Puerperiums diskutiert. Ein signifikanter Anstieg der *IL1B*-, *IL8*- und *CXCL5*-mRNA-Expression korreliert positiv mit

der Anwesenheit von PMNs im Endometrium (Gabler et al. 2010). Synthetisierte Cytokine des Endometriums spielen eine zentrale Rolle im uterinen Entzündungsgeschehen (LeBlanc 2012).

Die *CXCL1/-2*- und *CXCL5*-mRNA-Expression endometrialer Epithelzellen war nach Ko-Kultur mit *L. mucosae* und *Leuconostoc mesenteroides* signifikant erhöht. Gärtner et al. (2016) zeigten bereits, dass sowohl *CXCL1/-2* als auch *CXCL3* im entzündeten Endometrium signifikant höher exprimiert wird als im gesunden Endometrium. Es wurde auch festgestellt, dass die *CXCL1/-2*-mRNA-Expression bei Tieren mit subklinischer, die *CXCL3*-mRNA-Expression bei Tieren mit klinischer Endometritis, höher exprimiert war.

Die Ko-Kultur von endometrialen Epithelzellen mit *L. mucosae 8.1* führte zu einer signifikanten Erhöhung der *IL6*-mRNA-Expression. Die anderen untersuchten Isolate führten nicht zu statistisch signifikanten Veränderungen bezüglich *IL6*.

IL6 führt *in vivo* zu einer gesteigerten Synthese von Akute-Phase-Proteinen und Lymphozytenproliferation (Kishimoto et al. 1995). Beim Rind konnte man zeigen, dass *IL6* eine Schlüsselrolle bei der Elimination von Bakterien aus dem Lumen des Uterus spielt (Sheldon & Dobson 2004). Dass in dieser Studie die *IL6*-mRNA-Expression nach Ko-Kultur mit *L. mucosae 8.1* zu einer Erhöhung führte, deckt sich nur teilweise mit Ergebnissen anderer Untersuchungen. In einer *in-vivo*-Untersuchung stieg die *IL6*-mRNA-Expression im entzündeten Uterus bei subfertilen Kühen nicht an (Wagener et al. 2017) und Fischer et al. (2010) stellten ebenfalls keinen Zusammenhang zwischen der *IL6*-mRNA-Expression und der Uterusgesundheit fest. *In vitro* führten *L. ruminis* und *L. amylovorus*, ähnlich wie *L. mucosae 8.1*, zu einem signifikanten Anstieg der *IL6*-mRNA-Expression endometrialer Epithelzellen (Gärtner et al. 2015).

Von den in dieser Studie untersuchten Isolaten führte nur *L. mucosae 8.1* zu einer statistisch signifikanten Erhöhung der *IL8*-mRNA-Expression. Das Chemokin *IL8* wirkt nach der Kalbung chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten und führt somit ebenfalls zu einer Elimination von Bakterien (Romagnani et al. 2004, Sheldon et al. 2009). Somit ist eine kurzzeitige Erhöhung der *IL6*- und *IL8*-Konzentration essenziell für eine Beseitigung eingedrungener Bakterien. Eine Erhöhung der *IL8* mRNA-Expression im entzündeten Endometrium wurde bereits zuvor in anderen Studien gezeigt (Gabler et al. 2010, Peter et al. 2015). Die anderen in dieser Studie untersuchten Isolate, wie *Leuconostoc mesenteroides*, führten nur zu geringfügigen Veränderungen der *IL8*-mRNA-Expression. Dies korreliert mit Untersuchungen aus der humanen Vaginalflora. Dort konnte gezeigt werden, dass bestimmte *Lactobacillus spp.* ebenfalls keine Veränderungen der *IL8*-mRNA-Expression bewirken. Untersucht wurden *L. crispatus*, *L. jensenii* und *L. rhamnosus* (Rose et al. 2012). Auch *L. vaginalis*, zur vaginalen Mikroflora des Menschen gehörend, verursacht keine Veränderung der *IL8*-mRNA-Expression boviner endometrialer Epithelzellen (Gärtner et al. 2015).

Eicosanoide spielen ebenfalls als Mediatoren eine essenzielle Rolle während des primären Entzündungsgeschehen im Endometrium. Die PTGS2 katalysiert die Reaktion von Arachidonsäure zu Prostaglandin H₂ (PGH₂). PGH₂ wird dann in weiteren Reaktionen zu verschiedenen Prostaglandinen metabolisiert (Kohli & Levy 2009).

In dieser Studie war die *PTGS2*-mRNA-Expression endometrialer Epithelzellen nur nach Ko-Kultur mit *Leuconostoc mesenteroides* statistisch signifikant erhöht. Bezüglich der *PTGS2* ist die mRNA-Expression demnach nur bei dem Isolat erhöht, welches nicht zu mikroskopischen Veränderungen der endometrialen Epithelzellen geführt hat.

In einigen zuvor erfolgten Untersuchungen lag keine Relation zwischen der *PTGS2*-mRNA-Expression und einer Endometritis vor (Fischer et al. 2010, Peter et al. 2015). Die Resultate dieser Untersuchungen decken sich somit mit den Ergebnissen der hier vorliegenden Studie.

Im Gegensatz dazu wurde in einer anderen Studie ein Zusammenhang zwischen der *PTGS2*-mRNA-Expression und einer Endometritis beobachtet. Darüber hinaus wurde dabei festgestellt, dass bei einer Endometritis vermehrt Prostaglandin E₂ synthetisiert wird, was zu einer Verschlechterung der Fruchtbarkeit führen könnte (Baranski et al. 2013). Die Untersuchungen bezüglich der *PTGS2*-mRNA-Expression zeigen bisher kontroverse Ergebnisse, die weitere Studien nötig machen.

Somit scheinen bestimmte Spezies unter den *Lactobacillales* Veränderungen bezüglich der mRNA-Expression von den untersuchten Cytokinen und Prostaglandin-Endoperoxid-Synthasen zu bewirken. Das Ausmaß dieser mRNA-Expressionsänderungen variiert deutlich zwischen den untersuchten Isolaten.

Ein Anstieg der mRNA-Expression pro-inflammatorischer Faktoren des Endometriums wird in der postpartalen Phase als physiologisch angesehen und korreliert positiv mit einer Infiltration von PMNs. Die Evaluation dieser mRNA-Expression liefert, im Gegensatz zu mikroskopischen Verfahren, detaillierte Aufschlüsse über die Stärke eines Entzündungsgeschehens im Endometrium (Gabler et al. 2010).

Nicht nur Bakterien, sondern auch Spermien selbst können inflammatorische Prozesse des Endometriums initiieren, die in gewisser Weise den Prozessen während einer bakteriellen Infektion ähneln.

In einer kürzlich veröffentlichten Untersuchung wurde von Elweza et al. (2018) der Einfluss von bovinen Spermien auf endometriale Epithelzellen *in vitro* untersucht. Die Anwesenheit von Spermien in einer Konzentration von 1 x 10⁴ bis 1 x 10⁶/ml führte unter anderem zu einer signifikanten Erhöhung der *IL1B*- und *IL8*-mRNA-Expression der endometrialen Epithelzellen. Diese inflammatorische Reaktion wird als physiologische Reaktion diskutiert, um die Phagozytose von Spermien durch neutrophile Granulozyten aus dem Uterus zu induzieren.

Dass die artifizielle Insemination eine inflammatorische Reaktion des Uterus hervorruft, wurde bereits zuvor von Kaufmann et al. (2009) beschrieben. 4 Stunden nach artifizieller Insemination konnte bei nahezu der Hälfte der untersuchten Rinder eine geringfügig erhöhte Anzahl an PMNs im Endometrium nachgewiesen werden. Bei Tieren mit einer moderaten Infiltration des Endometriums mit PMNs war die Konzeptionsrate am höchsten. Eine hochgradige Chemotaxis von PMNs hingegen verringerte die Konzeptionsrate.

IL8 als stark chemotaktischer Mediator war in dieser Untersuchung nach Ko-Kultur mit *L. mucosae* 8.1 signifikant erhöht. Eine potenzielle Chemotaxis von PMNs wurde zwar hier nicht untersucht, aber es kann angenommen werden, dass die untersuchten Bakterien *in vivo* ebenfalls zu einer moderaten Infiltration des Endometriums mit PMNs führen würden. Dieses Beispiel zeigt diese bereits erwähnten ähnlichen Reaktionsmuster, unabhängig von der Ursache, auf.

7.6 Einfluss von Milchsäurebakterien auf Spermien

In dieser Studie wurde der Einfluss verschiedener Milchsäurebakterien auf die Motilität boviner Spermien untersucht. Der Fokus lag hierbei auf Veränderungen bezüglich der progressiven Motilität, obwohl zusätzlich die Gesamtmotilität, die zirkuläre Motilität und die Geschwindigkeit der Spermien ermittelt wurde. Als Hauptkriterium zur Beurteilung von Bullenspermien in Besamungsstationen wird der Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien herangezogen. In nativem Ejakulat sollen mindestens 70 % der Spermien vorwärtsbeweglich sein (ADR 2006a). Die progressive Motilität der Spermien verringerte sich geringfügig nach Ko-Kultur mit *L. mucosae* 8.2 und *L. mucosae* 31. Die Ko-Kultur von Spermien mit *L. buchneri*, isoliert aus dem bovinen Uterus, und mit *Leuconostoc mesenteroides* führte nicht zu Veränderungen der progressiven Motilität. Als Verdünner für die Spermien wurde in dieser Studie Triladyl ohne Zusatz von Antibiotika verwendet. Triladyl wurde in einem Vorversuch zusammen mit den untersuchten Bakterien bei -80° C eingefroren und anschließend aufgetaut, um zu kontrollieren, ob die Bakterien im eingesetzten Verdünner rekultiviert werden können. Der untersuchte Verdünner hatte keinen Einfluss auf die Wachstumsqualität der Bakterien.

