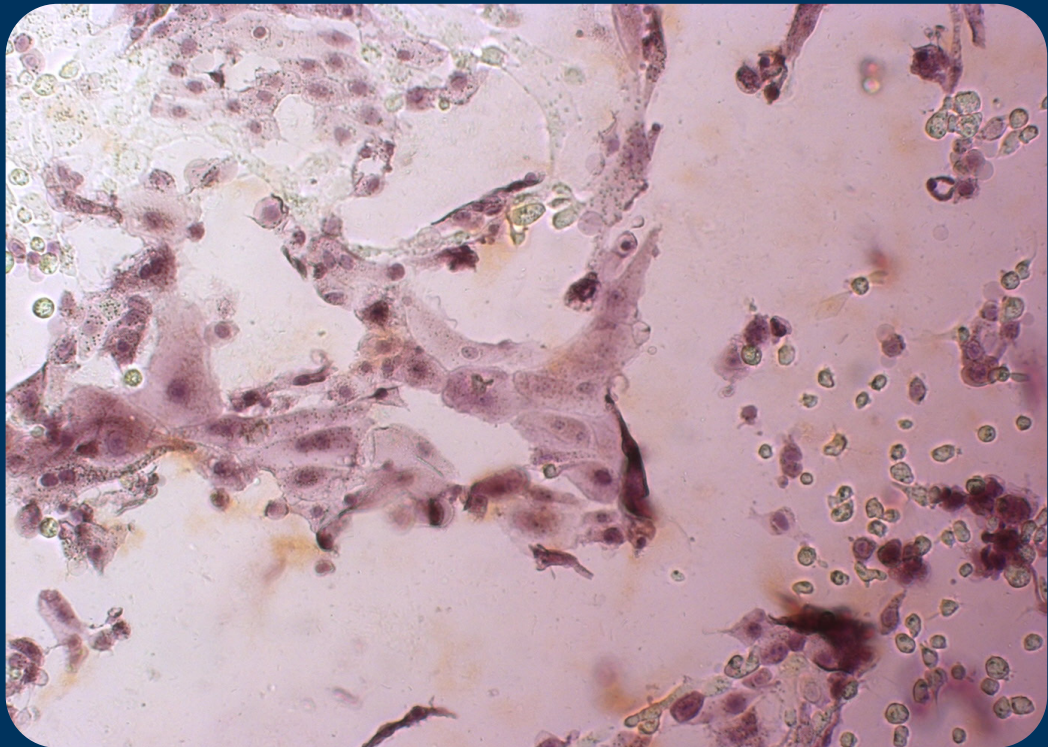


Aus dem Institut für Veterinär-Biochemie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**Untersuchung des Einflusses
von autochthonen potentiell pathogenen Bakterien
und Laktobazillen auf bovine Endometriumszellen *in vitro***



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

vorgelegt von
Martina Anna Gärtner
geb. Bittel

Tierärztin
aus Wertheim

Berlin 2019
Journal-Nr.: 4150

Bibliografische Informationen der Deutschen Bibliothek

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

© 2020 by Verlag:

Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH, Gießen
Printed in Germany

Fotos Umschlag:

M. Gärtner

ISBN 978-3-86345-550-7

1. Auflage 2020

Verlag:

DVG Service GmbH
Friedrichstraße 17
35392 Gießen
Tel.: 0641/24466
info@dvj.de
www.dvj.de

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

**Untersuchung des Einflusses
von autochthonen potentiell pathogenen Bakterien
und Laktobazillen auf bovine Endometriumszellen *in vitro***

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

vorgelegt von
Martina Anna Gärtner
geb. Bittel
Tierärztin
aus Wertheim

Berlin 2019
Journal-Nr.: 4150

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereichs Veterinärmedizin
Freie Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter: PD Dr. Christoph Gabler
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Johannes Handler
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Susanne Hartmann

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

dairy cows, uterus, endometritis, reproduction, lactobacillus, lactic acid bacteria,
staphylococcus succinus, bacillus pumilus, inflammation, epithelium, uterine tissue,
polymerase chain reaction, ELISA

Tag der Promotion: 19.12.2019

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Literatur	2
2.1	Der bovine Uterus	2
2.2	Erkrankungen des Uterus.....	2
2.2.1	Akute, puerperale Metritis und klinische Metritis.....	3
2.2.2	Chronische Endometritis	4
2.2.3	Subklinische Endometritis	5
2.3	Die Mikrobiota im weiblichen Genitaltrakt.....	6
2.3.1	<i>Bacillus pumilus</i>	9
2.3.2	<i>Lactobacillus</i> Spezies.....	9
2.4	Die angeborene Immunität des bovinen Uterus.....	11
2.4.1	Toll-like-Rezeptoren	11
2.4.2	Interleukin 1 alpha.....	13
2.4.3	Interleukin 6	14
2.4.4	CXC-Chemokin-Liganden 1 - 3 und CXC-Chemokinrezeptor 2	15
2.4.5	Interleukin 8 / CXC-Chemokin-Ligand 8	16
2.4.6	Prostaglandin E ₂ und Prostaglandin F _{2α}	17
2.4.7	Prostaglandin-Endoperoxid-Synthase 2	19
2.5	Zielsetzung.....	21
3	Darstellung der veröffentlichten Arbeiten	22
3.1	Increased mRNA expression of selected pro-inflammatory factors in inflamed bovine endometrium <i>in vivo</i> as well as in endometrial epithelial cells exposed to <i>Bacillus pumilus in vitro</i>	23
3.2	Detection and characterisation of <i>Lactobacillus</i> spp. in the bovine uterus and their influence on bovine endometrial epithelial cells <i>in vitro</i>	54
4	Diskussion.....	77
4.1	Die Mikrobiota im bovinen Genitaltrakt	77
4.1.1	Potentiell pathogene Bakterien.....	77
4.1.2	Kommensale Bakterien	78
4.1.3	Laktobazillen und ihr Einsatz in der Reproduktion	79
4.1.4	Pathogene, potentiell pathogene und kommensale uterine Bakterien im Vergleich	82

4.2	Entzündungsmediatoren im bovinen Uterus	83
4.2.1	Toll-like-Rezeptoren	83
4.2.2	Interleukin 1 alpha	84
4.2.3	Interleukin 6	86
4.2.4	Interleukin 8	86
4.2.5	CXC-Chemokin-Liganden 1 - 3	88
4.2.6	Prostaglandin E ₂ und F _{2α}	89
4.3	Schlussfolgerung und Ausblick	90
5	Zusammenfassung	91
6	Summary	93
7	Literaturverzeichnis	95
8	Publikationsverzeichnis	115
9	Danksagung	117
10	Finanzierungsquellen	118
11	Selbstständigkeitserklärung	119

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
-	Negativ
+	Positiv
%	Prozent
AMP	Antimikrobielle Peptide
<i>B.</i>	<i>Bacillus</i>
B-Zellen	B-Lymphozyten
Ca ²⁺	Calciumion
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CXCL	CXC-Chemokin-Ligand
CXCR	CXC-Chemokin-Rezeptor
DEFB	Beta-Defensin
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EIA	Enzymimmunoassay (enzyme immunoassay)
ELISA	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (enzyme-linked immunosorbent assay)
ELR	Glutaminsäure - Leucin - Arginin
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor (epidermal growth factor)
ELR ⁺	ELR-Motiv vorhanden
ELR ⁻	ELR-Motiv nicht vorhanden
EP	PGE ₂ -Rezeptor
FP	PGF _{2α} -Rezeptor
G-Protein	Guanosintriphosphat-bindendes Protein
IL	Interleukin
IL1A	Interleukin 1 alpha
IL1B	Interleukin 1 beta
IL1R	Interleukin 1-Rezeptor
IL1RI	IL1-Rezeptor Typ I
IL1RN	IL1-Rezeptorantagonist
IL6	Interleukin 6
IL6R	IL6-Rezeptor
IL8	Interleukin 8

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

KBE	Koloniebildende Einheiten
kDa	Kilodalton
<i>L.</i>	<i>Lactobacillus</i>
LPS	Lipopolysaccharid
mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)
MOI	Multiplizität der Infektion (multiplicity of infection)
<i>P.</i>	<i>Pediococcus</i>
PAMPs	Pathogen-assoziierte molekulare Muster (pathogen-associated molecular patterns)
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (peripheral blood mononuclear cells)
PGD ₂	Prostaglandin D ₂
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PGF _{2α}	Prostaglandin F _{2α}
PGG ₂	Prostaglandin G ₂
PGH ₂	Prostaglandin H ₂
PGI ₂	Prostaglandin I ₂
PMN	Polymorphkernige neutrophile Granulozyten
PTGS	Prostaglandin-Endoperoxid-Synthase
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
rRNA	Ribosomale RNA
RT-qPCR	Reverse Transkription - quantitative Polymerasekettenreaktion (quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction)
S100A	S100-Calcium-bindendes Protein
Th17-Zellen	Typ17-T-Helferzellen
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF	Tumor Nekrose Faktor alpha
<i>T. pyogenes</i>	<i>Trueperella pyogenes</i>
T-Zellen	T-Lymphozyten
<i>W. paramesenteroides</i>	<i>Weissella paramesenteroides</i>

1 Einleitung

Die Milchindustrie spielt in vielen Industrie- und Entwicklungsländern eine wichtige wirtschaftliche Rolle im Agrarsektor. Die Weltmilchproduktion ist von 466 Millionen Tonnen im Jahr 1980 um mehr als 75 Prozent (%) auf fast 827 Millionen Tonnen im Jahr 2018 angewachsen (FAO 2018). Dies konnte unter anderem dadurch erreicht werden, dass die Milchproduktion pro Kuh durch Verbesserungen im Management und Futter sowie durch Genselektion in den letzten Jahrzehnten stetig erhöht wurde (Lucy 2001). Aber mit dem Anstieg der Milchproduktion pro Kuh ist in den letzten Jahrzehnten eine sinkende Fertilität feststellbar (Dillon *et al.* 2006; Macdonald *et al.* 2008;). Fertilitätsprobleme bei Hochleistungsmilchkühen werden durch verschiedene Faktoren ausgelöst. Einer der Hauptgründe ist die Entzündung des Uterus (Lucy 2001; Walsh *et al.* 2011).

Nach dem Kalben findet bei fast jeder Kuh eine Bakterieneinwanderung in den Uterus über die geöffnete Zervix statt und resultiert oft in einer Entzündung des Endometriums, die sich klinisch als akute puerperale oder klinische Metritis, chronische Endometritis oder subklinische Endometritis äußert (Sheldon *et al.* 2006). Diese Krankheitsbilder führen für den Landwirt durch Subfertilität, erhöhte Abgangsraten, verminderte Milchproduktion und Behandlungskosten zu erheblichen finanziellen Einbußen (Sheldon *et al.* 2009b).

Bisher lag das Augenmerk der Forschung im Zusammenhang mit uterinen Erkrankungen auf pathogenen Bakterien wie *Trueperella pyogenes* (*T. pyogenes*) und *Escherichia coli* (*E. coli*), deren Beteiligung am Entstehen von Metritis und Endometritis nachgewiesen wurde (Bonnett *et al.* 1991; Huszenicza *et al.* 1999). Doch im bovinen Genitaltrakt lassen sich auch kommensale Bakterien wie Laktobazillen finden (Otero und Nader-Macias 2006), die in der Vagina der Frau zur Verhinderung einer Entzündung beitragen (Atassi *et al.* 2006). Ihre Rolle im Uterus des Rindes ist dagegen bisher ungeklärt. Ebenso finden sich in der uterinen Mikrobiota potentiell pathogene Bakterien, die bisher nicht als primäre Erreger entzündlicher Erkrankungen des Endometriums gelten. Ob sie aber ebenso wie pathogene Bakterien dazu in der Lage sind, eine Immunantwort endometrialer Epithelzellen hervorzurufen und damit am Entzündungsgeschehen beteiligt sein können, muss noch näher untersucht werden.

2 Literatur

2.1 Der bovine Uterus

Der bovine Uterus spielt neben der Reproduktion eine wichtige Rolle in der ersten Immunabwehr. Zu seinen Aufgaben zählen unter anderem der Transport der Spermien zu den Ovidukten, die Sekretion der Histiotrophe zur Ernährung des Embryos, die Implantation, die Plazentation, die Entwicklung des Embryos sowie dessen Austreibung am Ende der Trächtigkeit (Liebich 2010). Für die Bewältigung dieser vielfältigen Funktionen besteht die Wand des Uterus des Rindes aus drei unterschiedlichen Gewebsschichten, die zyklisch strukturellen Umbauvorgängen durch endokrine Steuermechanismen unterliegen. Die innerste Schicht, das Endometrium, bildet die Schleimhautauskleidung des Uterus. Lumenseitig besteht sie aus einer einschichtigen, stellenweise auch mehrreihigen hochprismatischen Epithelzellschicht. Das Endometrium des Rindes verfügt über knopfförmige, bindegewebsartige Vorwölbungen aus der *Lamina propria mucosae*, die reich vaskularisiert und von einer drüsenlosen Schleimhautschicht bedeckt sind. Diese sogenannten Karunkeln sind in einer Anzahl von 80 - 120 in vier unregelmäßigen Reihen angeordnet und verbinden sich mit den fetalen Kotyledonen zu Plazentomen (Schnorr und Kressin 2011). Unter der Epithelzellschicht liegt die *Lamina propria mucosae*. Sie besteht aus spinozellulärem Bindegewebe, in das in großer Zahl Uterindrüsen sowie verschiedene Immunzellen wie Makrophagen, Lymphozyten, Plasmazellen und Mastzellen eingelagert sind. Die tubulär verzweigten Uterindrüsen sind mit glandulärem Epithel ausgekleidet. Sie durchziehen die *Lamina propria mucosae* und reichen teilweise bis in die Muskelschicht des Uterus, dem Myometrium, das sich unter dem Endometrium anschließt (Liebich 2010). Das Myometrium unterteilt sich in eine innere zirkuläre und eine äußere longitudinale Schicht glatter Muskelfasern. Zwischen den beiden Muskelschichten liegt eine ausgeprägte Gefäßschicht, die die Uterindrüsen und das Epithel des Endometriums versorgt. Außen wird der Uterus von einem einschichtigen Epithel, dem Perimetrium, bedeckt (Liebich 2010).