Verschiedene Studien befassen sich mit dem Einfluss von Bakterien auf die Motilität und Vitalität von Spermien. Der Fokus dieser Studien liegt meist auf Pathogenen, während der Einfluss der hier untersuchten Milchsäurebakterien auf bovine Spermien bislang nicht untersucht wurde.

Gonzalez-Marin et al. (2011) fanden heraus, dass Bakterien im bovinen Ejakulat nach maximal 96 Stunden eine Erhöhung der DNA-Fragmentation der Spermien hervorrufen. In dieser Studie wurden aber nicht explizit Milchsäurebakterien untersucht, sondern es wurden unter anderem Bakterien des Stammes *Firmicutes*, zu dem die Milchsäurebakterien gehören, isoliert. Die

stündliche Erhöhung der Rate an Spermien mit fragmentierter DNA in Anwesenheit von Bakterien betrug 0,7 %, während die Rate ohne Bakterien 0,05 % betrug.

Im Gegensatz zu den bereits genannten Ergebnissen wurden in einer humanmedizinischen Untersuchung positive Effekte in Bezug auf die Lipid-Peroxidation humaner Spermien festgestellt. Durch Zugabe einer Lösung von 1×10^8 kbE, bestehend aus *L. brevis*, *L. salivarius* und *L. plantarum* zu humanem Ejakulat wurde die Rate an durch Lipid-Peroxidation geschädigten Spermien signifikant verringert. Die progressive Motilität der Spermien korreliert negativ mit der Stärke der Lipid-Peroxidation, weshalb die eingesetzten Milchsäurebakterien zu einer leichten Erhöhung der progressiven Motilität führten (Barbonetti et al. 2011).

Eine weitere humanmedizinische Studie befasste sich ebenfalls mit dem Zusammenhang von Bakteriospermie und den Fertilitätsparametern der Spermien. Die hier häufigst isolierten Bakterien waren *Ureaplasma urealyticum*, *Streptococcus spp.* und *Staphylococcus spp.* Bezüglich der Vitalität konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Probanden mit Bakteriospermie und den Kontrollprobanden festgestellt werden. Nur bei Probanden, bei denen *Corynebacterium spp.* festgestellt wurden, war die Vitalität der Spermien signifikant verringert (Hannachi et al. 2018).

Schulze et al. (2018) untersuchten den Einfluss von Milchsäurebakterien, isoliert aus dem Seminalplasma von Zuchtebern, auf porcine Spermien. Die Isolate *L. animalis*, *L. reuteri* und *Weissella minor* wurden untersucht. Zusätzlich wurde *L. buchneri*, isoliert aus dem bovinen Uterus, mit porcinen Spermien ko-kultiviert. *L. buchneri* führte hier nach 2 Stunden in einer Konzentration von 1×10^5 und 1×10^6 kbE/ml nicht zu Veränderungen der progressiven Motilität. *L. animalis* führte nach bereits 60 Minuten zu einer signifikanten Verringerung der progressiven Motilität. Nach einer Inkubationszeit von 4 und 5 Tagen mit *L. buchneri* war die progressive Motilität der porcinen Spermien in beiden Konzentrationen, also 1×10^5 und 1×10^6 kbE/ml, signifikant verringert. Allerdings haben solch lange Inkubationszeiten beim Rind keine Relevanz, da bovinen Sperma üblicherweise unmittelbar nach der Samengewinnung kryokonserviert wird. Die Hypothese, dass die Motilität der Spermien durch eine erhöhte Konzentration von Milchsäure und einer damit verbundenen Verringerung des pH-Wertes abnimmt, wurde verworfen, da sich der pH-Wert des Milieus nur geringfügig veränderte.

In einer anderen Untersuchung wurde die Motilität boviner Spermien in Abhängigkeit von verschiedenen pH-Werten der Umgebung untersucht. Die höchste Motilität der Spermien wurde bei einem pH-Wert zwischen 7,0 und 7,5 beobachtet. Dies entspricht auch dem physiologischen Milieu des Seminalplasmas. Erst bei pH-Werten unter 6,5 und über 8,0 konnte eine signifikante Verringerung der progressiven Motilität beobachtet werden (Contri et al. 2013). Der pH-Wert des Verdünners nach Ko-Kultur mit den Milchsäurebakterien wurde hier allerdings nicht ermittelt.

In dieser vorliegenden Untersuchung wurde *L. buchneri* in einer Konzentration von bis zu 1×10^7 kbE/ml für bis zu 4 Stunden mit bovinen Spermien inkubiert. Auch bei dieser erhöhten Konzentration und verlängerten Inkubationszeit wurde keine Veränderung der progressiven Motilität festgestellt. Die Ko-Kultur von *Leuconostoc mesenteroides* mit bovinen Spermien führte nach einer Inkubation von bis zu 4 Stunden nicht zu Veränderungen. Im Gegensatz dazu führte *L. mucosae* zu signifikanten Verringerungen der progressiven Motilität bereits nach 2 Stunden. Somit decken sich die Ergebnisse bezüglich der Untersuchung von *L. buchneri* mit den Ergebnissen von Schulze et al. (2018) über porcine Spermien.

7.7 Schlussfolgerung

Erstmalig wurde in dieser Studie der männliche Genitaltrakt des Bullen auf kommensale Bakterien untersucht. Deren Einfluss auf bovine endometriale Epithelzellen und bovine Spermien konnte *in vitro* evaluiert werden. Einige der isolierten Milchsäurebakterien besitzen eine potenzielle Pathogenität, während andere Isolate keine Veränderungen des Endometriums oder der Spermien bewirken.

Endometriale Epithelzellen wurden sowohl auf mikroskopischer Ebene als auch auf molekularbiologischer Ebene untersucht. Es besteht eine deutliche Korrelation zwischen mikroskopischen Veränderungen und erhöhter mRNA-Expression bestimmter pro-inflammatorischer Faktoren. *L. mucosae* und *Leuconostoc mesenteroides* führten mikroskopisch nicht zu zellulären Veränderungen und auf mRNA-Expressionsebene wurden nur partielle Veränderungen in meist hohen MOIs und nach längerer Ko-Kultur detektiert. *Lactococcus spp.*, *Weissella spp.* und *Pediococcus spp.* führten bereits mikroskopisch zu zellulären Veränderungen und zu einer erhöhten Anzahl nicht-vitaler Zellen.

Die progressive Motilität boviner Spermien wurde durch die Anwesenheit von *Leuconostoc mesenteroides* nicht beeinflusst. Darüber hinaus bewirkte *L. buchneri*, isoliert aus dem bovinen Uterus, ebenso keine Veränderung der progressiven Motilität.

Abschließend kann festgehalten werden, dass analog zum weiblichen Genitaltrakt des Rindes, auch kommensale Bakterien am männlichen Genitaltrakt existieren. Allerdings wurden gerade in Bezug auf die mikrobiologische Untersuchung des Seminalplasmas deutlich weniger kommensale Bakterien isoliert als aus dem bovinen Uterus. Im Gegensatz dazu konnten aus den Tupferproben des Penis und Präputiums von jedem Tier Milchsäurebakterien isoliert werden. Die häufigsten isolierten Gattungen waren *Pediococcus* und *Weissella*.

Der Einfluss der untersuchten Bakterien auf bovine endometriale Epithelzellen und bovine Spermien ist speziesspezifisch sehr unterschiedlich. Mit dieser Untersuchung konnte somit der Grundstein für die Forschung über Probiotika aus dem Genitaltrakt des Bullen gelegt werden.

7.8 Ausblick

Resistenzen gegen Antiinfektiva werden immer häufiger und dies führt zu großen Risiken in der Tier-, aber vor allem in der Humanmedizin.

Da Sperma-Pailletten zur künstlichen Besamung grundsätzlich mit antibiotischen Wirkstoffen versetzt werden, sollte angestrebt werden, den Einsatz dieser Wirkstoffe langfristig zu reduzieren. Dieser prophylaktische Einsatz von Antiinfektiva führt darüber hinaus zur Eliminierung von potentiell probiotischen Bakterien.

Das Wissen über kommensale Bakterien und deren Wirkung auf Organsysteme von Tier und Mensch könnte dazu beitragen, Krankheiten zukünftig alternativ zu therapieren. Probiotische Milchsäurebakterien stehen hierbei besonders im Fokus. Es ist inzwischen bekannt, dass *Lactobacillus spp.* im Uterus des Rindes positive Eigenschaften in Bezug auf die Fruchtbarkeit bei Tieren mit subklinischer Endometritis aufweisen. Somit kann dann der Grundstein für die Reduktion von Antibiotika in Zusammenhang mit Erkrankungen des Uterus gelegt werden.

Durch diese Untersuchung konnten einige kommensale Isolate aus dem bovinen männlichen Genitaltrakt charakterisiert und näher evaluiert werden. Durch die durchgeführten *in-vitro*-Versuche konnte bereits zwischen pathogenen und apathogenen Spezies unterschieden werden. Der Nutzen solcher apathogenen Bakterien, wie *Leuconostoc mesenteroides*, muss zukünftig noch detaillierter erforscht werden.