2.2 Erkrankungen des Uterus

Für den wirtschaftlichen Erfolg in der Milchkuhhaltung spielt die Fertilität der Tiere eine entscheidende Rolle. Dabei kann ein gutes Management der Stallhygiene die Fruchtbarkeitsprobleme bei Milchkühen nicht entscheidend verbessern (Noakes *et al.* 1991; Potter *et al.* 2010). Wichtiger ist vielmehr das erfolgreiche Erkennen und Behandeln von

Erkrankungen des Uterus. Nach dem Abkalben findet bei fast allen Kühen eine Bakterieneinwanderung aus der Umgebung, von der Haut und dem Kot des Tieres durch die Vagina über die geöffnete Cervix in den Uterus statt (Sheldon 2004). Doch nicht alle Kühe entwickeln daraufhin eine klinische Erkrankung. Dies hängt vom Gleichgewicht zwischen der Pathogenität der Bakterien und der Immunität des Wirts ab (Sheldon *et al.* 2009b). Weitere Faktoren können die Entwicklung einer bakteriellen Uteruserkrankung fördern. Dazu gehören Schädigungen des Uterus durch Totgeburt, Zwillingsgeburt, Dystokie, Kaiserschnitt und Nachgeburtsverhaltung sowie metabolische Störungen wie Milchfieber, Ketose und linksseitige Labmagenverlagerung (Curtis *et al.* 1985; Lewis 1997; Sheldon und Dobson 2004; Földi *et al.* 2006). Kim *et al.* (2003) fanden zusätzlich die Parität der Kühe als Risikofaktor für Uteruserkrankungen heraus. Auch das Geschlecht des Kalbes, in diesem Fall das männliche, zählt als Risikofaktor (Potter *et al.* 2010). Abhängig vom zeitlichen Auftreten nach dem Abkalben und dem Krankheitsverlauf lassen sich postpartale Uteruserkrankungen in die akute, puerperale Metritis, klinische Metritis, chronische Endometritis und subklinische Endometritis unterteilen.

2.2.1 Akute, puerperale Metritis und klinische Metritis

Pathohistologisch beschreibt die Metritis die Entzündung der gesamten Uteruswand, die sich in Ödemen, Leukozyteninfiltration und myometrialer Degeneration äußert. Das klinische Erscheinungsbild der akuten, puerperalen Metritis zeigt sich in einem abnorm vergrößerten Uterus und einem übelriechenden, wässrigen, rot-braunen uterinen Ausfluss innerhalb 21 Tagen postpartum. Die Kühe zeigen ein gestörtes Allgemeinbefinden und weitere Symptome einer systemischen Erkrankung wie verminderte Milchleistung oder andere Anzeichen einer Toxämie. Die Körpertemperatur beträgt mehr als 39,5 Grad Celsius (°C) (Sheldon *et al.* 2006). Die Inzidenz der akuten, puerperalen Metritis variiert stark zwischen verschiedenen Herden und kann zwischen 18 % und 37 % betragen (Markusfeld 1987; Bartlett *et al.* 1986; Drillich *et al.* 2001). Im Gegensatz zur akuten, puerperalen Metritis zeigen Kühe mit klinischer Metritis keine systemischen Krankheitssymptome bei gleichzeitigem Vorhandensein eines abnorm vergrößerten Uterus und von eitrigem, uterinem Ausfluss in der Vagina im Zeitraum von 21 Tagen nach dem Abkalben (Sheldon *et al.* 2006). Bei Kühen mit puerperaler Metritis werden hauptsächlich *T. pyogenes* (ehemals *Arcanobacterium pyogenes*), *E. coli* und verschiedene gramnegative, obligat anaerobe Bakterien wie *Fusobacterium necrophorum* und *Prevotella melaninogenica* isoliert (Olson *et al.* 1984; Huszenicza *et al.* 1999). Zur Behandlung der akuten, puerperalen Metritis werden Antibiotika lokal oder systemisch verabreicht (Smith *et al.* 1998; Drillich *et al.* 2001).

2.2.2 Chronische Endometritis

Viele akute, puerperale und klinische Metritiden gehen in eine chronische Entzündung des Endometriums über (Benzaquen *et al.* 2007). Anhand der klinischen Symptomatik wird die chronische Endometritis, im englischen Schrifttum auch klinische Endometritis genannt, von Sheldon *et al.* (2006) als das Vorhandensein von purulentem (> 50 % Eiter), uterinem Ausfluss in der Vagina nach 21 oder mehr Tagen postpartum oder mukopurulentem (ungefähr 50 % Eiter, 50 % Schleim) Ausfluss in der Vagina nach 26 Tagen postpartum definiert. Dabei ist das Allgemeinbefinden der betroffenen Kühe ungestört und die Körpertemperatur nicht erhöht. Als weiteres Diagnosekriterium für die chronische Endometritis wird von LeBlanc *et al.* (2002a) ein Zervixdurchmesser von mehr als 7,5 Zentimeter (cm) nach 20 Tagen postpartum aufgeführt. Pathohistologisch zeichnet sich die chronische Endometritis durch eine oberflächliche Entzündung des Endometriums aus, die sich bis in das *Stratum spongiosum* der *Lamina propria mucosae* erstreckt. Es treten Oberflächenepitheldefekte, die Infiltration von Entzündungszellen, Gefäßstauungen, Ödeme und eine Anhäufung von Lymphozyten und Plasmazellen in oberflächlichen Schichten auf (Bondurant 1999). Die Inzidenz der chronischen Endometritis beträgt 15 - 20 % (Sheldon *et al.* 2009b). Bei Kühen mit chronischer Endometritis wird am häufigsten *T. pyogenes* isoliert, häufig assoziiert mit *Fusobacterium necrophorum* und *Prevotella melaninogenica* (Bonnett *et al.* 1991; Dohmen *et al.* 1995; Bondurant 1999).

Postpartale Uteruserkrankungen wie Metritis und Endometritis wirken sich negativ auf die Fruchtbarkeit der betroffenen Tiere aus. Dies zeigt sich in verlängerten Gützeiten, verminderten Konzeptionsraten und erhöhten Abgangsraten (Huszenicza *et al.* 1999; LeBlanc *et al.* 2002a; Sheldon 2004). Für den Landwirt bedeutet dies ein erheblicher finanzieller Verlust. In der Milchindustrie der Europäischen Union und Nordamerika beläuft sich die Gesamtsumme aus Behandlungskosten, verminderter Milchleistung und dem Ersetzen unfruchtbarer Tiere auf ungefähr zwei Milliarden Dollar pro Jahr (Turner *et al.* 2014). Für die Therapie der chronischen Endometritis werden intrauterin Antibiotika oder systemisch Prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) oder seine synthetischen Analoga verabreicht (Földi *et al.* 2006; LeBlanc *et al.* 2002b; Drillich *et al.* 2005). Haimerl *et al.* (2013; 2018) konnten in einer Metaanalyse der Therapie der chronischen Endometritis mit $PGF_{2\alpha}$ keinen positiven Einfluss dieser Behandlung auf die Rastzeit und Gützeit der behandelten Milchkühe feststellen. Zu derselben Ansicht gelangten auch Lefebvre und Stock (2012). Sie konnten in ihrer Metaanalyse keinen wissenschaftlichen Beweis für die Wirksamkeit von $PGF_{2\alpha}$ bei der Behandlung der chronischen Endometritis von Milchkühen finden. Die Behandlung mit Antibiotika zeigte laut ihrer Metaanalyse nur in Form einer einmaligen, intrauterinen

Applikation von Cephapirin-Benzathin bei Kühen mit chronischer Endometritis in saisonalen Abkalbesystemen Wirkung in Bezug auf die Reproduktionsleistung. Für Hochleistungsmilchkühe mit ganzjährigen Abkalbungen sahen sie dagegen nur einen geringen Nachweis der Wirksamkeit.

2.2.3 Subklinische Endometritis

Bei der subklinischen Endometritis handelt es sich um eine Entzündung des Endometriums, die sich durch das Fehlen klinisch apparenter Symptome auszeichnet. Im Unterschied zur chronischen Endometritis zeigen betroffene Tiere keinen eitrigen vaginalen Ausfluss bei ungestörtem Allgemeinbefinden (Sheldon *et al.* 2006). Die subklinische Endometritis lässt sich aufgrund der fehlenden klinischen Symptomatik mit Hilfe der klinischen Diagnostik nicht feststellen, dafür bedarf es weitergehender Diagnosemethoden wie der Zytologie. Dabei zeigt ein erhöhter Anteil an polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) im Ausstrich von Endometriumszellen das Vorhandensein einer Entzündung im Endometrium an. Gängige Methoden für die Entnahme von Endometriumszellen sind der Abstrich mittels Cytobrush (Kasimanickam *et al.* 2004) oder die uterine Lavage (Gilbert *et al.* 2005). Der Grenzwert für einen erhöhten Gehalt an PMN, ab dem man von einer subklinischen Endometritis spricht, wird in der Literatur nicht einheitlich definiert. In vielen Studien wird er in Bezug zu einer später verminderten Fruchtbarkeit definiert. Verschiedene Autoren sprechen ab einem Gehalt von > 5 % an PMN im zytologischen Präparat von subklinischer Endometritis (Gilbert *et al.* 2005; Gabler *et al.* 2009; Fischer *et al.* 2010; Lima *et al.* 2013; Madoz *et al.* 2013). Andere Autoren sprechen erst ab einem PMN-Gehalt von 8 % (Barlund *et al.* 2008), 10 % (Kasimanickam *et al.* 2004) oder 18 % (Kasimanickam *et al.* 2004, 2005; Sens und Heuwieser 2013) von subklinischer Endometritis, wobei übergreifend zu sagen ist, dass der Untersuchungszeitraum in den erwähnten Studien nicht einheitlich gewählt wurde und daher nur bedingt vergleichbar ist. Eine neuere Überprüfung der verfügbaren Literatur hat ergeben, dass ein genereller Grenzwert von 5 % PMN im zytologischen Präparat bei allen Kühen zwischen 21 und 62 Tagen postpartum für die Diagnose einer subklinischer Endometritis herangezogen werden kann (Wagener *et al.* 2017).

Für die subklinische Endometritis konnten spezifische Risikofaktoren ermittelt werden (Dubuc *et al.* 2010). Diese sind ein Body Condition Score von unter 2,75 zum Zeitpunkt der Kalbung, eine Hyperketonämie und ein erhöhter Haptoglobingehalt im Serum in der ersten Woche postpartum. Unter allen Uteruserkrankungen zeigt die subklinische Endometritis die höchste Inzidenz. Durchschnittlich sind ungefähr 30 % der Milchkühe betroffen (Sheldon *et al.* 2009b), wobei die Zahlen verschiedener Herden zwischen 11 % und über 70 %

schwanken (Kasimanickam *et al.* 2004; Gilbert *et al.* 2005; Galvão *et al.* 2009a; Barlund *et al.* 2008; Sens und Heuwieser 2013). Verschiedene Studien haben gezeigt, dass sich die subklinische Endometritis negativ auf die Fruchtbarkeitsparameter betroffener Kühe auswirkt (Gilbert *et al.* 2005; Lincke *et al.* 2007; Cheong *et al.* 2011; Vieira-Neto *et al.* 2014), so dass ihre effektive Behandlung ein wirtschaftlicher Faktor für Milchviehherden darstellt. Es finden sich aber in der Literatur keine einheitlichen Angaben für die Behandlung der subklinischen Endometritis. Die bisher durchgeführten Studien sind aber aufgrund eines unterschiedlichen Studiendesigns nur bedingt vergleichbar (Wagener *et al.* 2017).