8 Zusammenfassung

Die bakterielle Kontamination des männlichen Genitaltraktes und vor allem des Seminalplasmas von Bullen ist ein bekanntes Problem in der Rinderzucht. Pathogene Bakterien, die venerische Erkrankungen verursachen, wurden in den letzten Jahren intensiv untersucht. Im Gegensatz dazu ist das Wissen über kommensale Bakterien des Genitaltraktes von Bullen bislang sehr gering. Aus diesem Grund war es das Ziel dieser Studie, kommensale Bakterien aus dem bovinen männlichen Genitaltrakt zu isolieren und deren Effekt auf endometriale Epithelzellen und bovine Spermien *in vitro* zu untersuchen.

57 Seminalplasmaproben von 40 verschiedenen Zuchtbullen wurden untersucht. Zusätzlich wurden bei 12 geschlachteten Mastbullen Tupferproben von Penisspitze und Präputium genommen. Bakterien wurden in speziellen Nährmedien für die Anzucht von Milchsäurebakterien inkubiert. Erhaltene Isolate wurden durch eine Sequenzierung der 16S-rDNA charakterisiert. Endometriale Epithelzellen wurden bis zur zweiten Passage kultiviert und dann in Ko-Kultur mit isolierten Bakterien verbracht. Diese Ko-Kultur fand immer in drei unterschiedlichen „multiplicities of infection“ (MOI 1, 5 und 10) statt. Jeder untersuchte Bakterienstamm wurde mit Zellen von mindestens vier verschiedenen Schlachttieren ko-kultiviert. Eine Untersuchung der Zellviabilität via Trypanblau-Färbung wurde alle 24 Stunden über einen Zeitraum von drei Tagen durchgeführt. Zusätzlich wurden endometriale Epithelzellen für einen Zeitraum von sechs Stunden ko-kultiviert, welche alle zwei Stunden lysiert wurden. Diese Zell-Lysate dienten der Untersuchung der *Chemokin-X-Ligand (CXCL) 1/2-, CXCL3-, CXCL5-, Interleukin (IL) 6-, IL8-* und *Prostaglandin-Endoperoxid-Synthase 2- (PTGS2)* mRNA-Expression. Dies geschah durch eine reverse Transkription und anschließender Real-time-PCR. Bovine Spermien wurden nach der Samengewinnung für bis zu 4 Stunden mit unterschiedlichen Milchsäurebakterien in dem Verdünner Triladyl ko-kultiviert. Nach 2 und 4 Stunden wurde via computergestützter Vitalitätsanalyse (CASA) die progressive Motilität der Spermien ermittelt.

Die bakteriologische Untersuchung des Seminalplasmas von Zuchtbullen ergab bei 27 der insgesamt 54 Proben kein Nachweis von Bakterien. In 27 Proben konnten Bakterien charakterisiert werden; darunter einige Spezies der Gattungen *Staphylococcus*, *Streptococcus* und *Bacillus*. Allerdings konnten in vier Proben, welche von drei verschiedenen Bullen stammten, Milchsäurebakterien isoliert werden. Drei der Isolate wurden als *Lactobacillus (L.) mucosae (L. mucosae 8.1, 8.2 und 31)* identifiziert und ein weiteres Isolat als *Leuconostoc mesenteroides*. Bei den Tupferproben des Genitaltraktes von Mastbullen konnten in allen Proben Bakterien isoliert werden. Darunter war einmal *Streptococcus sp.* und *Corynebacterium sp.*, während alle anderen Isolate den Milchsäurebakterien zugerechnet

werden. Ein Isolat wurde als *Lactococcus garviae* und alle anderen als *Pediococcus spp.* (n = 28) oder *Weissella spp.* (n = 3) identifiziert.

Alle vier isolierten Milchsäurebakterien aus dem Seminalplasma wurden weiterführend untersucht, während aus den Isolaten der Mastbullen nur fünf Isolate zufällig ausgesucht und weiter untersucht wurden.

Einige der Isolate führten nach Ko-Kultur zu einem Zelltod der Epithelien, während andere Isolate nach 72 Stunden keine Veränderungen an endometrialen Epithelzellen bewirkten. *L. mucosae 8.2*, *L. mucosae 31* und *Leuconostoc mesenteroides* führten nicht zu Veränderungen der Zell-Viabilität, während *Enterococcus faecalis*, *Lactococcus garviae*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus*, *Weissella thailandensis* und *Weissella hellenica* teilweise bereits nach 24 Stunden zu einem vermehrten Zelltod und zu einer verringerten Konfluenz der endometrialen Epithelzellen führten. *L. mucosae 8.2*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus* und *Weissella hellenica* führten nicht zu Veränderungen der mRNA-Expression der untersuchten pro-inflammatorischen Faktoren, während *L. mucosae 8.1*, *L. mucosae 31* und *Leuconostoc mesenteroides* zu einer signifikanten Erhöhung der mRNA-Expression von einigen pro-inflammatorischen Faktoren führten. Die Ko-Kultur von bovinen Spermien mit Milchsäurebakterien zeigte, dass *L. buchneri*, isoliert aus dem bovinen Uterus, *Leuconostoc mesenteroides* und *L. mucosae 8.1* nicht zu Veränderungen der progressiven Motilität führten. *L. mucosae 8.2* und *L. mucosae 31* hingegen führten bereits nach 2 Stunden zu einer geringfügigen Verringerung der progressiven Motilität boviner Spermien um maximal 5,5 %. Nach 4 Stunden wurde nur bei *L. mucosae 8.2* eine Verringerung der progressiven Motilität um 4,3 % beobachtet.

Abschließend lässt sich festhalten, dass kommensale Bakterien im bovinen männlichen Genitaltrakt existieren. Es wurden nur wenige Isolate aus dem Seminalplasma isoliert, während von den Schleimhäuten des Genitaltraktes aller Bullen Milchsäurebakterien kultiviert werden konnten. Der Einfluss dieser Bakterien auf das Uterusepithel und auf bovine Spermien *in vitro* ist speziesspezifisch sehr unterschiedlich.

9 Summary

Title: “Investigations of lactic acid bacteria from the bovine male genital tract”

Bacterial contamination of the bovine male genital tract, especially of the seminal plasma, is a known problem in reproduction of dairy cattle. Pathogenic bacterial which can cause venereal diseases have been investigated intensively. However, knowledge about commensal bacteria in the genital tract of bulls is rare. Therefore, the aim of the present study was to evaluate the presence of commensal bacteria in the bovine male genital tract and to investigate their effect on endometrial epithelial cells and on bovine spermatozoa *in vitro*.

57 seminal plasma samples obtained from 40 healthy Holstein-Frisian bulls were examined. In addition, the preputial cavity and penis of 12 slaughtered fattening bulls were examined by swabbing. Samples were incubated on selective agar plates to reveal the presence of lactic acid bacteria. Obtained colonies were further characterized by sequencing of the 16S rDNA. Endometrial epithelial cells were cultured until passage 2 and incubated with isolated bacteria. This co-culture was performed in 3 different “multiplicities of infection” (MOI 1, 5 and 10, respectively). Every bacterial strain was co-cultured with cells from at least 4 different animals. Cell viability staining with trypan blue was performed every 24 hours for 3 days. In addition, endometrial epithelial cells were incubated with selected bacterial strains for 6 hours and cells were lysed every 2 hours. These lysed cells were analyzed for mRNA expression of the selected pro-inflammatory factors *interleukin (IL) 6*, *IL8*, *chemokine-ligand- (CXCL) 1/-2*, *CXCL3*, *CXCL5* and *prostaglandin-synthase 2 (PTGS2)*. Therefore, total RNA was extracted and used for reverse-transcription-real-time-PCR. Bovine spermatozoa were co-cultured with different lactic acid bacteria for up to 4 hours in Triladyl. After 2 and 4 hours, progressive motility of spermatozoa was measured by computer-assisted sperm analysis (CASA).

27 of the 54 seminal plasma samples from breeding bulls did not contain any cultivable bacteria. 27 bacterial colonies could be characterized, such as *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, and *Bacillus spp.* From 4 samples, obtained from 3 different bulls, lactic acid bacteria were isolated. 3 isolates were identified as *Lactobacillus (L.) mucosae 8.1*, *8.2*, *31* and another isolate as *Leuconostoc mesenteroides*. Concerning the swabs from the genital tract of fattening bulls, bacteria were isolated from all samples. Besides *Streptococcus sp.* and *Corynebacterium sp.*, all other strains belong to the order of lactic acid bacteria. One strain was identified as *Lactococcus garviae*, all others as *Pediococcus spp.* (n = 28) and *Weissella spp.* (n = 3). All 4 lactic acid bacteria from the seminal plasma and 5 bacterial strains from the swabs of fattening bulls were chosen for further experiments. Some isolates caused death of endometrial epithelial cells while other strains did not lead to morphological alterations of cells. *L. mucosae 8.2*, *L. mucosae 31* and *Leuconostoc mesenteroides* did not cause endometrial

cell death while *Enterococcus faecalis*, *Lactococcus garviae*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus*, *Weissella thailandensis* and *Weissella hellenica* caused death of cells and a decrease of cell-confluence, partly after only 24 hours. *L. mucosae* 8.2, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus* and *Weissella hellenica* did not influence mRNA-expression of pro-inflammatory factors. In contrast, *L. mucosae* 8.1, *L. mucosae* 31 and *Leuconostoc mesenteroides* caused a significant increase of mRNA-expression of certain pro-inflammatory factors. Co-culture of bovine spermatozoa with lactic acid bacteria revealed that *L. buchneri*, isolated from the bovine uterus, *L. mucosae* 8.1 and *Leuconostoc mesenteroides* did not influence progressive motility of spermatozoa. *L. mucosae* 8.2 and *L. mucosae* 31 caused a significant decrease of progressive motility after 2 hours by a maximum of 5.5 %. After 4 hours, a decrease of progressive motility was observed only for *L. mucosae* 8.2 by 4.3 %.