Galvão *et al.* (2009b) konnten bei der Behandlung von Kühen mit subklinischer Endometritis mit Ceftiofur, die zur Zyklussynchronisation mit PGF_{2α} behandelt wurden, keinen positiven Effekt auf die Fruchtbarkeit im Vergleich zu Kühen ohne antibiotische Behandlung feststellen. Die Studie von Kasimanickam *et al.* (2005) dagegen zeigte eine signifikant erhöhte Trächtigkeitsrate und verkürzte Günstzeit bei Kühen mit subklinischer Endometritis, die intrauterin mit dem Antibiotikum Cephapirin oder systemisch mit dem PGF_{2α}-Analogon Cloprostenol behandelt wurden, im Vergleich zu unbehandelten Tieren. Dabei soll der positive Effekt des PGF_{2α} bei vorhandenem Corpus luteum durch eine Luteolyse und damit verbundene Induktion des Östrus ausgelöst werden. Der Östrus führt zur Ausscheidung von Bakterien und Entzündungsprodukten aus dem Uterus und einer verbesserten uterinen Abwehr, da der immunsuppressive Einfluss des Progesterons entfällt (Lewis 1997). Spätere Studien fanden keinen positiven Einfluss von PGF_{2α} auf die Fruchtbarkeit von Kühen mit subklinischer Endometritis heraus (Galvão *et al.* 2009a; Dubuc *et al.* 2011; Lima *et al.* 2013), so dass PGF_{2α} als Behandlungsmethode für die subklinische Endometritis nicht empfohlen werden kann. Lincke (2007) fand heraus, dass sich die Fruchtbarkeitskennzahlen durch die Behandlung der subklinischen Endometritis mit proteolytischen Enzymen nur bei Kühen ab der zweiten Laktation positiv veränderten.

2.3 Die Mikrobiota im weiblichen Genitaltrakt

Schon kurz nach der Geburt werden Haut und Schleimhäute von Mensch und Tier mit Bakterien besiedelt. Die meisten dieser Keime sind fakultativ pathogen, apathogen oder Saprophyten. Sie bilden die individuelle Mikrobiota und sind beispielsweise durch Antibiose, Keimkonkurrenz oder Synthese von Vitaminen in der Regel für den Wirt von Nutzen (Mayr 2006). Die Schleimhaut des Genitaltraktes verfügt ebenso über eine typische Bakterienbesiedlung. In der Vagina gesunder Frauen lassen sich meistens eine oder zwei dominante Laktobazillenspezies, hauptsächlich *Lactobacillus (L.) crispatus* und *L. iners*, aber auch *L. jensenii* und *L. gasseri*, nachweisen (Lamont *et al.* 2011). Der bovine Uterus

dagegen wird vor der Kalbung als steril vermutet (Sheldon 2004), doch vor allem während und nach dem Abkalben und in geringerem Umfang während der Brunst findet eine Einwanderung in den Uterus durch eine Vielzahl an Bakterienspezies statt (Williams *et al.* 1988; Bondurant 1999; Machado *et al.* 2012). Dabei ist das bakterielle Eindringen in den Uterus kein statischer Zustand, sondern ein dynamisches Geschehen, bei dem sich uterine Besiedlung, Beseitigung der Bakterien und spontane, erneute Besiedlung in den ersten Wochen postpartum abwechseln (Griffin *et al.* 1974).

Nach dem erwarteten pathogenen Potential im Uterus (Ruder *et al.* 1981; Olson *et al.* 1984; Farin *et al.* 1989; Noakes *et al.* 1989; 1991; Bonnett *et al.* 1993) lassen sich im Uterus nachgewiesene Bakterienspezies in drei Kategorien unterteilen (Sheldon *et al.* 2002; Williams *et al.* 2005) (Tabelle 1):

- 1) Anerkannte Pathogene des Uterus, denen uterine endometriale Läsionen zugeordnet werden.
- 2) Potentielle Pathogene, die häufig aus dem Uteruslumen und bei Fällen von Endometritis isoliert werden, aber üblicherweise nicht mit uterinen Läsionen in Verbindung stehen.
- 3) Opportunistische Kontaminanten, die vorübergehend aus dem Uteruslumen isoliert werden, aber nicht mit Endometritis assoziiert sind.

Tabelle 1. Kategorisierung der uterinen Bakterien nach ihrem pathogenen Potential (Sheldon *et al.* 2002)

Pathogene	Potentielle Pathogene	Opportunistische Kontaminanten
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	<i>Acinetobacter</i> spp.	<i>Aerococcus viridans</i>
<i>Prevotella</i> spp.	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Clostridium butyricum</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Clostridium perfringens</i>
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	<i>Haemophilus somnus</i>	<i>Corynebacterium</i> spp.
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	<i>Mannheimia haemolytica</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>
	<i>Pasteurella multocida</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
	<i>Peptostreptococcus</i> spp.	<i>Micrococcus</i> spp.
	<i>Staphylococcus aureus</i> (Koagulase +)	<i>Providencia rettgeri</i>
	<i>Streptococcus uberis</i>	<i>Providencia stuartii</i>
		<i>Proteus</i> spp.
		<i>Propionobacterium granulosa</i>
		<i>Staphylococcus</i> spp. (Koagulase -)
		α-hämolytische Streptokokken
		<i>Streptococcus acidominimus</i>

+ = positiv; - = negativ

Unabhängig vom genitalen Gesundheitszustand sind 80 - 100 % der Kühe von der uterinen Bakterieneinwanderung postpartum betroffen (Sheldon *et al.* 2008), doch es gibt Unterschiede in den gefundenen Bakteriengattungen. Pathogene verstärken sich häufig

gegenseitig in ihrer Wirkung auf den bovinen Uterus. Innerhalb der ersten Woche postpartum wird eine uterine Infektion häufig von *E. coli* hervorgerufen, gefolgt von *T. pyogenes* und anaeroben Bakterien wie *Fusobacterium necrophorum*, *Prevotella* spp. und *Bacteroides* spp. in den darauffolgenden Wochen (Sheldon *et al.* 2014). Dabei scheint *E. coli* den Weg für eine spätere Infektion mit *T. pyogenes* zu bereiten (Dohmen *et al.* 2000). Zerbe *et al.* (2001) fanden heraus, dass Produkte von *E. coli* die funktionellen Eigenschaften boviner PMN, die mit den bakteriellen Produkten kokultiviert wurden, beeinträchtigen. Vor allem die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies durch PMN war herabgesetzt, aber auch die Phagozytoseleistung sowie die antikörperunabhängige zelluläre Zytotoxizität waren vermindert. Dies unterstützt die These einer Koinfektion mit *T. pyogenes* nach vorangegangenem *E. coli*-Befall. *T. pyogenes*, *Fusobacterium necrophorum* und *Prevotella* spp. agieren synergistisch miteinander, indem sie den Schweregrad der Krankheit erhöhen (Ruder *et al.* 1981; Olson *et al.* 1984; Földi *et al.* 2006). *T. pyogenes* produziert einen Wachstumsfaktor für *Fusobacterium necrophorum*, *Fusobacterium necrophorum* bildet ein Leukotoxin und *Prevotella melaninogenica* produziert eine Substanz, die Phagozytose hemmt (Sheldon *et al.* 2009b). Zudem zeigten Wagener *et al.* (2015), dass das Vorhandensein von *Bacillus* spp. in uterinen Proben am Tag des Abkalbens und 21 Tage postpartum mit dem Auftreten von *T. pyogenes* 28 Tage postpartum korreliert.

Bei gesunden Kühen ließen sich 10 Tage postpartum vor allem *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp. und *Bacillus* spp. nachweisen (Huszenicza *et al.* 1999). Einige Vertreter dieser Bakteriengattungen sind dafür bekannt, dass sie zu den potentiell pathogenen Bakterien im bovinen Uterus gehören, die unter gewissen Umständen dazu in der Lage sind, eine uterine Infektion auszulösen. So konnten Petit *et al.* (2009) bei 12,5 % der untersuchten Kühe nach einem Abort *Staphylococcus aureus* nachweisen.

Santos *et al.* (2011) untersuchten anhand einer kultivierungsunabhängigen metagenomischen Analyse die uterine Mikrobiota von gesunden Kühen und Kühen mit puerperaler Metritis. Bei gesunden Kühen konnten die meisten Klonsequenzen der Klasse *Gammaproteobacteria* zugeordnet werden, wobei viele Sequenzen mit *Mannheimia varigena* und *Pasteurella haemolytica* übereinstimmten. Viele Sequenzen ließen sich dem Stamm *Tenericutes*, inklusive *Ureaplasma* und *Mycoplasma*, zuordnen. Bei Kühen mit Metritis waren die Klonsequenzen hauptsächlich vom Stamm *Fusobacteria*, einschließlich *Fusobacterium necrophorum* und *Fusobacterium necrophorum* ssp. *funduliforme*, und *Bacteroidetes*, wobei viele Sequenzen *Porphyromonas* und *Bacteroides* spp. zugeordnet werden konnten. Diese Studie zeigt die bakterielle Diversität und Komplexität im bovinen Uterus über die kultivierbaren Bakterienspezies hinausgehend.

2.3.1 *Bacillus pumilus*

Bacillus spp. gehören im bovinen Uterus postpartum neben *T. pyogenes*, *E. coli*, *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. und *Corynebacterium* spp. zu den meist isolierten aeroben Bakterienspezies. Bei durchschnittlich 10,5 % der untersuchten Kühe (gesunde Kühe, Kühe mit subklinischer oder chronischer Endometritis) konnten Prunner *et al.* (2014) *Bacillus* spp. 20 bis 30 Tage postpartum aus dem Uterus isolieren. Vergleichbare Ergebnisse erzielten Wagener *et al.* (2015) bei der Untersuchung von Endometriumsproben, die zu sechs unterschiedlichen Zeitpunkten postpartum von 122 Kühen genommen wurden. 9,3 % der Isolate wurden als *Bacillus* spp. identifiziert, nur die Gattungen *Staphylococcus* (24,2 %), *Trueperella* (13,2 %) und *Escherichia* (11,2 %) waren in größerer Anzahl vertreten. Mehr als die Hälfte der isolierten *Bacillus* spp. ließ sich der Art *B. pumilus* (55,5 %) zuordnen, nur 22,5 % wurde als *B. licheniformis* identifiziert. Dies ist bemerkenswert, da bisher *B. licheniformis* als potentiell pathogene Bacilluspezies in der Literatur beschrieben wurde, *B. pumilus* dagegen im bovinen Endometrium nicht als pathogen bekannt ist (Williams *et al.* 2005).

B. pumilus sind aerobe, gram-positive oder gram-variable, bewegliche kleine Stäbchen, die bei mindestens 5 – 15 °C und maximal 40 – 50 °C bei einem pH-Wert von 6 – 9,5 wachsen (Logan und De Vos 2009). Diese Bakterien sind ubiquitäre Bodenorganismen, die im inneren Gewebe von Pflanzen zu finden sind. Doch auch in der Mikrobiota des Gastrointestinaltraktes von Menschen, Broilern und Rindern ist *B. pumilus* zu finden (Barbosa *et al.* 2005; Fakhry *et al.* 2008; Rafii *et al.* 2009).

2.3.2 *Lactobacillus* Spezies

Die Gattung *Lactobacillus* gehört zusammen mit der Gattung *Pediococcus* (*P.*) zur Familie *Lactobacillaceae*. *Lactobacillus* spp. sind gram-positive, nicht-sporenbildende Stäbchen oder kokkoide Stäbchen. Sie sind generell anaerob oder mikroaerophil, wachsen im Temperaturbereich von 2 bis 53 °C und einem pH-Wert von 3 bis 8. Die optimale Wachstumstemperatur liegt bei 30 – 40 °C bei einem optimalen pH-Wert von 5,5 – 6,2. Laktobazillen kommen fast ubiquitär vor. Sie sind im Mund, Gastrointestinal- und Genitaltrakt des Menschen und vieler Tiere sowie in Lebensmitteln wie Milchprodukten, fermentiertem Fleisch, Sauerteigen, Gemüse, Früchten und Getränken als auch im Wasser und Boden zu finden (Felis und Dellaglio 2007; Hammes und Hertel 2009; Salvetti *et al.* 2012).

Laktobazillen haben einen komplexen Nährstoffbedarf an Aminosäuren, Peptiden, Nukleinsäurederivaten, Vitaminen, Salzen, Fettsäuren oder Fettsäureestern und

LITERATUR

fermentierbaren Kohlenhydraten. Anhand der Art des fermentierten Kohlenhydrats sowie der Fermentationsprodukte lassen sich Laktobazillen in drei Gruppen unterteilen, obligat homofermentative, fakultativ heterofermentative und obligat heterofermentative Laktobazillen (Hammes und Hertel 2009).

Obligat homofermentative Laktobazillen fermentieren Hexosen fast ausschließlich zu Milchsäure. Pentosen und Gluconat werden nicht fermentiert. Vertreter dieser Gruppe sind beispielsweise *L. delbrueckii*, *L. amylovorus*, *L. ruminis* und *L. salivarius* (Hammes und Hertel 2009).

Fakultativ heterofermentative Laktobazillen sind in der Lage Hexosen zu Milchsäure sowie Pentosen zu Milchsäure und Essigsäure abzubauen. Einige Spezies dieser Gruppe fermentieren Glucose zu Milchsäure, Essigsäure, Ethanol und Ameisensäure. Zu den fakultativ heterofermentativen Laktobazillen gehören unter anderem *L. casei*, *L. intestinalis*, *L. plantarum* und *L. pentosus* (Hammes und Hertel 2009).

Die dritte Gruppe bilden die obligat heterofermentativen Laktobazillen, die Hexosen zu Milchsäure, Essigsäure (Ethanol) und Kohlenstoffdioxid (CO₂) fermentieren. Pentosen werden von ihnen zu Milchsäure und Essigsäure abgebaut. Zu Vertretern dieser Gruppe gehören unter anderem *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. reuteri* und *L. vaginalis* (Hammes und Hertel 2009). Durch die phylogenetische Analyse anhand der Gensequenz der 16S ribosomalen Ribonukleinsäure (rRNA) ist eine darüber hinausgehende Unterscheidung der *Lactobacillus* spp. in 15 Untergruppen mit mindestens drei oder mehr Spezies möglich (Salvetti *et al.* 2012).

Laktobazillen werden gewöhnlich als für den Menschen unbedenkliche Organismen betrachtet, doch sehr selten lassen sich Laktobazillen in Fällen wie Endokarditis oder Bakteriämie beim Menschen nachweisen (Cannon *et al.* 2005). Laktobazillen sind bei der Kuh nicht als bakterielle Erreger bekannt, die mit Endometritis assoziiert sind. Stattdessen lassen sich *Lactobacillus* spp. den kommensalen Bakterien im bovinen Uterus zurechnen. Sie gehören nicht wie bei der Frau zur hauptsächlichen Mikrobiota des Genitaltraktes, stattdessen sind bei heranwachsenden Färsen Streptokokken, gefolgt von Staphylokokken, die dominanten Bakterien in der vaginalen Mikrobiota. Laktobazillen und Enterobacteriaceae spielen dabei nur eine untergeordnete Rolle, wobei die Menge an vaginalen Laktobazillen mit dem Alter der Tiere zunimmt (Otero *et al.* 2000). Bisher wurden nur in vereinzelt Studien *Lactobacillus* spp. aus dem bovinen Uterus isoliert, aber nicht weiter charakterisiert (Messier *et al.* 1984; Williams *et al.* 1988).

2.4 Die angeborene Immunität des bovinen Uterus

Der Körper ist mittels einer komplexen Abwehrreaktion, der Entzündung, in der Lage, auf Gewebeschäden unter Einbeziehung des Kreislauf- und Immunsystems sowie des ortsständigen Bindegewebes und Parenchyms zu reagieren. Diese Reaktion wird ausgelöst durch exogene oder endogene Noxe wie Krankheitserreger und ihre Toxine, Traumata, physikalische und chemische Einflüsse, Nekrose, Tumoren, Fremdkörper und Überempfindlichkeitsreaktionen bzw. Autoimmunreaktionen (Baumgärtner und Gruber 2010). Dabei stehen dem Körper zwei verschiedene Mechanismen zur Verfügung, um auf den Entzündungsreiz zu reagieren, die angeborene Immunantwort sowie die adaptive Immunantwort. Während die adaptive Immunität spezifisch auf ein bestimmtes Pathogen mit der klonalen Expansion von antigenspezifischen Lymphozyten und Antikörperproduktion reagiert, zeichnet sich die angeborene Immunität durch eine unspezifische Reaktion auf eine Vielzahl von Pathogenen mittels Phagozyten aus (Murphy *et al.* 2009).

Im bovinen Uterus bildet das Endometriumsepithel die erste physische Barriere für eindringende Krankheitserreger und erfüllt eine wichtige Rolle in der angeborenen Immunität. Während der Trächtigkeit ist die Regulierung der uterinen Immunität notwendig, um die Implantation und später das Überleben des Fetus zu gewährleisten. Nach dem Abkalben dagegen ist es erforderlich, dass sich der Reproduktionstrakt schnell vom immunsupprimierten Zustand während der Trächtigkeit zu einer gesteigerten Immunfunktion umstellt, um postpartum eingewanderte Bakterien und Gewebsdebris entfernen zu können (LeBlanc 2012). Um diesen Zweck zu erfüllen, werden eingewanderte Bakterien von den endometrialen Epithelzellen durch Toll-like-Rezeptoren erkannt, mittels Chemokinen werden Entzündungszellen zum Infektionsort angelockt, über die Produktion von Zytokinen wie Interleukinen wird die Permeabilität von Gefäßendothelien erhöht, die Freisetzung von antimikrobiellen Proteinen, Akute-Phase-Proteinen, Prostaglandinen und reaktiven Sauerstoffspezies stimuliert sowie die Immunantwort reguliert (Sheldon *et al.* 2014; Sheldon *et al.* 2017).

2.4.1 Toll-like-Rezeptoren

Toll-like-Rezeptoren (TLR) sind Bestandteile der angeborenen Immunität und werden der Gruppe der „pattern-recognition receptors“ zugerechnet. Diese verdanken ihren Namen der Eigenschaft, hochkonservierte molekulare Strukturen, sogenannte „pathogen-associated molecular patterns“ (PAMPs), die bei den meisten Mikroorganismen vorhanden sind, zu erkennen (Ausubel 2005). TLR sind Typ I Transmembranproteine, die aus einer

extrazellulären, leucinreichen Domäne und einer zytoplasmatischen Domäne, die eine Homologie zur zytoplasmatischen Domäne des humanen Interleukin 1-Rezeptors (IL1R) aufweist, bestehen (Medzhitov *et al.* 1997).

Bisher sind 13 Toll-like-Rezeptoren bei Säugetieren bekannt. Der erste funktionsfähige Toll-like-Rezeptor, der bei Säugetieren nachgewiesen wurde, war TLR4 auf Makrophagen der Maus. Es konnte mit hyporesponsiven Mausstämmen gezeigt werden, dass TLR4 für die Erkennung des bakteriellen Endotoxins, Lipopolysaccharid (LPS), das von allen gram-negativen Bakterien gebildet wird, essentiell ist (Poltorak *et al.* 1998). TLR2 bindet unter anderem Peptidoglycan und Lipoteichonsäure von gram-positiven Bakterien (Schwandner *et al.* 1999; Opitz *et al.* 2001) wie auch bakterielle Lipopeptide und Lipoproteine von gram-positiven Bakterien, gram-negativen Bakterien und Mykoplasmen (Akira *et al.* 2001). Dabei spielt die Fähigkeit von TLR2, Heterodimere mit TLR1 und TLR6 zu bilden, eine entscheidende Rolle (Farhat *et al.* 2007). Die Heterodimerisierung von TLR2 mit TLR1 ermöglicht die Bindung von triacylierten Lipopeptiden, die häufig in gram-negativen Bakterien vorkommen, wohingegen diacylierte Lipopeptide von Mykoplasmen an TLR2/TLR6-Heterodimere binden (Takeuchi *et al.* 2001; Jin *et al.* 2007). Die Bindung von Peptidoglycan wird ebenso durch ein TLR2/TLR6-Heterodimer vermittelt (Ozinsky *et al.* 2000). Toll-like-Rezeptoren werden von verschiedenen Zellen des Immunsystems wie Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen und Granulozyten, aber auch von Epithelzellen und Endothelzellen exprimiert (Medzhitov 2001; Zarembler und Godowski 2002). Durch die Aktivierung von Toll-like-Rezeptoren werden pro-inflammatorische Zytokine wie Tumor Nekrose Faktor alpha (TNF), Interleukin 1 (IL1), IL6, IL8 oder IL12 induziert (Akira *et al.* 2001; Oliveira-Nascimento *et al.* 2012).

Im bovinen Endometrium spielen Toll-like-Rezeptoren bei der Erkennung von eindringenden Bakterien eine entscheidende Rolle. Davies *et al.* (2008) konnten erstmals die Genexpression von TLR1-10 im bovinen Endometrium nachweisen. Dabei spielt der Entnahmeort im Uterus (Corpus oder Horn) für das Vorkommen der verschiedenen Toll-like-Rezeptoren keine Rolle. Bovine endometriale Epithel- und Stromazellen sind *in vitro* in der Lage, IL6 und IL8 nach Stimulation mit bakteriellen Lipopeptiden zu produzieren. Ihre zelluläre Antwort auf triacylierte Lipopeptide wird über TLR1 und TLR2 vermittelt, auf diacylierte Lipopeptide dagegen reagieren sie nicht nur über TLR2 und TLR6 wie der Mensch und die Maus, sondern auch über TLR1 (Turner *et al.* 2014).

2.4.2 Interleukin 1 alpha

Interleukine sind Polypeptide, die zur Gruppe der Zytokine gehören und von einer Vielzahl von Zellen gebildet werden können. Sie spielen eine wichtige Rolle in der Entzündungsreaktion, der Regulation der Immunabwehr, der Hämatopoese und der Apoptose (Heinrich *et al.* 2014). Interleukin 1 gehört zu den pro-inflammatorischen Zytokinen. Es besitzt eine Molekülmasse von 17 Kilodalton (kDa) und kommt in zwei Isoformen, Interleukin 1 alpha und beta (IL1A, IL1B), vor. IL1B ist in seiner Vorläuferverbindung pro-IL1B inaktiv, wohingegen IL1A sowohl als pro-IL1A als auch als reifes IL1A aktiv ist (Kim *et al.* 2013). Pro-IL1A wird im Gegensatz zu IL1B konstitutiv exprimiert und fungiert als Schlüsselbotenstoff in der Entzündung. Die Freisetzung von IL1A erfolgt nur aus nekrotischen oder beschädigten Zellen. IL1B dagegen wird durch aktive Sekretion freigesetzt (Dinarello 2009; Kim *et al.* 2013). Die biologische Aktivität beider Isoformen wird über die beiden Rezeptoren IL1-Rezeptor Typ I (IL1RI) und Typ II (IL1RII) vermittelt (Dinarello 1991) und durch einen Rezeptorantagonisten (IL1RN) kontrolliert, der mit den Liganden um die Bindung an den IL1-Rezeptoren konkurriert (Arend 1991).

IL1 wird von Monozyten und Makrophagen, aber auch von Epithel- und Endothelzellen gebildet. Die Wirkung von IL1 ist konzentrationsabhängig. In geringer Konzentration wirkt es lokal entzündungsfördernd über die Induktion der Synthese von IL1 und IL6. Zudem werden durch IL1 die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen sowie die Gerinnung gesteigert und die Chemokinsynthese in Monozyten angeregt. In höherer Konzentration (circa 10 Nanogramm/Kilogramm Körpergewicht) löst IL1 Fieber aus und induziert die Bildung von Akute-Phase-Proteinen in der Leber (Siegenthaler und Blum 2013).

Doch nicht nur in der Inflammation hat IL1A eine große Bedeutung, sondern auch bei physiologischen Prozessen im Genitaltrakt. Im Uterus des Pferdes, der Maus und der Frau wird IL1A unter Kontrolle von Progesteron und Östrogen während des Sexualzyklus gebildet (De *et al.* 1992; Pretto *et al.* 2008; Szóstek *et al.* 2013). Verschiedene Studien legen eine Beteiligung von IL1A bei der Implantation der Blastozyste in das Endometrium der Frau und der Maus nahe (Osteen *et al.* 1997; Basak *et al.* 2002; Jasper *et al.* 2007; Bourdieu *et al.* 2014). Im bovinen Endometrium wird IL1A während des gesamten Sexualzyklus exprimiert (Gabler *et al.* 2009), die höchste Expression tritt dabei während der frühen Lutealphase auf (Tanikawa *et al.* 2005). In derselben Studie wurde auch gezeigt, dass die Produktion von Prostaglandinen im Verlauf des Sexualzyklus durch IL1A unterschiedlich reguliert wird, was die Bedeutung von IL1A in endometrialen Funktionen wie der Luteolyse unterstreicht.

In Endometriumsproben von Kühen mit chronischer Endometritis fanden Peter *et al.* (2015) im späten Puerperium (45 – 51 Tage postpartum) eine zu Kontrollkühen signifikant erhöhte

IL1A- und IL1B-Expression. Bei Kühen mit subklinischer Endometritis war die Expression der messenger RNA (mRNA) von IL1A und IL1B bereits im frühen Puerperium (24 – 30 Tage postpartum) sowie im späteren Puerperium (IL1A, 38 – 44 Tage postpartum; IL1B, 45 – 51 Tage postpartum) signifikant erhöht. Gabler *et al.* (2009) konnten eine erhöhte IL1A-mRNA-Expression bei Kühen mit subklinischer und chronischer Endometritis drei Wochen postpartum feststellen.

2.4.3 Interleukin 6

Interleukin 6 wird zu den pro-inflammatorischen Zytokinen gezählt und wurde ursprünglich als B-zellstimulierender Faktor 2 bezeichnet. Das IL6-Gen kodiert für ein inaktives Vorläuferprotein, das beim Rind 208 Aminosäuren lang ist. Erst durch Spaltung sowie posttranslationale Glykosylierung und Phosphorylierung entsteht das 21,5 - 28 kDa große aktive Protein (Snick van 1990). Die Signalübertragung von IL6 kann über zwei unterschiedliche Signalwege erfolgen. Im klassischen Signalweg bindet IL6 an den membrangebundenen IL6-Rezeptor (IL6R), der sich auf der Zelloberfläche von Hepatozyten, B-Lymphozyten (B-Zellen) und T-Lymphozyten (T-Zellen), Neutrophilen und Monozyten befindet (Naugler und Karin 2008). Der IL6-Rezeptor ist alleine nicht zur Signalübertragung fähig. Erst durch die Bildung eines Ligand-Rezeptor-Komplexes durch die Bindung von IL6 an IL6R wird das Signaltransduktor-Glykoprotein gp130 als Homodimer rekrutiert und die Signalübertragung ausgelöst. Der alternative Trans-Signalübertragungsweg ist im Gegensatz zum klassischen Weg nicht auf das Vorhandensein eines membrangebundenen IL6R angewiesen, sondern vermittelt die IL6-Wirkung über lösliche IL6-Rezeptoren, die sich im Blutkreislauf befinden (Heinrich *et al.* 2003; Rath *et al.* 2015).