In conclusion, lactic acid bacteria exist in the bovine male genital tract. Only few isolates could be characterized from the seminal plasma while lactic acid bacteria were cultured from mucosal membranes of the genital tract of all animals. The immunological response of endometrial epithelial cells and bovine spermatozoa to these bacteria *in vitro* varies in a strain specific manner.

10 Literaturverzeichnis

Acedo, JZ, MJ van Belkum, CT Lohans, RT McKay, M Miskolzie & JC Vederas 2015 Solution structure of acidocin B, a circular bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* M46. *Appl Environ Microbiol* **81** 2910-2918.

Addison, CL, TO Daniel, MD Burdick, H Liu, JE Ehlert, YY Xue, L Buechi, A Walz, A Richmond & RM Strieter 2000 The CXC chemokine receptor 2, CXCR2, is the putative receptor for ELR+ CXC chemokine-induced angiogenic activity. *J Immunol* **165** 5269-5277.

Adetoye, A, E Pinloche, BA Adeniyi & FA Ayeni 2018 Characterization and anti-salmonella activities of lactic acid bacteria isolated from cattle faeces. *BMC Microbiol* **18** 96.

Adnane, M, A Chapwanya, R Kaidi, KG Meade & C O'Farrelly 2017 Profiling inflammatory biomarkers in cervico-vaginal mucus (CVM) postpartum: Potential early indicators of bovine clinical endometritis? *Theriogenology* **103** 117-122.

ADR 2006a ADR – Empfehlung 8.2 Anforderungen an Zuchtbullen für den Einsatz in der KB und für Deckbullen. In AdR e.V. (ed.).

ADR 2006b ADR – Empfehlung 8.3. Garantierte Qualität für Bullensperma im Handel. In AdR e.V. (ed.).

Almquist, JO, RJ Branas & KA Barber 1976 Postpuberal changes in semen production of Charolais bulls ejaculated at high frequency and the relation between testicular measurements and sperm output. *J Anim Sci* **42** 670-676.

Aloe, S, F Weber, B Behr, C Sauter-Louis & H Zerbe 2012 Modulatory effects of bovine seminal plasma on uterine inflammatory processes. *Reprod Domest Anim* **47** 12-19.

Amann, RP & RH Hammerstedt 1980 Validation of a system for computerized measurements of spermatozoal velocity and percentage of motile sperm. *Biol Reprod* **23** 647-656.

Andam, CP & WP Hanage 2015 Mechanisms of genome evolution of *Streptococcus*. *Infect Genet Evol* **33** 334-342.

-
- Ansari, MS, BA Rakha, S Akhter & M Ashiq** 2016 OPTIXcell improves the postthaw quality and fertility of buffalo bull sperm. *Theriogenology* **85** 528-532.
- Anzar, M, T Kroetsch & L Boswall** 2011 Cryopreservation of bull semen shipped overnight and its effect on post-thaw sperm motility, plasma membrane integrity, mitochondrial membrane potential and normal acrosomes. *Anim Reprod Sci* **126** 23-31.
- Aristimuno Ficooseco, C, FI Mansilla, NC Maldonado, H Miranda, ME Fatima Nader-Macias & GM Vignolo** 2018 Safety and growth optimization of lactic acid bacteria isolated from feedlot cattle for probiotic formula design. *Front Microbiol* **9** 2220.
- Atassi, F, D Brassart, P Grob, F Graf & AL Servin** 2006 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* **48** 424-432.
- Ayele, WY, M Bartos, P Svastova & I Pavlik** 2004 Distribution of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in organs of naturally infected bull-calves and breeding bulls. *Vet Microbiol* **103** 209-217.
- Baggiolini, M & I Clark-Lewis** 1992 Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. *FEBS Lett* **307** 97-101.
- Baranski, W, K Lukasik, D Skarzynski, M Sztachanska, S Zdunczyk & T Janowski** 2013 Secretion of prostaglandins and leukotrienes by endometrial cells in cows with subclinical and clinical endometritis. *Theriogenology* **80** 766-772.
- Barbonetti, A, B Cinque, MR Vassallo, S Mineo, S Francavilla, MG Cifone & F Francavilla** 2011 Effect of vaginal probiotic lactobacilli on in vitro-induced sperm lipid peroxidation and its impact on sperm motility and viability. *Fertil Steril* **95** 2485-2488.
- Barnett, TC, JN Cole, T Rivera-Hernandez, A Henningham, JC Paton, V Nizet & MJ Walker** 2015 Streptococcal toxins: role in pathogenesis and disease. *Cell Microbiol* **17** 1721-1741.
- Baud, D, C Pattaroni, N Vulliemoz, V Castella, BJ Marsland & M Stojanov** 2019 Sperm Microbiota and Its Impact on Semen Parameters. *Front Microbiol* **10** 234.

- Beecher, C, M Daly, DP Berry, K Klostermann, J Flynn, W Meaney, C Hill, TV McCarthy, RP Ross & L Giblin** 2009 Administration of a live culture of *Lactococcus lactis* DPC 3147 into the bovine mammary gland stimulates the local host immune response, particularly IL-1beta and IL-8 gene expression. *J Dairy Res* **76** 340-348.
- Benchimol, M, I de Andrade Rosa, R da Silva Fontes & AJ Burla Dias** 2008 *Trichomonas* adhere and phagocytose sperm cells: adhesion seems to be a prominent stage during interaction. *Parasitol Res* **102** 597-604.
- Beutler, BA** 2009 TLRs and innate immunity. *Blood* **113** 1399-1407.
- Bielanski, A, H Bergeron, PC Lau & J Devenish** 2003 Microbial contamination of embryos and semen during long term banking in liquid nitrogen. *Cryobiology* **46** 146-152.
- Bohn, J, A Yuksel-Dadak, S Droge & H Konig** 2017 Isolation of lactic acid-forming bacteria from biogas plants. *J Biotechnol* **244** 4-15.
- Bondurant, RH** 1999 Inflammation in the bovine female reproductive tract. *J Anim Sci* **77 Suppl 2** 101-110.
- Bondurant, RH** 2005 Venereal diseases of cattle: natural history, diagnosis, and the role of vaccines in their control. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* **21** 383-408.
- Borges, AM, GD Healey & IM Sheldon** 2012 Explants of intact endometrium to model bovine innate immunity and inflammation ex vivo. *Am J Reprod Immunol* **67** 526-539.
- Bousseau, S, JP Brillard, B Marguant-Le Guienne, B Guerin, A Camus & M Lechat** 1998 Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents. *Theriogenology* **50** 699-706.
- BRS** 2017 Rinder- und Schweineproduktion in Deutschland. Bundesverband Rind und Schwein e.V. (BRS).
- Burdan, F, A Chalas & J Szumilo** 2006 Cyclooxygenase and prostanoids--biological implications. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* **60** 129-141.

-
- Bush, K & PA Bradford** 2016 beta-Lactams and beta-Lactamase Inhibitors: An Overview. *Cold Spring Harb Perspect Med* **6**.
- Cai, Y, H Pang, M Kitahara & M Ohkuma** 2012 *Lactobacillus nasuensis* sp. nov., a lactic acid bacterium isolated from silage, and emended description of the genus *Lactobacillus*. *Int J Syst Evol Microbiol* **62** 1140-1144.
- Ceotto-Vigoder, H, SL Marques, IN Santos, MD Alves, ES Barrias, A Potter, DS Alviano & MC Bastos** 2016 Nisin and lysostaphin activity against preformed biofilm of *Staphylococcus aureus* involved in bovine mastitis. *J Appl Microbiol* **121** 101-114.
- Chapwanya, A, KG Meade, ML Doherty, JJ Callanan, JF Mee & C O'Farrelly** 2009 Histopathological and molecular evaluation of Holstein-Friesian cows postpartum: toward an improved understanding of uterine innate immunity. *Theriogenology* **71** 1396-1407.
- Christensen, P, R Labouriau, A Birck, GB Boe-Hansen, J Pedersen & S Borchersen** 2011 Relationship among seminal quality measures and field fertility of young dairy bulls using low-dose inseminations. *J Dairy Sci* **94** 1744-1754.
- Contri, A, A Gloria, D Robbe, C Valorz, L Wegher & A Carluccio** 2013 Kinematic study on the effect of pH on bull sperm function. *Anim Reprod Sci* **136** 252-259.
- Coulter, GH & RH Foote** 1979 Bovine testicular measurements as indicators of reproductive performance and their relationship to productive traits in cattle: a review. *Theriogenology* **11** 297-311.
- Davies, D, KG Meade, S Herath, PD Eckersall, D Gonzalez, JO White, RS Conlan, C O'Farrelly & IM Sheldon** 2008 Toll-like receptor and antimicrobial peptide expression in the bovine endometrium. *Reprod Biol Endocrinol* **6** 53.
- Deng, Q, JF Odhiambo, U Farooq, T Lam, SM Dunn & BN Ametaj** 2014 Intravaginal lactic Acid bacteria modulated local and systemic immune responses and lowered the incidence of uterine infections in periparturient dairy cows. *PLoS One* **10** e0124167.
- Druart, X, JP Rickard, S Mactier, PL Kohnke, CM Kershaw-Young, R Bathgate, Z Gibb, B Crossett, G Tsikis, V Labas, G Harichaux, CG Grupen & SP de Graaf** 2013