Die Produktion von IL6 erfolgt hauptsächlich durch Monozyten und Makrophagen, aber auch verschiedene andere Zelltypen wie beispielsweise B- und T-Zellen, Fibroblasten, Keratinozyten, Mastzellen und Endothelzellen sind dazu in der Lage. Alle Stresszustände, die eine Immunantwort hervorrufen können, wie IL1 und TNF, bakterielle Produkte wie beispielsweise LPS, virale Infektionen oder nekrotische Zellreste können die Bildung von IL6 hervorrufen (Naugler und Karin 2008). IL6 verfügt über vielfältige physiologische Funktionen wie die Induktion der Akute-Phase-Reaktion, die Differenzierung der B-Zellen, die Modulation der T-Zell-Apoptose, die Aktivierung der T-Helferzellen und die Balance zwischen regulatorischen T-Zellen und Typ17-T-Helferzellen (Th17-Zellen) (Rath *et al.* 2015). Zudem spielt IL6 eine Schlüsselrolle beim Übergang von der angeborenen zur erworbenen Immunität. Dies wird unter anderem durch die Ablösung der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten durch mononukleäre Zellen über den Trans-Signalweg ausgelöst (Jones

2005). Eine Dysregulation der IL6-Signalübertragung dagegen trägt zur Entstehung und Erhaltung von chronischen Entzündungsgeschehen, Autoimmunerkrankungen und Krebs bei (Tarnier *et al.* 2007; Drastich *et al.* 2011; Baron *et al.* 2015; Rath *et al.* 2015).

Im Reproduktionstrakt übt Interleukin 6 unterschiedliche Funktionen aus. Während des Sexualzyklus wird IL6 im Uterus des Rindes, des Pferdes und der Maus exprimiert (De *et al.* 1992; Fischer *et al.* 2010; Szóstek *et al.* 2013). Beim Rind lässt sich keine unterschiedliche IL6-mRNA-Expression im Endometrium im Verlauf des Sexualzyklus nachweisen (Fischer *et al.* 2010). Doch auch in der Pathologie der Fortpflanzung spielt IL6 eine Rolle. Beim Rind steht eine erhöhte IL6-Genexpression, nachgewiesen im Blut bzw. im Uterus, vor und zum Zeitpunkt der Geburt in Korrelation mit einer später auftretenden Endometritis (Ishikawa *et al.* 2004; Galvão *et al.* 2011). In Proben von Kühen mit entzündetem Endometrium wurde eine erhöhte IL6-mRNA-Expression zwei Wochen postpartum nachgewiesen (Chapwanya *et al.* 2009; Gabler *et al.* 2010). Peter *et al.* (2015) fanden in Endometriumsproben von Kühen mit subklinischer Endometritis 38 – 44 Tage postpartum und von Kühen mit chronischer Endometritis 45 – 51 Tage postpartum eine erhöhte IL6-mRNA-Expression.

2.4.4 CXC-Chemokin-Liganden 1 - 3 und CXC-Chemokinrezeptor 2

Chemokine sind chemotaktische, pro-inflammatorische Zytokine, die Leukozyten an den Ort der Entzündung rekrutieren. Damit sind sie essentiell für die Immunantwort. Chemokine bestehen aus etwas 70 - 130 Aminosäuren mit vier konservierten Cysteinresten. Als sekretorische Proteine sind sie mit einer Signalsequenz von 20 - 25 Aminosäuren ausgestattet, die vor der Sekretion abgespalten wird (Baggiolini 2001). Anhand ihrer N-terminalen Struktur lassen sich vier Familien unterscheiden, die CXC-, CC-, CX₃C- und C-Chemokine. Dabei steht das C für Cystein und das X für jede andere Aminosäure, die sich zwischen den ersten zwei konservierten Cysteinen am N-Terminus befinden kann.

Die verschiedenen CXC-Chemokine werden mit L für Ligand und fortlaufender Nummerierung benannt. Die Wirkung der CXC-Chemokine wird über die Bindung an die CXC-Chemokinrezeptoren (CXCR) 1 - 6 vermittelt. Die CXC-Chemokinfamilie lässt sich weiter durch die An- (ELR⁺) oder Abwesenheit (ELR⁻) des ELR-Motivs unterteilen. ELR⁺-Chemokine verfügen über ein Tripeptid, bestehend aus Glutaminsäure, Leucin und Arginin, das der CXC-Domäne vorgelagert ist. ELR⁺-Chemokine verfügen über angiogenetische Eigenschaften, ELR⁻-Chemokine dagegen inhibieren die Angiogenese (Vandercappellen *et al.* 2008). Das ELR-Motiv ist essentiell für die Rezeptorbindung und Aktivierung von neutrophilen Granulozyten (Hébert *et al.* 1991; Clark-Lewis *et al.* 1993).

Die CXC-Chemokin-Liganden 1, 2 und 3 (CXCL1, -2, -3) vermitteln ihre Aktivität durch Bindung an CXCR2, der auf neutrophilen Granulozyten zu finden ist (Baggiolini 2001). Eine andere Studie konnte zeigen, dass CXCR2 auf humanen Endothelzellen exprimiert wird (Addison *et al.* 2000). CXCL1-3 werden von vielen verschiedenen Gewebszellen und einwandernden Leukozyten als Antwort auf bakterielle Toxine und inflammatorische Zytokine wie IL1, TNF und Interferone gebildet (Baggiolini 2001). CXCL1 und CXCL2 verfügen über 99 % homologe Sequenzen. Die Hauptaufgabe von CXCL1-3 ist die Förderung der Chemotaxis von Neutrophilen anhand eines Konzentrationsgefälles zum Ort der höchsten Chemokinkonzentration, das heißt zum Ort der Infektion bzw. Inflammation. Ebenso werden die Angiogenese und Chemotaxis von Endothelzellen durch CXCL1-3 vermittelt (Addison *et al.* 2000). Außerdem werden diese CXC-Chemokine mit Tumorzelltransformation und -wachstum in Verbindung gebracht. Sie spielen eine Rolle in der Chemotaxis und Metastasenbildung von verschiedenen Tumorzelllinien und agieren als autokriner Wachstumsfaktor für Melanome und andere Tumore (Bordoni *et al.* 1990; Dhawan und Richmond 2002; Ogata *et al.* 2010).

Im Endometrium der Frau wird CXCL1 vermehrt während der Lutealphase des Sexualzyklus exprimiert. Ebenso konnte in dezidualisierten humanen endometrialen Stromazellen eine erhöhte CXCL1-Expression *in vitro* nachgewiesen werden (Nasu *et al.* 2001). Die Stimulation von kultivierten humanen Endometriumszellen mit LPS, IL1B und TNF führte sowohl zu einer gesteigerten Expression von CXCL1 (Nasu *et al.* 2001) als auch von CXCL2 (Fukuda *et al.* 2003). Beim Rind ist die Funktion von CXCL1-3 im Endometrium weitgehend unerforscht. Eine Studie konnte eine erhöhte CXCL2-mRNA-Expression in Proben von bovinen Plazentomen an der feto-maternalen Kontaktstelle nachweisen, die unmittelbar nach der Geburt des Kalbes entnommen wurden. Ein Zusammenhang konnte zwischen dieser gesteigerten Genexpression und der angeborenen Immunantwort gezeigt werden, die eine wichtige Rolle beim Ablösen der Nachgeburt spielt (Streyl *et al.* 2012).

2.4.5 Interleukin 8 / CXC-Chemokin-Ligand 8

Interleukin 8 wurde 1987 als erstes Chemokin entdeckt (Baggiolini *et al.* 1989). Es gehört zur Familie der CXC-Chemokine und wird daher auch als CXCL8 bezeichnet. IL8 wird als Vorläuferprotein mit 99 Aminosäuren gebildet und nach der Abspaltung von 20 Aminosäuren sekretiert. Extrazellulär wird das reife IL8 am N-Terminus weiter modifiziert, wobei verschieden große Isoformen entstehen, die über biologische Aktivität verfügen. Hauptsächlich wird ein 8,4 kDa großes Peptid gebildet, das aus 72 Aminosäuren besteht (Baggiolini und Clark-Lewis 1992).

Unter den CXC-Chemokinen verfügt IL8 über die stärkste Eigenschaft, neutrophile Granulozyten zu aktivieren und anzulocken (Zlotnik und Yoshie 2000; Rot und von Andrian, Ulrich H. 2004). Darüber hinaus bewirkt IL8 in Neutrophilen einen vorübergehenden Anstieg der intrazellulären Calciumionen (Ca^{2+})-Konzentration, die Degranulation, die Hochregulation von Adhäsionsproteinen sowie die Freisetzung von reaktiven Sauerstoffmetaboliten (Walz *et al.* 1991; Baggiolini 1993). IL8 vermittelt seine Wirkung durch Bindung an die Rezeptoren CXCR1 und CXCR2, die auf Neutrophilen, aber auch auf Monozyten zu finden sind (Bishayi und Samanta 1996). Eine weitere Funktion von IL8 ist die Angiogenese (Li *et al.* 2003), die beim Tumorwachstum und der Metastasenbildung eine Rolle spielt (Strieter *et al.* 1995). Die Produktion von IL8 wird hauptsächlich durch IL1 und TNF ausgelöst, aber verschiedene andere Stimuli wie LPS, Lektine und opsonierte Partikel sind dazu in der Lage (Baggiolini und Clark-Lewis 1992). Die Freisetzung von IL8 nach entsprechenden Stimuli konnte bei Monozyten, Endothelzellen, T-Lymphozyten, Epithelzellen, Fibroblasten, Makrophagen, Hepatozyten, Synovialzellen und Tumorzellen nachgewiesen werden (Mortier *et al.* 2008).

Im bovinen Reproduktionstrakt ist IL8 für physiologische und pathologische Prozesse von Bedeutung. Im Sexualzyklus des Rindes wurde eine erhöhte mRNA-Expression des Chemokins in der prä- und postovulatorischen Phase im Endometrium gefunden (Fischer *et al.* 2010). Dies spricht für eine erhöhte Abwehrbereitschaft des Uterus um den Zeitpunkt der Ovulation durch die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten. IL8 ist als besonders potenter Lockstoff für Neutrophile im bovinen Uterus bekannt (Zerbe *et al.* 2003).

In pathologischen Vorgängen wie der subklinischen und chronischen Endometritis des Rindes ist IL8 von Bedeutung. Fischer *et al.* (2010) konnten eine signifikant erhöhte mRNA-Expression von IL8 in endometrialen Proben von Kühen mit subklinischer und klinischer Endometritis drei Wochen postpartum nachweisen. In einer neueren Studie konnte eine signifikant erhöhte IL8-mRNA-Expression von Kühen mit subklinischer Endometritis im mittleren (24 - 30 Tage postpartum) und späten Puerperium (38 - 44 und 45 - 51 Tage postpartum) festgestellt werden. Bei Kühen mit chronischer Endometritis dagegen war IL8 nur im späten Puerperium (45 - 51 Tage postpartum) erhöht im Vergleich zu gesunden Kühen (Peter *et al.* 2015).

2.4.6 Prostaglandin E₂ und Prostaglandin F_{2α}

Prostaglandine gehören zur Gruppe der Eicosanoide, die durch oxidative Zyklisierung der fünf zentralen Kohlenstoffatome mehrfach ungesättigter C₂₀-Fettsäuren wie der Arachidonsäure gebildet werden (Dubois *et al.* 1998). Die instabile Vorstufe der Prostaglandine, PGH₂, wird durch spezifische Prostaglandinsynthasen zu PGE₂ und PGF_{2α}

LITERATUR

umgewandelt. PGE₂ wird durch eine zytosolische und zwei membrangebundene Synthesen gebildet, die Umwandlung von PGH₂ zu PGF_{2α} wird durch die PGH-9-,11-Endoperoxidreduktase katalysiert. Es existieren noch zwei weitere Enzyme, die PGF_{2α} synthetisieren können. Durch die PGE-9-Ketoreduktase wird PGE₂ zu PGF_{2α} umgewandelt und die PGD-11-Ketoreduktase katalysiert die Umsetzung von PGD₂ zu 11-epi PGF_{2α}, das wie PGF_{2α} natürlich vorkommt (Helliwell *et al.* 2004). Fast alle Gewebearten sind zur Prostaglandinsynthese fähig.

Unmittelbar nach der Synthese werden Prostaglandine von den produzierenden Zellen sekretiert und wirken aufgrund ihrer kurzen Halbwertszeit auto- oder parakrin als Gewebshormone. Die Wirkung von PGE₂ und PGF_{2α} wird über die Bindung an spezifische Rezeptoren vermittelt, die zur Gruppe der Guanosintriphosphat-bindendes Protein (G-Protein)-gekoppelten Rezeptoren mit sieben Transmembrandomänen gehören und von verschiedenen Zellarten und Geweben wie Gehirn, Niere, Gastrointestinaltrakt, Ovar und Uterus exprimiert werden (Tsuboi *et al.* 2002).

Der PGE₂-spezifische Rezeptor EP besitzt vier Subtypen, EP1, EP2, EP3 und EP4, die unterschiedliche Signalwege initiieren und damit eine Vielzahl verschiedener Funktionen vermitteln. EP1 bewirkt eine intrazelluläre Ca²⁺-Mobilisierung, was die Kontraktion glatter Muskelzellen induziert. EP2 und EP4 sind gekoppelt an eine Stimulation der Adenylatzyklase, was den Gehalt an cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) in der Zelle erhöht und zur Relaxation glatter Muskelzellen führt. Die Bindung von PGE₂ an EP3 inhibiert die Adenylatzyklase und damit verbunden die Relaxation glatter Muskelzellen. PGF_{2α} bindet an den Rezeptor FP, der ebenso wie EP1 den intrazellulären Ca²⁺-Spiegel erhöht (Narumiya *et al.* 1999; Sugimoto *et al.* 2015).

In erster Linie sind Prostaglandine für die Schmerzvermittlung zuständig, aber auch in pathologische Vorgänge wie Entzündung, Bluthochdruck und Krebs involviert (Fortier *et al.* 2008). Im Reproduktionstrakt von Wiederkäuern ist die Prostaglandinproduktion durch das Endometrium für physiologische Funktionen wie die Regulation des Sexualzyklus, die Erkennung der Trächtigkeit, das Aufrechterhalten der Trächtigkeit und die Geburt entscheidend (Danet-Desnoyers *et al.* 1995). PGF_{2α} und PGE₂ verfügen dabei vorwiegend über antagonistische Wirkungen. Während des bovinen Sexualzyklus sind die Tage 15 - 17 entscheidend für die Erkennung der Trächtigkeit durch den Uterus. In Abwesenheit eines Embryos wird durch den Uterus eine Serie von PGF_{2α}-Pulsen als Antwort auf eine Änderung des endogenen Oxytocinspiegels freigesetzt, was zur Luteolyse führt (McCracken *et al.* 1999; Parent *et al.* 2003). Dies wird vermutlich durch ein Auto-Amplifizierungssystem für PGF_{2α} im bovinen Corpus luteum unterstützt (Kumagai *et al.* 2014). PGE₂ dagegen verfügt über luteoprotektive Eigenschaften. Bei Anwesenheit eines Embryos wird es von

endometrialen Epithelzellen relativ zu $\text{PGF}_{2\alpha}$ vermehrt gebildet. Dies wird durch Interferon tau, das bei Wiederkäuern von Trophoblastzellen als Signal zur maternalen Erkennung der Trächtigkeit gebildet wird, vermittelt (Asselin *et al.* 1997). Eine neue Studie zeigt, dass Interferon tau die Stimulation der $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Produktion durch bovine endometriale Stromazellen, die durch den Heparin-bindenden epidermalen Wachstumsfaktor (EGF)-ähnlichen Wachstumsfaktor induziert wird, signifikant verringert, nicht aber die Bildung von PGE_2 durch diese Zellen beeinflusst (Takatsu und Acosta 2015). Durch die luteolytische Eigenschaft von $\text{PGF}_{2\alpha}$, die für das Einsetzen der Geburt eine entscheidende Rolle spielt, kann die Geburt durch die exogene Gabe von $\text{PGF}_{2\alpha}$ beim Rind und der Ziege eingeleitet werden (Parent *et al.* 2003). $\text{PGF}_{2\alpha}$ und PGE_2 wirken synergistisch zum Zeitpunkt der Geburt. Sie rufen beide Kontraktionen des Myometriums und eine Relaxation der Zervix hervor, was zum Austreiben der Frucht führt.

$\text{PGF}_{2\alpha}$ und PGE_2 sind ebenso bei pathologischen Prozessen im bovinen Endometrium beteiligt. Baranski *et al.* (2013) wiesen eine gesteigerte Sekretion dieser beiden Prostaglandine im Endometrium von Kühen mit chronischer Endometritis im Vergleich zu gesunden Kühen nach. Kühe mit subklinischer Endometritis zeigten nur eine vermehrte Sekretion von PGE_2 , die $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Expression war nicht signifikant verändert. Des Weiteren konnte in einer anderen Studie eine durch LPS induzierte vermehrte PGE_2 -Produktion beim Rind sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nachgewiesen werden. Der Wechsel von einer $\text{PGF}_{2\alpha}$ - zu einer PGE_2 -Produktion und dadurch bedingter ausbleibender Luteolyse könnte eine Erklärung für verlängerte Lutealphasen bei Kühen mit uterinen Erkrankungen postpartum sein (Herath *et al.* 2009).

2.4.7 Prostaglandin-Endoperoxid-Synthase 2

Die Prostaglandin-Endoperoxid-Synthase (PTGS) ist das geschwindigkeitsbestimmende Enzym in der Prostaglandinbiosynthese. Sie katalysiert die Umwandlung von Arachidonsäure, das durch die Phospholipase A_2 aus Membranphosphotriglyceriden freigesetzt wird, über die Bildung des Zwischenprodukts PGG_2 zu PGH_2 . Diese Reaktionen werden von zwei konservierten katalytischen Zentren der PTGS, die Cyclooxygenase- bzw. Peroxidase-Aktivität aufweisen, vermittelt (Williams und Dubois 1996). PGH_2 dient als Substrat spezifischer Prostaglandinsynthesen für die Herstellung von PGE_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$, PGD_2 und PGI_2 (Dubois *et al.* 1998). Es existieren zwei PTGS-Isoenzyme, PTGS1 und PTGS2, auch bekannt als Cyclooxygenase 1 und 2. PTGS1 wird konstitutiv in vielen Geweben und den meisten Zellen exprimiert. PTGS2 dagegen wird durch Zytokine, verschiedene Wachstumsfaktoren, Tumorpromotoren und mechanischen Stress induziert. Zu den pro-

LITERATUR

inflammatorischen Stimuli gehören unter anderem LPS, TNF, IL1A, IL1B, IL6 und IL8 (Morita 2002). Die Genexpression von PTGS2 kann durch Glukokortikoide sowie anti-inflammatorische Zytokine wie IL4 und IL10 inhibiert werden (Niuro *et al.* 1997). PTGS2 ist ein ungefähr 70 kDa großes Protein, das eine 75 %ige Homologie zu PTGS1 aufweist (Williams und Dubois 1996). Im Unterschied zu PTGS1, deren Aktivität hauptsächlich in der Membran des endoplasmatischen Retikulums lokalisiert ist, übt PTGS2 seine Funktion im endoplasmatischen Retikulum und in der Kernmembran aus (Morita *et al.* 1995).

Im Reproduktionstrakt von Säugetieren ist PTGS2 in Entzündungsprozesse involviert, aber auch für physiologische Vorgänge von Bedeutung. Beim Schaf wurde eine PTGS2-Expression in endometrialen Epithelzellen an Tag 12 - 15 des Sexualzyklus detektiert, die an den darauffolgenden Tagen bis unter das Detektionslimit abnahm. Während der frühen Trächtigkeit fand ein ähnlicher Verlauf der PTGS2-Expression mit einer langsameren Abnahme nach Tag 15 statt (Charpigny *et al.* 1997). Die Expression von PTGS2 im bovinen Endometrium konnte während des gesamten Sexualzyklus gezeigt werden (Fischer *et al.* 2010), auf einem hohem Niveau wird PTGS2 aber nur während der späten Lutealphase und präovulatorischen Phase exprimiert. Eine Expression von PTGS1 ist im Zyklusverlauf im Endometrium nicht detektiert worden, was zu der Schlussfolgerung führt, dass die Prostaglandinsynthese im bovinen Endometrium durch PTGS2 gesteuert wird (Arosh *et al.* 2002). Im entzündeten Endometrium von erstlaktierenden Kühen konnte ebenso eine im Vergleich zu gesunden Kühen gesteigerte PTGS2-Expression nachgewiesen werden, was die Rolle von PTGS2 beim Entzündungsgeschehen im bovinen Endometrium verdeutlicht (Gabler *et al.* 2010).

2.5 Zielsetzung

In der Mikrobiota des bovinen Uterus lassen sich postpartum neben pathogenen Bakterien wie *T. pyogenes* und *E. coli*, die eine Metritis oder Endometritis auslösen können, auch potentiell pathogene Bakterien und Kommensale nachweisen. Die grundlegende Hypothese dieser Arbeit beruht auf der Annahme, dass diese Bakterien in der Lage sind, eine Immunantwort des Uterus auszulösen und am uterinen Entzündungsgeschehen in unterschiedlichem Maße mitzuwirken. Das endometriale Epithel stellt die erste Barriere für in den Uterus eingewanderte Bakterien dar und kann vermutlich differenziert auf Bakterien unterschiedlicher Pathogenität reagieren.

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von autochthonen potentiell pathogenen Bakterien und Laktobazillen auf endometriale Epithelzellen von Milchkühen zu untersuchen. Dafür sollten zunächst Laktobazillen und potentiell pathogene Bakterien aus Rinderuteri mittels Cytobrushmethode isoliert und über mikrobiologische und molekularbiologische Verfahren näher charakterisiert werden. Um die Wirkung der isolierten Bakterien auf endometriale Epithelzellen herauszufinden, wurde eine *in vitro* Methode gewählt, da dabei im Vergleich zu *in vivo* der Einfluss anderer Bakterien ausgeschlossen werden kann. Dafür sollten bovine endometriale Epithelzellen aus Uteri aus dem Schlachthof gewonnen und mit den isolierten potentiell pathogenen Bakterien und Laktobazillen kokultiviert werden. Die Vitalität der kokultivierten endometrialen Epithelzellen sollte bestimmt werden, um einen ersten Eindruck des Einflusses der Bakterien auf die Zellen zu gewinnen. Um eine mögliche Beeinflussung der Immunantwort boviner endometrialer Epithelzellen durch potentiell pathogene und kommensale Bakterien nachzuweisen, sollte die Expression von ausgewählten pro-inflammatorischen Faktoren der kokultivierten Zellen auf mRNA-Ebene bzw. die Freisetzung von Interleukinen und Prostaglandinen untersucht werden.

Um die *in vitro* gefundenen Effekte eines potentiell pathogenen Bakteriums mit der Situation *in vivo* vergleichen zu können, sollte die mRNA-Expression von PMN-anlockenden Faktoren (CXCL-Familie) sowie von Proteinen der Bakterienerkennung (TLR) in endometrialen Proben von Kühen mit chronischer Endometritis, von Kühen mit subklinischer Endometritis und von gesunden Kühen untersucht werden.

3 Darstellung der veröffentlichten Arbeiten

- 3.1 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***

- 3.2 Detection and characterisation of *Lactobacillus* spp. in the bovine uterus and their influence on bovine endometrial epithelial cells *in vitro***

3.1 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*

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*

Martina A. Gärtner^A, Sarah Peter^A, Markus Jung^B, Marc Drillich^C,
Ralf Einspanier^A and Christoph Gabler^{A,D}

^AInstitute of Veterinary Biochemistry, Freie Universität Berlin,
Oertzenweg 19b, 14163 Berlin, Germany.

^BInstitute for the Reproduction of Farm Animals Schönow,
Bernauer Allee 10, 16321 Bernau, Germany.

^CUniversity Clinic for Ruminants, Clinical Unit for Herd Health Management in Ruminants,
Vetmeduni Vienna, Veterinärplatz 1, 1210 Vienna, Austria.

^DCorresponding author. Email: christoph.gabler@fu-berlin.de

Reproduction, Fertility and Development, published online 7 January 2015, © CSIRO 2015
2016, Volume 28, Number 7, Pages 982-994

DOI: 10.1071/RD14219

Abstract. Endometrial epithelium plays a crucial role in the first immune response to invading bacteria by producing cytokines and chemokines. The aim of this study was to investigate the first inflammatory response of the endometrium *in vivo* and *in vitro*. Gene expression of several pro-inflammatory factors and Toll-like receptors (TLR2, -4, -6) was determined in endometrial cytobrush samples obtained from healthy cows and cows with clinical or subclinical endometritis. Endometrial epithelial cells were co-cultured with an isolated autochthonous uterine bacterial strain *Bacillus pumilus*. Total RNA was extracted from *in vivo* and *in vitro* samples and subjected to real-time reverse transcription polymerase chain reaction. CXC ligands (CXCL) 1/2 and CXC chemokine receptor (CXCR) 2 mRNA expression was higher in cows with subclinical endometritis and CXCL3 mRNA expression was higher in cows with clinical endometritis compared with healthy cows. *B. pumilus* induced cell death of epithelial cells within 24 h of co-culturing. The presence of *B. pumilus* resulted in significantly higher mRNA expression of interleukin 1 α (IL1A), IL6, IL8, CXCL1–3 and prostaglandin–endoperoxide synthase 2 in co-cultured cells compared with untreated controls. The maximum increase was mainly detected after 2 h. These results support the hypothesis that bacterial infection of endometrial cells might induce prompt synthesis of pro-inflammatory cytokines resulting in a local inflammatory reaction.