- Proteomic characterization and cross species comparison of mammalian seminal plasma. *J Proteomics* **91** 13-22.
- Dubernet, S, N Desmases & M Gueguen** 2002 A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level. *FEMS Microbiol Lett* **214** 271-275.
- Eaglesome, MD & MM Garcia** 1997 Disease risks to animal health from artificial insemination with bovine semen. *Rev Sci Tech* **16** 215-225.
- Eldin, C, C Melenotte, O Mediannikov, E Ghigo, M Million, S Edouard, JL Mege, M Maurin & D Raoult** 2017 From Q Fever to *Coxiella burnetii* Infection: a Paradigm Change. *Clin Microbiol Rev* **30** 115-190.
- Elweza, AE, MA Ezz, TJ Acosta, AK Talukder, T Shimizu, H Hayakawa, M Shimada, K Imakawa, AH Zaghloul & A Miyamoto** 2018 A proinflammatory response of bovine endometrial epithelial cells to active sperm in vitro. *Mol Reprod Dev* **85** 215-226.
- EU Richtlinie 88/407** 1988 Richtlinie 88/407/EWG des Rates vom 14. Juni 1988 zur Festlegung der tierseuchenrechtlichen Anforderungen an den innergemeinschaftlichen Handelsverkehr mit gefrorenem Samen von Rindern und an dessen Einfuhr *In E Union* (ed.).
- Fernandez, EJ & E Lolis** 2002 Structure, function, and inhibition of chemokines. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **42** 469-499.
- Figge, DC** 1960 Growth characteristics of human endometrium in tissue culture. *Obstet Gynecol* **16** 269-277.
- Filardo, S, M Di Pietro, G Tranquilli & R Sessa** 2019 Biofilm in Genital Ecosystem: A Potential Risk Factor for *Chlamydia trachomatis* Infection. *Can J Infect Dis Med Microbiol* **2019** 1672109.
- Fischer, C, M Drillich, S Oda, W Heuwieser, R Einspanier & C Gabler** 2010 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* **22** 818-829.

-
- Flesch, FM & BM Gadella** 2000 Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochim Biophys Acta* **1469** 197-235.
- Fortier, MA, LA Guilbault & F Grasso** 1988 Specific properties of epithelial and stromal cells from the endometrium of cows. *J Reprod Fertil* **83** 239-248.
- Frenette, G & R Sullivan** 2001 Protasome-like particles are involved in the transfer of P25b from the bovine epididymal fluid to the sperm surface. *Mol Reprod Dev* **59** 115-121.
- Gabler, C, C Fischer, M Drillich, R Einspanier & W Heuwieser** 2010 Time-dependent mRNA expression of selected pro-inflammatory factors in the endometrium of primiparous cows postpartum. *Reprod Biol Endocrinol* **8** 152.
- Gadella, BM, R Rathi, JF Brouwers, TA Stout & B Colenbrander** 2001 Capacitation and the acrosome reaction in equine sperm. *Anim Reprod Sci* **68** 249-265.
- Galvao, KN, NR Santos, JS Galvao & RO Gilbert** 2011 Association between endometritis and endometrial cytokine expression in postpartum Holstein cows. *Theriogenology* **76** 290-299.
- Garner, DL, CA Thomas, CG Gravance, CE Marshall, JM DeJarnette & CH Allen** 2001 Seminal plasma addition attenuates the dilution effect in bovine sperm. *Theriogenology* **56** 31-40.
- Gärtner, MA, A Bondzio, N Braun, M Jung, R Einspanier & C Gabler** 2015 Detection and characterisation of *Lactobacillus* spp. in the bovine uterus and their influence on bovine endometrial epithelial cells in vitro. *PLoS One* **10** e0119793.
- Gärtner, MA, S Peter, M Jung, M Drillich, R Einspanier & C Gabler** 2016 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* **28** 982-994.
- Genis, S, A Bach, F Fabregas & A Aris** 2016 Potential of lactic acid bacteria at regulating *Escherichia coli* infection and inflammation of bovine endometrium. *Theriogenology* **85** 625-637.

- Genis, S, RLA Cerri, A Bach, BF Silper, M Baylao, J Denis-Robichaud & A Aris** 2018 Pre-calving intravaginal administration of lactic acid bacteria reduces metritis prevalence and regulates blood neutrophil gene expression after calving in dairy cattle. *Front Vet Sci* **5** 135.
- Genis, S, A Sanchez-Chardi, A Bach, F Fabregas & A Aris** 2017 A combination of lactic acid bacteria regulates *Escherichia coli* infection and inflammation of the bovine endometrium. *J Dairy Sci* **100** 479-492.
- Gille, U** 2008 Harn- und Geschlechtsapparat, Apparatus urogenitalis, Anatomie für die Tiermedizin, pp. 369-401. Stuttgart: Enke Verlag.
- Givens, MD** 2018 Review: Risks of disease transmission through semen in cattle. *Animal* **12** s165-s171.
- Gloria, A, A Contri, L Wegher, G Vignola, D Dellamaria & A Carluccio** 2014 The effects of antibiotic additions to extenders on fresh and frozen-thawed bull semen. *Anim Reprod Sci* **150** 15-23.
- Gonzalez-Marin, C, R Roy, C Lopez-Fernandez, B Diez, MJ Carabano, JL Fernandez, ME Kjelland, JF Moreno & J Gosalvez** 2011 Bacteria in bovine semen can increase sperm DNA fragmentation rates: a kinetic experimental approach. *Anim Reprod Sci* **123** 139-148.
- Graham, JK & E Moce** 2005 Fertility evaluation of frozen/thawed semen. *Theriogenology* **64** 492-504.
- Guerin, B & M Thibier** 1993 Value of adding antibiotics to frozen bovine semen: the example of mycoplasmas and campylobacters. *Contracept Fertil Sex* **21** 753-759.
- Haapala, V, T Pohjanvirta, N Vahanikkila, J Halkilahti, H Simonen, S Pelkonen, T Soveri, H Simojoki & T Autio** 2018 Semen as a source of *Mycoplasma bovis* mastitis in dairy herds. *Vet Microbiol* **216** 60-66.
- Hannachi, H, H Elloumi, M Hamdoun, K Kacem, A Zhioua & O Bahri** 2018 Bacteriospermia: Effects on semen parameters. *Gynecol Obstet Fertil Senol* **46** 518-523.

-
- Hansen, PJ** 1995 Interactions between the immune system and the ruminant conceptus. *J Reprod Fertil Suppl* **49** 69-82.
- Hawk, HW** 1983 Sperm survival and transport in the female reproductive tract. *J Dairy Sci* **66** 2645-2660.
- Heinemann, MB, JF Garcia, CM Nunes, F Gregori, ZM Higa, SA Vasconcellos & LJ Richtzenhain** 2000 Detection and differentiation of *Leptospira* spp. serovars in bovine semen by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism. *Vet Microbiol* **73** 261-267.
- Herath, S, DP Fischer, D Werling, EJ Williams, ST Lilly, H Dobson, CE Bryant & IM Sheldon** 2006 Expression and function of Toll-like receptor 4 in the endometrial cells of the uterus. *Endocrinology* **147** 562-570.
- Hernandez, JD, PT Scott, RW Shephard & RA Al Jassim** 2008 The characterization of lactic acid producing bacteria from the rumen of dairy cattle grazing on improved pasture supplemented with wheat and barley grain. *J Appl Microbiol* **104** 1754-1763.
- Hirano, T, K Yasukawa, H Harada, T Taga, Y Watanabe, T Matsuda, S Kashiwamura, K Nakajima, K Koyama, A Iwamatsu & et al.** 1986 Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature* **324** 73-76.
- Hoflack, G, G Opsomer, T Rijsselaere, A Van Soom, D Maes, A de Kruif & L Duchateau** 2007 Comparison of computer-assisted sperm motility analysis parameters in semen from Belgian blue and Holstein-Friesian bulls. *Reprod Domest Anim* **42** 153-161.
- Hugentobler, S, DG Morris, MT Kane & JM Sreenan** 2004 In situ oviduct and uterine pH in cattle. *Theriogenology* **61** 1419-1427.
- Ibrahim, M, S Peter, K Wagener, M Drillich, M Ehling-Schulz, R Einspanier & C Gabler** 2017 Bovine endometrial epithelial cells scale their pro-inflammatory response in vitro to pathogenic *Trueperella pyogenes* isolated from the bovine uterus in a strain-specific manner. *Front Cell Infect Microbiol* **7** 264.
- Ishikawa, Y, K Nakada, K Hagiwara, R Kirisawa, H Iwai, M Moriyoshi & Y Sawamukai** 2004 Changes in interleukin-6 concentration in peripheral blood of pre- and post-

- partum dairy cattle and its relationship to postpartum reproductive diseases. *J Vet Med Sci* **66** 1403-1408.
- Islam, R, H Kumar, G Singh, BB Krishnan & S Dey** 2017 Depressed polymorphonuclear cell functions in periparturient cows that develop postpartum reproductive diseases. *Vet Res Commun* **41** 201-209.
- Jabbour, HN, KJ Sales, RD Catalano & JE Norman** 2009 Inflammatory pathways in female reproductive health and disease. *Reproduction* **138** 903-919.
- Jansen, S, M Ekhlasi-Hundrieser & E Topfer-Petersen** 2001 Sperm adhesion molecules: structure and function. *Cells Tissues Organs* **168** 82-92.
- Johansson, M, JJ Bromfield, MJ Jasper & SA Robertson** 2004 Semen activates the female immune response during early pregnancy in mice. *Immunology* **112** 290-300.
- Juyena, NS & C Stelletta** 2012 Seminal plasma: an essential attribute to spermatozoa. *J Androl* **33** 536-551.
- Kaeberlein, T, K Lewis & SS Epstein** 2002 Isolating "uncultivable" microorganisms in pure culture in a simulated natural environment. *Science* **296** 1127-1129.
- Kaufmann, TB, M Drillich, BA Tenhagen, D Forderung & W Heuwieser** 2009 Prevalence of bovine subclinical endometritis 4h after insemination and its effects on first service conception rate. *Theriogenology* **71** 385-391.
- Khan, H, SH Flint & PL Yu** 2013 Determination of the mode of action of enterolysin A, produced by *Enterococcus faecalis* B9510. *J Appl Microbiol* **115** 484-494.
- Kilburn, C, DJ Rooks, AJ McCarthy & RD Murray** 2013 Antimicrobial resistance in some gram-negative bacteria isolated from the bovine ejaculate. *Reprod Domest Anim* **48** 525-528.
- Killian, GJ, DA Chapman & LA Rogowski** 1993 Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. *Biol Reprod* **49** 1202-1207.
- Kim, SY & Y Adachi** 2007 Biological and genetic classification of canine intestinal lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Microbiol Immunol* **51** 919-928.

-
- Kishimoto, T, S Akira, M Narazaki & T Taga** 1995 Interleukin-6 family of cytokines and gp130. *Blood* **86** 1243-1254.
- Kniss, DA** 1999 Cyclooxygenases in reproductive medicine and biology. *J Soc Gynecol Investig* **6** 285-292.
- Kohli, P & BD Levy** 2009 Resolvins and protectins: mediating solutions to inflammation. *Br J Pharmacol* **158** 960-971.
- Konnai, S, T Usui, K Ohashi & M Onuma** 2003 The rapid quantitative analysis of bovine cytokine genes by real-time RT-PCR. *Vet Microbiol* **94** 283-294.
- Koutsoumanis, K** 2019 Update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 10: Suitability of taxonomic units notified to EFSA until March 2019. In EPoBH (BIOHAZ) (ed.). EFSA Journal.
- Kovachev, S** 2018 Defence factors of vaginal lactobacilli. *Crit Rev Microbiol* **44** 31-39.
- Kummer, V, P Lany, J Maskova, Z Zraly & J Canderle** 1997 Stimulation of cell defense mechanism of bovine endometrium by temporal colonization with selected strains of lactobacilli. *Vet Med (Praha)* **42** 217-224.
- Kurykin, J, U Jaakma, L Majas, M Jalakas, M Aidnik, A Waldmann & P Padrik** 2003 Fixed time deep intracornual insemination of heifers at synchronized estrus. *Theriogenology* **60** 1261-1268.
- Larsson, B** 1988 Distribution of spermatozoa in the genital tract of heifers inseminated with large numbers of abnormal spermatozoa. *Zentralbl Veterinarmed A* **35** 721-728.
- LeBlanc, SJ** 2012 Interactions of metabolism, inflammation, and reproductive tract health in the postpartum period in dairy cattle. *Reprod Domest Anim* **47 Suppl 5** 18-30.
- Liebich, H-G** 2004 Funktionelle Histologie der Haussäugetiere: Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis, pp. 295-320. Schattauer Verlag.
- Lim, H, BC Paria, SK Das, JE Dinchuk, R Langenbach, JM Trzaskos & SK Dey** 1997 Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase 2-deficient mice. *Cell* **91** 197-208.

- Lima-Verde, IB, A Johannisson, T Ntallaris, E Al-Essawe, Z Al-Kass, T Nongbua, F Dorea, N Lundeheim, K Kupisiewicz, A Edman & JM Morrell** 2018 Effect of freezing bull semen in two non-egg yolk extenders on post-thaw sperm quality. *Reprod Domest Anim* **53** 127-136.
- Liu, M, Q Wu, M Wang, Y Fu & J Wang** 2016 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* **39** 1483-1494.
- London, LE, NP Price, P Ryan, L Wang, MA Auty, GF Fitzgerald, C Stanton & RP Ross** 2014 Characterization of a bovine isolate Lactobacillus mucosae DPC 6426 which produces an exopolysaccharide composed predominantly of mannose residues. *J Appl Microbiol* **117** 509-517.
- Ludwig, W, KH Schleifer & WB Whitman** 2009 Volume 3: The Firmicutes, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, second edition, pp. 464-722. Springer.
- MacKintosh, SB, LP Serino, PD Iddon, R Brown, RS Conlan, CJ Wright, TG Maffeis, MJ Raxworthy & IM Sheldon** 2015 A three-dimensional model of primary bovine endometrium using an electrospun scaffold. *Biofabrication* **7** 025010.
- Malama, E, Y Zeron, F Janett, M Siuda, Z Roth & H Bollwein** 2017 Use of computer-assisted sperm analysis and flow cytometry to detect seasonal variations of bovine semen quality. *Theriogenology* **87** 79-90.
- Mandar, R, M Punab, P Korrovits, S Turk, K Ausmees, E Lapp, JK Preem, K Oopkaup, A Salumets & J Truu** 2017 Seminal microbiome in men with and without prostatitis. *Int J Urol* **24** 211-216.
- Mann, T** 1954 The biochemistry of semen. In Uo Cambridge (ed.), The biochemistry of semen, pp. 240 pp. London: London : Methuen & Co. Ltd. ; New York : John Wiley & Sons, Inc.
- Maxwell, WM, SP de Graaf, H Ghaoui Rel & G Evans** 2007 Seminal plasma effects on sperm handling and female fertility. *Soc Reprod Fertil Suppl* **64** 13-38.

-
- Meena, GS, VS Raina, AK Gupta, TK Mohanty, M Bhakat, M Abdullah & R Bishist** 2015 Effect of preputial washing on bacterial load and preservability of semen in Murrah buffalo bulls. *Vet World* **8** 798-803.
- Melian, C, F Segli, R Gonzalez, G Vignolo & P Castellano** 2019 Lactocin AL705 as quorum sensing inhibitor to control *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *J Appl Microbiol* **127** 911-920.
- Messier, S, R Higgins, Y Couture & M Morin** 1984 Comparison of swabbing and biopsy for studying the flora of the bovine uterus. *Can Vet J* **25** 283-288.
- Michelmann, HW, D Rath, E Topfer-Petersen & P Schwartz** 2007 Structural and functional events on the porcine zona pellucida during maturation, fertilization and embryonic development: a scanning electron microscopy analysis. *Reprod Domest Anim* **42** 594-602.
- Michi, AN, PH Favetto, J Kastelic & ER Cobo** 2016 A review of sexually transmitted bovine trichomoniasis and campylobacteriosis affecting cattle reproductive health. *Theriogenology* **85** 781-791.
- Miller, AN, EJ Williams, K Sibley, S Herath, EA Lane, J Fishwick, DM Nash, AN Rycroft, H Dobson, CE Bryant & IM Sheldon** 2007 The effects of *Arcanobacterium pyogenes* on endometrial function in vitro, and on uterine and ovarian function in vivo. *Theriogenology* **68** 972-980.
- Mokoena, MP** 2017 Lactic acid bacteria and their bacteriocins: classification, biosynthesis and applications against uropathogens: A Mini-Review. *Molecules* **22**.
- Monaco, C, E Andreakos, S Young, M Feldmann & E Paleolog** 2002 T cell-mediated signaling to vascular endothelium: induction of cytokines, chemokines, and tissue factor. *J Leukoc Biol* **71** 659-668.
- Moser, B & K Willimann** 2004 Chemokines: role in inflammation and immune surveillance. *Ann Rheum Dis* **63 Suppl 2** ii84-ii89.
- Murphy, C, AG Fahey, A Shafat & S Fair** 2013 Reducing sperm concentration is critical to limiting the oxidative stress challenge in liquid bull semen. *J Dairy Sci* **96** 4447-4454.

- Murphy, C, SA Holden, EM Murphy, AR Cromie, P Lonergan & S Fair** 2015 The impact of storage temperature and sperm number on the fertility of liquid-stored bull semen. *Reprod Fertil Dev.*
- Murphy, EM, AK Kelly, C O'Meara, B Eivers, P Lonergan & S Fair** 2018 Influence of bull age, ejaculate number, and season of collection on semen production and sperm motility parameters in Holstein Friesian bulls in a commercial artificial insemination centre. *J Anim Sci* **96** 2408-2418.
- Murphy, SP, NN Hanna, LD Fast, SK Shaw, G Berg, JF Padbury, R Romero & S Sharma** 2009 Evidence for participation of uterine natural killer cells in the mechanisms responsible for spontaneous preterm labor and delivery. *Am J Obstet Gynecol* **200** 308.e301-309.
- Nardi Junior, G, J Megid, LA Mathias, L Paulin, AF Vicente, A Cortez, FJP Listoni, GHB Lara, RG Motta, MGM Chacur, FM Monteiro & MG Ribeiro** 2017 Performance of microbiological, serological, molecular, and modified seminal plasma methods in the diagnosis of *Brucella abortus* in semen and serum of bovine bulls. *Biologicals* **48** 6-9.
- Nauc, V & P Manjunath** 2000 Radioimmunoassays for bull seminal plasma proteins (BSP-A1/-A2, BSP-A3, and BSP-30-Kilodaltons), and their quantification in seminal plasma and sperm. *Biol Reprod* **63** 1058-1066.
- Noah, JW, MA Dolan, P Babin & P Wollenzien** 1999 Effects of tetracycline and spectinomycin on the tertiary structure of ribosomal RNA in the *Escherichia coli* 30 S ribosomal subunit. *J Biol Chem* **274** 16576-16581.
- Nongbua, T, Y Guo, A Edman, P Humblot & JM Morrell** 2018 Effect of bovine seminal plasma on bovine endometrial epithelial cells in culture. *Reprod Domest Anim* **53** 85-92.
- Oda, S, C Gabler, C Holder & R Einspanier** 2006 Differential expression of cyclooxygenase 1 and cyclooxygenase 2 in the bovine oviduct. *J Endocrinol* **191** 263-274.
- Odhiambo, JF, DH Poole, L Hughes, JM Dejarnette, EK Inskeep & RA Dailey** 2009 Pregnancy outcome in dairy and beef cattle after artificial insemination and treatment with seminal plasma or transforming growth factor beta-1. *Theriogenology* **72** 566-571.