Additional keywords: bovine endometritis, CXC ligands, interleukins, Toll-like receptors.

Introduction

The bovine endometrium fulfils a variety of reproductive and immunological functions. It is essential for reproductive success including nutrition and implantation of the embryo and for maintenance of pregnancy (Bauersachs and Wolf 2013). In addition, the endometrium is also the first line of defence against invading bacteria. It is a physical barrier against pathogens and also involved in the innate immune response by producing cytokines and chemokines that attract and activate polymorphonuclear neutrophils (PMN) and monocytes (LeBlanc *et al.* 2011). To face the challenge of invading bacteria, the local immune system has to undergo a fast switch from the downregulated state during pregnancy to an enhanced function for postpartum clearance of bacteria and tissue debris, followed by a calm state 3–4 weeks later. It is hypothesised that diseases of the reproductive tract can result from a failure in this well-balanced system (LeBlanc 2012).

Several interleukins are secreted as a reaction to bacterial infection and inflammatory processes. In the last few years, research has focussed on revealing a correlation between the expression of such pro-inflammatory factors and uterine diseases. It was observed that the pro-inflammatory cytokines interleukin 1A (IL1A), IL6 and IL8 were more highly expressed in samples obtained from cows with inflamed endometrium compared with healthy

cows in the postpartum period (Gabler *et al.* 2009; Fischer *et al.* 2010). IL8 is an especially potent chemoattractant for neutrophils in the uterus (Zerbe *et al.* 2003). In bovine endometrium explants, IL8 is upregulated *in vitro* in response to both Gram-positive and Gram-negative bacteria (Borges *et al.* 2012).

In addition to IL8, the CXC ligands (CXCL) belong to the group of chemoattracting factors produced by the endometrial epithelium as a reaction to invading bacteria (Sheldon and Roberts 2010). They are members of the chemokine family and play an important role in the innate immune system as essential and selective mediators in migration of leukocytes to inflamed tissues (Reutershan and Ley 2004). CXCL1, -2 and -3 predominantly promote chemotaxis of neutrophils. They interact with the receptor CXCR2, which can be found on neutrophil granulocytes but also on other types of granulocytes, macrophages and endothelial cells (Addison *et al.* 2000).

Further pro-inflammatory factors are prostaglandins, which mediate the inflammatory response of the immune system. Prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (PTGS2) synthesises prostaglandin H₂ (PGH₂), the precursor of different prostaglandins. PTGS2 shows an oestrous cycle-dependent expression in the bovine endometrium (Arosh *et al.* 2002) and higher concentrations in inflamed endometrium compared with healthy endometrium (Gabler *et al.* 2010).

To induce an inflammatory response, it is required that the endometrium detects invading bacteria by pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) via several Toll-like receptors (TLRs). In the bovine endometrium, an important role is played by TLR1, -2 and -6, which form heterodimers for the detection of bacterial lipopeptides, and TLR4, which binds lipopolysaccharide (LPS; Sheldon *et al.* 2014). Endometrial biopsies from infertile endometritic cows in the first week postpartum showed an increased TLR4 mRNA expression compared with fertile healthy cows (Herath *et al.* 2009a).

Bacterial infections of the bovine uterus after parturition often result in metritis and endometritis. The uterine inflammatory and immune response to bacterial infection plays a crucial role in this context. Genital diseases have detrimental effects on reproductive performance in cattle (Dubuc *et al.* 2010). These effects can be explained by endometrial lesions (Amos *et al.* 2014) and by perturbation of hypothalamic and pituitary function (Sheldon *et al.* 2009a). In the last few years, several studies have been published describing the mechanism of inflammation and infection in the bovine endometrium for common pathogens, for example *Escherichia coli* and *Trueperella pyogenes* (Liu *et al.* 2009; Sheldon *et al.* 2010; Chapwanya *et al.* 2013). The diversity of uterine microbiota and interactions between bacterial species (Santos *et al.* 2011; Santos and Bicalho 2012; Wagener *et al.* 2014) shows that further research is required to understand the mechanism for inflammatory

responses within the uterine environment. In addition, potentially pathogenic bacterial species such as *Bacillus* spp. may contribute to the development of genital diseases. *Bacillus licheniformis* is regarded as a bacterial species often isolated from the uterine lumen and cases of endometritis but not commonly associated with uterine lesions (Williams *et al.* 2007). The role of such potentially pathogenic bacteria is still unclear regarding the development of uterine diseases as well as their influence and interaction within a healthy uterus. In addition, potentially pathogenic bacterial species may be useful for examining immunological processes in endometrial cells because they probably do not cause cell death in co-culture as rapidly as pathogenic bacteria.

The aim of this study was to elucidate cellular mechanisms in the endometrium at the beginning of and during inflammatory processes. Influences of potentially pathogenic bacteria were examined by adding them to a standard *in vitro* endometrial epithelial cell-culture model simulating a bacterial infection. The focus of investigation was on the mRNA expression of the above-mentioned candidate genes. Therefore, the objectives of the present study were to investigate: (1) the mRNA expression of PMN-attracting factors (CXCL family) and bacteria-recognising proteins (TLRs) in the endometrial epithelium of cows *in vivo* with different uterine health status, (2) the influence of several bacterial strains isolated from the bovine uterus on the viability of epithelial cells *in vitro* and (3) the mRNA expression of selected pro-inflammatory candidate genes in bovine endometrial epithelial cells co-cultured with a potentially pathogenic bacterial strain as a first response to a bacterial infection.

Materials and methods

Collection of endometrial epithelium samples in vivo

Endometrial epithelium samples for *in vivo* studies of healthy and inflamed endometrium were collected on a commercial dairy farm with around 200 animals in Brandenburg (Germany) from Holstein cows on Days 24–30 postpartum as described previously (Gabler *et al.* 2009). The cows were kept in accordance with the guidelines of the National Animal Welfare Legislation. Group 1 comprised cows ($n = 10$) with signs of clinical endometritis (Sheldon *et al.* 2006) and Group 2 included cows ($n = 10$) with subclinical endometritis (proportion of PMN $\geq 5\%$ in the cytological samples; Gilbert *et al.* 2005; Gabler *et al.* 2009). Group 3 consisted of healthy cows ($n = 10$) with neither signs of clinical nor subclinical endometritis. Samples for endometrial evaluation and for mRNA analysis were collected using the cytobrush method (Kasimanickam *et al.* 2004; Gabler *et al.* 2009). After collection, the samples were immediately placed into liquid nitrogen, transported to the laboratory and stored at -80°C until RNA isolation. Endometrial samples for cytological analysis determining the percentage of PMN were processed as described previously (Gabler *et al.* 2009).

Isolation and culture of uterine bacteria under acidic conditions

Bacteriological samples for *in vitro* studies were obtained from the uteri of 39 Holstein–Friesian cows on Days 40–90 postpartum. Cows were kept on three commercial dairy farms in Brandenburg (Germany) in accordance with the guidelines of the National Animal Welfare Legislation. Animals used for this study showed no signs of genital diseases and were not pregnant. For bacteriological cultures, one sample was collected from the uterus of each cow with the cytobrush method as described previously (Westermann *et al.* 2010). The samples were transported in culture medium (MRS broth according to DeMan, Rogosa and Sharpe; Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) to the laboratory and were cultured aerobically on MRS agar (Sigma-Aldrich) at 37°C for up to 72 h to detect non-pathogenic and potentially pathogenic bacteria. Bacteria of single colonies were enriched in MRS broth, subcultured three times and plated on blood agar (Merck, Darmstadt, Germany) to ensure the purity of the bacterial strains. All isolates were stored at –80°C in 15% glycerol for further experiments.

Classification of bacterial species

First identification of bacterial species was based on the results of Gram stain, morphology and catalase reaction. Furthermore, 16S rDNA was amplified by a phylogenetic polymerase chain reaction (PCR; Weisburg *et al.* 1991) with some modifications. For this purpose, DNA was extracted from bacterial enrichments using QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. The yield of DNA was quantified photometrically at 260 nm. The PCR mixture of 25 µL for each sample contained 0.4 µM of each primer (forward: 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3', reverse: 5'-AAG GAG GTG ATC CAG CC-3'; synthesised by Eurofins MWG, Ebersberg, Germany), 0.4 mM each dNTP, 1.5 mM MgCl₂, 1× Immobuffer, up to 200 ng of genomic bacterial DNA and 0.5 U Immolase (all Fermentas, St. Leon-Roth, Germany). Subsequently, the PCR products were subjected to 1% agarose gel electrophoresis containing ethidium bromide and extracted from the gel using Invisorb Spin DNA Extraction Kit (Stratec, Berlin, Germany) following the manufacturer's instructions. Sequencing of the PCR products (GATC Biotech, Konstanz, Germany) with forward and reverse primers provided specific sequence information. Comparison of the overlapped sequences with the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database revealed the homology of the specific bacterial strains.

Isolation and culture of endometrial epithelial cells

All media, antibiotics and serum were purchased from Biochrom (Berlin, Germany). Endometrial epithelial cells were isolated and cultured as described previously (Betts and Hansen 1992) with some modifications. Briefly, bovine uteri were collected from non-pregnant cows at a local slaughterhouse within 15 min of death, placed on ice and

transported to the laboratory. Only uteri with no visible signs of inflammation were used for the isolation of endometrial cells. Isolated cells were suspended in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)/Ham's F-12 medium containing 10% fetal bovine serum (FBS), 55 $\mu\text{g mL}^{-1}$ gentamicin and 1.4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ amphotericin B. The cell suspension was incubated in 25-cm² culture flasks for 18 h to allow a selective attachment of stromal cells. After this time, the cell suspension was removed and re-seeded to get a pure epithelial cell population (Sheldon *et al.* 2010). Cells were cultured at 37°C and 5% CO₂ in a humidified incubator. The morphology of the cells was used to distinguish between epithelial and stromal cells (Fortier *et al.* 1988). To prove cell type and purity of epithelial cells, immunocytochemistry against pan-keratins was performed as described previously (Miessen *et al.* 2012). 100% pure epithelial cell culture was observed in the second passage.

Co-culturing of endometrial cells with isolated bacteria

A standard *in vitro* endometrial epithelial cell-culture model simulating a bacterial infection was adapted to our laboratory (Kim *et al.* 1994). Endometrial epithelial cells were cultured in cell-culture flasks (Corning, Corning, NY, USA) until they reached confluence in the first passage. Then they were seeded in 24-well plates (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany) at a density of 8×10^4 cells in 500 μL medium for viability assay and in 6-well plates (Greiner Bio-One) with 3×10^5 cells in 4 mL medium for mRNA expression analysis. Epithelial cells were cultured in the second passage until confluence, prepared for co-culturing by removing the medium and washing twice with Dulbecco's phosphate-buffered saline (PBS; PAA, Cölbe, Germany). Several bacterial strains were tested in preliminary experiments. The bacteria from the glycerol stocks were grown for 24 h in LB broth (according to Luria and Bertani; Carl Roth, Karlsruhe, Germany) or MRS broth at 37°C, harvested by centrifugation at 3800g for 10 min at 20°C, washed once with PBS to remove toxins, resuspended in LB broth containing 20% glycerol or in PBS, respectively, and stored at -80°C. Plate counting on LB agar (Carl Roth) or MRS agar after thawing was used to determine the number of colony forming units (CFU) mL⁻¹. For co-culturing with epithelial cells, bacteria were thawed and diluted in epithelial cell culture medium without antibiotics for the required concentrations as described below in detail for the different assays.

Viability assay

Different isolated bacterial species were co-cultured with endometrial epithelial cells for up to 48 h to examine their influence on the viability of epithelial cells. Bacteria were added to epithelial cells in the second passage in fresh medium free of antibiotics in different multiplicities of infection (MOI = 1, 5 and 10). After 24 and 48 h, the medium was aspirated and washed twice with PBS. Dead cells were stained with a 1:1 mixture of 0.5% (w/v)

Trypan blue (Serva, Heidelberg, Germany) and PBS. Several optical fields were considered and pictures were taken with the microscope (100× magnification, Axiovert 25; Carl Zeiss, Göttingen, Germany). Cells cultured with the same medium but without bacteria served as controls. Each experiment was performed with epithelial cells isolated from three different cows.

Messenger RNA expression in co-cultured endometrial epithelial cells

A bacterial strain that appeared to be potentially pathogenic based on the results of the viability assay was selected for studying short-term effects on epithelial cells. Therefore, co-culturing was performed for up to 6 h to reveal the mRNA expression pattern of pro-inflammatory factors in the co-cultured epithelial cells. Epithelial cells from five different cows in the second passage were co-cultured with the selected strain in MOI 1, 5 and 10 in epithelial cell culture medium without antibiotics. Untreated cells served as controls. After 2, 4 and 6 h, the medium was removed, cells were washed twice with PBS and lysed with lysis buffer TR (Stratec). Control cells were also lysed at 0 h. The lysates were stored at -80°C until further use. In addition, the viability of the epithelial cells was monitored by Trypan blue staining as mentioned above after 2, 4 and 6 h of co-culture.