-
- Papizadeh, M, M Rohani, H Nahrevanian, A Javadi & MR Pourshafie** 2017 Probiotic characters of Bifidobacterium and Lactobacillus are a result of the ongoing gene acquisition and genome minimization evolutionary trends. *Microb Pathog* **111** 118-131.
- Parks, JE & JK Graham** 1992 Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology* **38** 209-222.
- Peter, S, MA Gartner, G Michel, M Ibrahim, R Klopfleisch, A Lubke-Becker, M Jung, R Einspanier & C Gabler** 2018 Influence of intrauterine administration of Lactobacillus buchneri on reproductive performance and pro-inflammatory endometrial mRNA expression of cows with subclinical endometritis. *Sci Rep* **8** 5473.
- Peter, S, G Michel, A Hahn, M Ibrahim, A Lubke-Becker, M Jung, R Einspanier & C Gabler** 2015 Puerperal influence of bovine uterine health status on the mRNA expression of pro-inflammatory factors. *J Physiol Pharmacol* **66** 449-462.
- Piehler, E, AM Petrunkina, M Ekhlesi-Hundrieser & E Topfer-Petersen** 2006 Dynamic quantification of the tyrosine phosphorylation of the sperm surface proteins during capacitation. *Cytometry A* **69** 1062-1070.
- Polge, C, AU Smith & AS Parkes** 1949 Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature* **164** 666.
- Prunner, I, H Pothmann, K Wagener, M Giuliadori, J Huber, M Ehling-Schulz & M Drillich** 2014 Dynamics of bacteriologic and cytologic changes in the uterus of postpartum dairy cows. *Theriogenology* **82** 1316-1322.
- Ramadori, G & B Christ** 1999 Cytokines and the hepatic acute-phase response. *Semin Liver Dis* **19** 141-155.
- Ramsay, RG, D Ciznadija, M Vanevski & T Mantamadiotis** 2003 Transcriptional regulation of cyclo-oxygenase expression: three pillars of control. *Int J Immunopathol Pharmacol* **16** 59-67.
- Rath, D, G Moench-Tegeder, U Taylor & LA Johnson** 2009 Improved quality of sex-sorted sperm: a prerequisite for wider commercial application. *Theriogenology* **71** 22-29.

- Rejraji, H, B Sion, G Prensier, M Carreras, C Motta, JM Frenoux, E Vericel, G Grizard, P Vernet & JR Drevet** 2006 Lipid remodeling of murine epididymosomes and spermatozoa during epididymal maturation. *Biol Reprod* **74** 1104-1113.
- Robertson, SA** 2000 Control of the immunological environment of the uterus. *Rev Reprod* **5** 164-174.
- Rodriguez, C, JV Cofre, M Sanchez, P Fernandez, G Boggiano & E Castro** 2011 Lactobacilli isolated from vaginal vault of dairy and meat cows during progesteronic stage of estrous cycle. *Anaerobe* **17** 15-18.
- Rodriguez-Martinez, H** 2003 Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia? *Reprod Domest Anim* **38** 312-318.
- Rodriguez-Palacios, A, HR Staempfli, T Duffield & JS Weese** 2009 Isolation of bovine intestinal *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus acidilactici* with inhibitory activity against *Escherichia coli* O157 and F5. *J Appl Microbiol* **106** 393-401.
- Romagnani, P, L Lasagni, F Annunziato, M Serio & S Romagnani** 2004 CXC chemokines: the regulatory link between inflammation and angiogenesis. *Trends Immunol* **25** 201-209.
- Rose, WA, 2nd, CL McGowin, RA Spagnuolo, TD Eaves-Pyles, VL Popov & RB Pyles** 2012 Commensal bacteria modulate innate immune responses of vaginal epithelial cell multilayer cultures. *PLoS One* **7** e32728.
- Saacke, RG, JM DeJarnette, JH Bame, DS Karabinus & SS Whitman** 1998 Can spermatozoa with abnormal heads gain access to the ovum in artificially inseminated super- and single-ovulating cattle? *Theriogenology* **50** 117-128.
- Salveti, E, M Fondi, R Fani, S Torriani & GE Felis** 2013 Evolution of lactic acid bacteria in the order Lactobacillales as depicted by analysis of glycolysis and pentose phosphate pathways. *Syst Appl Microbiol* **36** 291-305.
- Sannat, C, A Nair, SB Sahu, SA Sahasrabudhe, A Kumar, AK Gupta & RK Shende** 2015 Effect of species, breed, and age on bacterial load in bovine and bubaline semen. *Vet World* **8** 461-466.

-
- Santos, TM & RC Bicalho** 2012 Diversity and succession of bacterial communities in the uterine fluid of postpartum metritic, endometritic and healthy dairy cows. *PLoS One* **7** e53048.
- Saut, JP, GD Healey, AM Borges & IM Sheldon** 2014 Ovarian steroids do not affect bovine endometrial cytokine or chemokine responses to *Escherichia coli* or LPS in vitro. *Reproduction* **148** 593-606.
- Schmidt, D** 2000 Bullensperma. Seminalplasma. In D Schmidt (ed.), E. Wiesner u. R. Ribbeck (Hrsg.) Lexikon der Veterinärmedizin. 4. Auflage, pp. S. 225, 1327. Stuttgart: Enke im Hippokrates Verlag, Stuttgart.
- Schulze, M, J Schafer, C Simmet, M Jung & C Gabler** 2018 Detection and characterization of *Lactobacillus* spp. in the porcine seminal plasma and their influence on boar semen quality. *PLoS One* **13** e0202699.
- Seidel, GE, Jr.** 2014 Update on sexed semen technology in cattle. *Animal* **8 Suppl 1** 160-164.
- Sens, A & W Heuwieser** 2013 Presence of *Escherichia coli*, *Trueperella pyogenes*, alpha-hemolytic streptococci, and coagulase-negative staphylococci and prevalence of subclinical endometritis. *J Dairy Sci* **96** 6347-6354.
- Sheldon, IM, J Cronin, L Goetze, G Donofrio & HJ Schuberth** 2009 Defining postpartum uterine disease and the mechanisms of infection and immunity in the female reproductive tract in cattle. *Biol Reprod* **81** 1025-1032.
- Sheldon, IM, JG Cronin & JJ Bromfield** 2019 Tolerance and innate immunity shape the development of postpartum uterine disease and the impact of endometritis in dairy cattle. *Annu Rev Anim Biosci* **7** 361-384.
- Sheldon, IM, JG Cronin, GD Healey, C Gabler, W Heuwieser, D Strey, JJ Bromfield, A Miyamoto, C Fergani & H Dobson** 2014 Innate immunity and inflammation of the bovine female reproductive tract in health and disease. *Reproduction* **148** R41-51.
- Sheldon, IM & H Dobson** 2004 Postpartum uterine health in cattle. *Anim Reprod Sci* **82-83** 295-306.

- Sheldon, IM, DE Noakes, AN Rycroft, DU Pfeiffer & H Dobson** 2002 Influence of uterine bacterial contamination after parturition on ovarian dominant follicle selection and follicle growth and function in cattle. *Reproduction* **123** 837-845.
- Sheldon, IM, AN Rycroft, B Dogan, M Craven, JJ Bromfield, A Chandler, MH Roberts, SB Price, RO Gilbert & KW Simpson** 2010 Specific strains of *Escherichia coli* are pathogenic for the endometrium of cattle and cause pelvic inflammatory disease in cattle and mice. *PLoS One* **5** e9192.
- Shin, SJ, DH Lein, VH Patten & HL Ruhnke** 1988 A new antibiotic combination for frozen bovine semen 1. Control of Mycoplasmas, Ureaplasmas, *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* and *Haemophilus somnus*. *Theriogenology* **29** 577-591.
- Shum, WW, YC Ruan, N Da Silva & S Breton** 2011 Establishment of cell-cell cross talk in the epididymis: control of luminal acidification. *J Androl* **32** 576-586.
- Silva, N, A Solana & JM Castro** 2000 Inactivation of bovine herpesvirus 1 in semen using a hyperimmune egg yolk semen extender. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* **47** 69-75.
- Simmons, DL, RM Botting & T Hla** 2004 Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol Rev* **56** 387-437.
- Snoj, T, S Kobal & G Majdic** 2013 Effects of season, age, and breed on semen characteristics in different *Bos taurus* breeds in a 31-year retrospective study. *Theriogenology* **79** 847-852.
- Spinaci, M, C Vallorani, D Bucci, C Bernardini, C Tamanini, E Seren & G Galeati** 2010 Effect of liquid storage on sorted boar spermatozoa. *Theriogenology* **74** 741-748.
- Spizek, J & T Rezanka** 2017 Lincosamides: Chemical structure, biosynthesis, mechanism of action, resistance, and applications. *Biochem Pharmacol* **133** 20-28.
- Stassi, AF, ME Baravalle, EM Belotti, F Rey, NC Gareis, PU Diaz, FM Rodriguez, CJ Leiva, HH Ortega & NR Salvetti** 2017 Altered expression of cytokines IL-1alpha, IL-6, IL-8 and TNF-alpha in bovine follicular persistence. *Theriogenology* **97** 104-112.

-
- Suarez, SS** 2002 Formation of a reservoir of sperm in the oviduct. *Reprod Domest Anim* **37** 140-143.
- Suarez, SS** 2007 Interactions of spermatozoa with the female reproductive tract: inspiration for assisted reproduction. *Reprod Fertil Dev* **19** 103-110.
- Swartz, JD, M Lachman, K Westveer, T O'Neill, T Geary, RW Kott, JG Berardinelli, PG Hatfield, JM Thomson, A Roberts & CJ Yeoman** 2014 Characterization of the vaginal microbiota of ewes and cows reveals a unique microbiota with low levels of lactobacilli and near-neutral pH. *Front Vet Sci* **1** 19.
- Tachedjian, G, M Aldunate, CS Bradshaw & RA Cone** 2017 The role of lactic acid production by probiotic *Lactobacillus* species in vaginal health. *Res Microbiol* **168** 782-792.
- Talevi, R & R Gualtieri** 2010 Molecules involved in sperm-oviduct adhesion and release. *Theriogenology* **73** 796-801.
- Tanabe, T & N Tohno** 2002 Cyclooxygenase isozymes and their gene structures and expression. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **68-69** 95-114.
- Tanghe, S, G Vanroose, A Van Soom, L Duchateau, MT Ysebaert, P Kerkhofs, E Thiry, S van Drunen Littel-van den Hurk, P Van Oostveldt & H Nauwynck** 2005 Inhibition of bovine sperm-zona binding by bovine herpesvirus-1. *Reproduction* **130** 251-259.
- Tatman, SR, DA Neuendorff, TW Wilson & RD Randel** 2004 Influence of season of birth on growth and reproductive development of Brahman bulls. *Theriogenology* **62** 93-102.
- Tecchio, C, A Micheletti & MA Cassatella** 2014 Neutrophil-derived cytokines: facts beyond expression. *Front Immunol* **5** 508.
- Triplett, MD, HM Parker, CD McDaniel & AS Kiess** 2016 Influence of 6 different intestinal bacteria on Beltsville Small White turkey semen. *Poult Sci* **95** 1918-1926.
- Turner, ML, JG Cronin, GD Healey & IM Sheldon** 2014 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* **155** 1453-1465.

- Valcarce, DG, S Genoves, MF Riesco, P Martorell, MP Herraez, D Ramon & V Robles** 2017 Probiotic administration improves sperm quality in asthenozoospermic human donors. *Benef Microbes* **8** 193-206.
- van den Engh, G & W Stokdijk** 1989 Parallel processing data acquisition system for multilaser flow cytometry and cell sorting. *Cytometry* **10** 282-293.
- Vandesompele, J, K De Preter, F Pattyn, B Poppe, N Van Roy, A De Paepe & F Speleman** 2002 Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* **3** RESEARCH0034.
- Verberckmoes, S, A Van Soom & A de Kruif** 2004a Intra-uterine insemination in farm animals and humans. *Reprod Domest Anim* **39** 195-204.
- Verberckmoes, S, A Van Soom, I De Pauw, J Dewulf, C Vervaeet & A de Kruif** 2004b Assessment of a new utero-tubal junction insemination device in dairy cattle. *Theriogenology* **61** 103-115.
- Verberckmoes, S, A Van Soom, J Dewulf & A de Kruif** 2005 Comparison of three diluents for the storage of fresh bovine semen. *Theriogenology* **63** 912-922.
- Verstegen, J, M Iguer-Ouada & K Onclin** 2002 Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology* **57** 149-179.
- Vince, S, I Zura Zaja, M Samardzija, I Majic Balic, M Vilic, D Duricic, H Valpotic, F Markovic & S Milinkovic-Tur** 2018 Age-related differences of semen quality, seminal plasma, and spermatozoa antioxidative and oxidative stress variables in bulls during cold and warm periods of the year. *Animal* **12** 559-568.
- Vishwanath, R** 2003 Artificial insemination: the state of the art. *Theriogenology* **59** 571-584.
- Vishwanath, R & P Shannon** 2000 Storage of bovine semen in liquid and frozen state. *Anim Reprod Sci* **62** 23-53.
- Visser, IJ, EA ter Laak & HB Jansen** 1999 Failure of antibiotics gentamycin, tylosin, lincomycin and spectinomycin to eliminate *Mycoplasma bovis* in artificially infected frozen bovine semen. *Theriogenology* **51** 689-697.

-
- Wagener, K, H Pothmann, I Prunner, S Peter, R Erber, C Aurich, M Drillich & C Gabler** 2017 Endometrial mRNA expression of selected pro-inflammatory factors and mucins in repeat breeder cows with and without subclinical endometritis. *Theriogenology* **90** 237-244.
- Wang, Y, BN Ametaj, DJ Ambrose & MG Ganzle** 2013 Characterisation of the bacterial microbiota of the vagina of dairy cows and isolation of pediocin-producing *Pediococcus acidilactici*. *BMC Microbiol* **13** 19.
- Weisburg, WG, SM Barns, DA Pelletier & DJ Lane** 1991 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol* **173** 697-703.
- Weng, SL, CM Chiu, FM Lin, WC Huang, C Liang, T Yang, TL Yang, CY Liu, WY Wu, YA Chang, TH Chang & HD Huang** 2014 Bacterial communities in semen from men of infertile couples: metagenomic sequencing reveals relationships of seminal microbiota to semen quality. *PLoS One* **9** e110152.
- Wooding, FB** 1992 Current topic: the synepitheliochorial placenta of ruminants: binucleate cell fusions and hormone production. *Placenta* **13** 101-113.
- Wrathall, AE, HA Simmons & A Van Soom** 2006 Evaluation of risks of viral transmission to recipients of bovine embryos arising from fertilisation with virus-infected semen. *Theriogenology* **65** 247-274.
- Zerbe, H, HJ Schuberth, F Engelke, J Frank, E Klug & W Leibold** 2003 Development and comparison of in vivo and in vitro models for endometritis in cows and mares. *Theriogenology* **60** 209-223.
- Zhang, Y & PV Vadlani** 2015 Lactic acid production from biomass-derived sugars via co-fermentation of *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus plantarum*. *J Biosci Bioeng* **119** 694-699.

11 Publikationsverzeichnis

Tagungsvorträge:

1.) F. Westerkamp, M. Ibrahim, D. Scheibner, J. Osmers, C. Gabler

Titel: "Detection of Lactobacillales spp. in the bovine seminal plasma and their influence on endometrial epithelial cells *in vitro*"

International Conference „Endometritis as a Cause of Infertility in Domestic Animals“, 11.- 12. September 2017; Olsztyn, Polen

2.) F. Westerkamp, M. Ibrahim, S. Peter, M. Jung, D. Scheibner, J. Osmers, C. Gabler

Titel: "Detection of Lactobacillales spp. in the bovine uterus and seminal plasma and their influence on endometrial epithelial cells *in vitro*"

51. Jahrestagung „Physiologie & Pathologie der Fortpflanzung“ der deutschen veterinärmedizinischen Gesellschaft, 21.- 23. Februar 2018; Hannover

3.) F. Westerkamp, J. Osmers, C. Hermann, M. Jung, C. Gabler

Titel: "Isolation of lactic acid bacteria from the bovine male genital tract and their influence on endometrial cells and spermatozoa *in vitro*"

53. Jahrestagung „Physiologie & Pathologie der Fortpflanzung“ der deutschen veterinärmedizinischen Gesellschaft, 26.- 28. Februar 2020; Rostock

12 Danksagung

Mein besonderer Dank geht an Herrn PD Dr. Gabler für die Überlassung des Themas und für die gesamte wissenschaftliche Betreuung. Ohne seine ständige Hilfsbereitschaft und konstruktive Kritik wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Er war stets ansprechbar und half rund um die Uhr bei fachlichen und privaten Problemen. Vielen Dank!

Ein großes Dankeschön geht auch an Herrn Prof. Dr. Dr. Einspanier für das Stellen der Räumlichkeiten und die konstruktive Kritik.

Bei Christoph Holder bedanke ich mich besonders für die Hilfe und Mitarbeit im Labor während der gesamten Arbeit. Er hat mich die ganze Zeit unterstützt und mir die molekularbiologischen Techniken beigebracht. Die Versuche hätten ohne ihn nicht funktioniert.

Bei Frau Dr. Claudia Herrmann und Maren Hürland vom Institut für Fortpflanzung landwirtschaftlicher Nutztiere Schönnow bedanke ich mich für die Unterstützung bei einigen Untersuchungen.

Bei der RBB Rinderproduktion Berlin-Brandenburg und vor allem Herrn Dr. Osmers bedanke ich mich für die Bereitstellung der Proben, des Arbeitsplatzes und die Beratung.

Mein Dank geht auch an die freundlichen Mitarbeiter des Schlachthofs Teterow (Danish Crown GmbH) für die stets gute Zusammenarbeit bei der Entnahme von Probenmaterial.

Natürlich bedanke ich mich auch besonders beim Förderverein Bioökonomieforschung e.V. für die finanzielle Unterstützung dieser Studie.

13 Finanzierungsquellen

Die Studie wurde finanziell unterstützt durch den Förderverein Bioökonomieforschung e.V. (FBF).

Es besteht kein Interessenskonflikt durch die finanzielle Unterstützung der Studie.

14 Selbständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, Felix Westerkamp, die vorliegende Arbeit selbständig und nur auf der Grundlage der angegebenen Hilfsmittel und Literaturstellen verfasst zu haben.

Berlin, den 04.06.2020

Felix Westerkamp



mbvberlin mensch und buch verlag

49,90 Euro | ISBN: 978-3-96729-053-0