Extraction of total RNA and reverse transcription

Total RNA was isolated from *in vivo* endometrial cell samples using RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen) following the manufacturer's instructions with slight modifications. The lysis buffer was directly added to each cytobrush and subsequently mixed thoroughly to disrupt the cells. After removing the cytobrush with clean forceps, the subsequent procedure was performed according to the manufacturer's protocol. Lysed co-cultured endometrial cells from *in vitro* experiments were subjected to KingFisher Flex (Thermo Scientific, Langenselbold, Germany) for total RNA extraction using InviMag Universal RNA Kit (Stratec) following the manufacturer's instructions. RNA concentration was measured photometrically at 260 nm and total RNA was stored at -80°C . Quality and integrity of the extracted RNA was verified using the Agilent 2100 Bioanalyzer (RNA 6000 Nano Chip; Agilent, Waldbronn, Germany).

Reverse transcription (RT) of RNA was performed as described previously (Oda *et al.* 2006). In brief, 0.5 μg of total RNA was treated with DNase. Complementary DNA was synthesised using 2.5 μM random hexamers, 0.66 mM each dNTP, 1× RT buffer and 200 U RevertAid reverse transcriptase (all Fermentas) in a total volume of 60 μL . The generated cDNA served as template for real-time PCR and was stored at -20°C until use. Negative controls omitting the reverse transcriptase served to monitor the absence of any genomic DNA or contaminations.

Real-time PCR

Messenger RNA expression of pro-inflammatory factors in *in vivo* endometrial samples and *in vitro* co-cultured endometrial epithelial cells was quantified by performing SYBR Green I real-time PCR using the Rotor Gene 3000 (Corbett Research, Mortlake, Vic., Australia) as described in detail (Odau *et al.* 2006). In brief, real-time PCR was performed following the minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments (MIQE) guidelines (Bustin *et al.* 2009) with 1 μ L cDNA, 0.4 μ M of each primer (details are given in Table 1; synthesised by Eurofins MWG) and 1 \times SensiMix Low-ROX (Bioline, Luckenwalde, Germany) in a total volume of 10 μ L. Cycling conditions were as follows: 10 min at 95°C, 45 cycles of 15 s at 95°C, 20 s at the indicated annealing temperature (Table 1) and 30 s at 72°C. Specific amplification was confirmed by melting-point analysis. Serial dilutions of PCR products with known concentrations generated in a conventional PCR served as a standard. The content of mRNA of the selected factors was calculated using the standard curves and Rotor Gene 6.1 software (Corbett Research). Amplicon identity was confirmed by commercial sequencing (GATC Biotech).

Statistical analysis

Gene expression of *in vivo* and *in vitro* samples was normalised with the corresponding normalisation factor calculated with the expression of reference genes (*in vivo*: suppressor of zeste 12 homologue (SUZ12) and 18S rRNA; *in vitro*: β actin (ACTB); succinate dehydrogenase complex, subunit A (SDHA) and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH); Table 2) by geNorm (Vandesompele *et al.* 2002). Normalised data was used for statistical analysis and for the generation of bar charts.

Normalised values obtained from endometrial samples harvested at the farm on Days 24–30 postpartum were analysed by Mann–Whitney U test. In this statistical test, samples from cows with healthy endometrium were compared with samples obtained from cows with clinical or subclinical endometritis. Bars represent mean \pm s.e.m. from the data of 10 cows per group.

Bar charts for the data from *in vitro* samples were generated setting the expression in control cells at 0 h to equal 1. The expression in controls and treatments at each point in time was calculated in relation to this value. Bars represent the mean \pm s.e.m. ($n = 5$). Analysis of normalised means obtained from cell-culture samples were performed using the Wilcoxon signed-rank test by comparing each MOI with the control at the same point in time.

All statistical calculations were performed with SPSS version 20 (SPSS, Chicago, IL, USA). *P* values <0.5 were considered as significant.

Results

Analysis of healthy and inflamed bovine endometrial samples collected in vivo

Classification of the sampled cows into stages of the oestrous cycle

Observations from palpation of the uterus per rectum and ultrasonography were used to classify the cows at the dairy farm: 21 animals were in the luteal phase (corpus luteum detected) and nine cows were non-cyclic previous to their first oestrous phase after parturition (neither Graafian follicle nor corpus luteum). The observed hormonal status on Days 24–30 postpartum did not influence the mRNA expression pattern of all investigated factors in the endometrial epithelium (data not shown).

Expression of CXCL1/2, -3 and CXCR2 mRNA

The sequences for *CXCL1* and *CXCL2* are 99% homologous. Therefore, the primers named *CXCL1/2* were specific for *CXCL1* as well as for *CXCL2*. The sequences for the amplicons obtained were 100% homologous to *CXCL1* and *CXCL2*. Expression of *CXCL1/2* and -3 mRNA was observed in healthy and inflamed endometrial epithelium samples collected on Days 24–30 postpartum with significant differences between uterine health status. In detail, cows with clinical endometritis showed a 10-fold higher mean expression of *CXCL1/2* compared with healthy cows, but statistical significance was not reached ($P = 0.07$; Fig. 1a). In contrast, a significant difference of *CXCL1/2* mRNA expression (~5-fold) was observed between cows with subclinical endometritis and healthy ones. Only cows with clinical endometritis showed statistical difference in *CXCL3* mRNA expression compared with samples from healthy cows ($P = 0.004$; ~2-fold; Fig. 1b).

Messenger RNA for the corresponding receptor for *CXCL1–3*, *CXCR2*, was detected in all samples with differences according to health status. Cows with subclinical endometritis showed on average a 5-fold higher expression of *CXCR2* mRNA than healthy cows ($P = 0.004$; Fig. 1c). In addition, *CXCR2* mRNA expression was ~30-fold higher in the samples of cows with clinical endometritis compared with healthy samples, but failed to reach statistical significance.

Expression of TLR2, TLR4 and TLR6 mRNA

In the bovine luminal endometrial epithelium, transcripts of *TLR2*, -4 and -6 were detected. The absolute expression of *TLR2* was low in samples collected on Days 24–30 postpartum independently from health status of the cows (Fig. 2a). In some samples, *TLR2* expression was below the detection limit. *TLR4* mRNA expression of cows with subclinical and clinical endometritis was around 2-fold and 5-fold higher than healthy cows, respectively, with great inter-individual variations. A significant difference in *TLR4* expression was not detected (Fig. 2b). *TLR6* mRNA expression was at a low level in endometrial samples from cows with different health status and did not differ between these three groups (Fig. 2c).

Bacteriology of bovine uterine samples

Uterine cytobrush samples were taken from 39 healthy lactating Holstein–Friesian cows for *in vitro* studies. Five samples were negative under acidic growth conditions for bacterial culture; in 34 samples bacteria were detected. Only one bacterial species could be isolated from 13 samples and in 26 cytobrush samples two or more bacterial species were isolated. Sequencing of 16S rDNA amplicons of the isolates revealed the presence of different potentially pathogenic and non-pathogenic bacterial species in the bovine uterus. Several Gram-positive lactic acid bacteria like *Weissella* spp., *Aerococcus* spp. and *Pediococcus* sp. were detected. Gram- and catalase-positive bacilli, staphylococci and corynebacteria were also identified. In detail, the sequences obtained from three isolates showed the following high homologies to sequences available in the database: 99% to *Bacillus pumilus*, 99% to *Staphylococcus succinus* and 98% to *Weissella paramesenteroides*. Therefore, the bacterial strains obtained will be named according to their homologous sequences in the following sections.

Viability assay

Co-culture experiments with bovine endometrial epithelial cells were performed with the three isolates – *B. pumilus*, *St. succinus* and *W. paramesenteroides* – for 24–48 h to examine their influence on the viability of the co-cultured epithelial cells. More than 95% of endometrial epithelial cells in co-culture with *B. pumilus* in MOI 1 (Fig. 3a), 5 (Fig. 3b) and 10 (Fig. 3c) showed violet staining by Trypan blue within 24 h, which is a sign for dead cells, compared with controls cultured without bacteria (Fig. 3f). In addition, epithelial cells detached from the bottom of the culture plates. However, epithelial cells were still alive (>95%) after co-culture with *B. pumilus* in MOI 1–10 up to 6 h without a difference in the proportion of dead cells compared with controls (data not shown).

Almost all cells died in co-culture with *St. succinus* in all MOI within 24 h (Fig. 3d), but the epithelial cells were still connected to the bottom of the culture plates in contrast to *B. pumilus*. However, the percentage of dead epithelial cells (<5%) was similar to the control (Fig. 3f) in co-culture with *W. paramesenteroides* in MOI 1 (Fig. 3e), 5 and 10 after 24 h and 48 h.

B. pumilus showed the most destructive characteristics in co-culture with endometrial epithelial cells in comparison with *St. succinus* and *W. paramesenteroides* after 24 h. Therefore, *B. pumilus* was selected for further *in vitro* experiments to detect first reactions of endometrial epithelial cells in co-culture with this potentially pathogenic bacterium.

Expression of selected candidate gene mRNA in endometrial epithelial cells co-cultured with B. pumilus in vitro

Expression of IL1A, IL6 and IL8 mRNA

A 10-fold higher IL1A mRNA expression was observed in endometrial cells co-cultured with *B. pumilus* in all MOI after 2 h in comparison with untreated cells ($P < 0.05$; Fig. 4a). The IL1A mRNA expression decreased to around 5-fold higher expression in co-cultured cells after 4 h, again reaching a high level (~13-fold) after 6 h compared with control cells.

Endometrial epithelial cells showed a significantly higher IL6 mRNA expression in co-culture with *B. pumilus* in all MOI after 2–6 h compared with untreated cells (Fig. 4b). IL6 mRNA expression was increased for MOI 5 and 10 independent of time of co-culture but there were great variations between the individual animals. The numerically highest IL6 expression was observed for MOI 1 after 2 h.

IL8 mRNA was present in untreated as well as in co-cultured cells (Fig. 4c). An expression pattern similar to IL1A was detected with a maximum IL8 expression in all MOI after 2 h, a decline after 4 h and a slight increase after 6 h ($P < 0.05$).

CXCL1/2, CXCL3 and CXCR2 mRNA expression

Significant differences in CXCL1/2 expression were detected in bovine endometrial epithelial cells co-cultured with *B. pumilus* compared with control cells (Fig. 5a). The expression of CXCL1/2 was highest in endometrial cells in the presence of *B. pumilus* in all MOI (about 10-fold; $P < 0.05$) after 2 h compared with 4 h and 6 h. However, endometrial cells co-cultured with *B. pumilus* in MOI 5 and 10 showed an only 2–3-fold higher expression after 4 h compared with the controls ($P < 0.05$). Two hours later, differences in CXCL1/2 mRNA expression between co-cultured and untreated endometrial epithelial cells in all MOI again reached a higher level (about 6-fold; $P < 0.05$).

In addition, the presence of *B. pumilus* influenced CXCL3 mRNA expression in endometrial epithelial cells (Fig. 5b). CXCL3 expression was about 9-fold higher in co-cultured cells after 2 h compared with control cells ($P < 0.05$). Although CXCL3 expression was numerically higher after 4 h in cells treated with *B. pumilus*, the difference was not significant. After 6 h, an approximately 5-fold higher significant expression was observed in co-cultured cells compared with control cells.

CXCR2 expression was not detected in bovine endometrial epithelial cells independently of the status of co-culture and time (data not shown).

Expression of PTGS2 mRNA

The PTGS2 expression pattern was rather similar to IL6 (Fig. 5c). PTGS2 expression was high at all times in endometrial cells co-cultured with *B. pumilus* compared with

untreated control cells ($P < 0.05$). The highest difference in PTGS2 expression between co-cultured and untreated cells was observed after 6 h (about 8-fold). In untreated cells, an increase of the PTGS2 mRNA expression was observed after 2 h compared with 0 h and decreased thereafter (4 h and 6 h).

Expression of TLR2 and TLR6 mRNA

TLR2 and TLR6 expression was observed in untreated as well as in co-cultured endometrial cells up to 6 h (Fig. 6a, b). A significantly higher TLR2 expression was only detected after 4 h in MOI 10 and after 6 h in MOI 5 compared with controls at the same point in time. TLR6 expression did not differ significantly between endometrial epithelial cells co-cultured with *B. pumilus* and cells without bacteria, but slightly decreased in MOI 5 and 10 after 6 h.

Discussion

After parturition, invasion of aerobic and anaerobic bacteria in the uterus is common in dairy cattle (Singh *et al.* 2008). The endometrial epithelium is the first line of the immune response against invading bacteria by recognising them with Toll-like receptors (Davies *et al.* 2008). Findings in the present study support this concept. TLR2, -4 and -6 were expressed in endometrial samples from cows with different health status and in cultured endometrial epithelial cells (TLR2 and -6). This is in accordance with a previous study that showed that bovine endometrial epithelial and stromal cells are able to detect and respond to bacterial lipopeptides with TLR1, -2 and -6 (Turner *et al.* 2014). Cronin *et al.* (2012) reported that TLR4 is essential for the response of bovine endometrial epithelial and stromal cells to LPS. Furthermore, Silva *et al.* (2012) described the ability of the bovine endometrium to respond to abortive agents during pregnancy by expression of TLRs.

The next step in the immune response is the secretion of chemokines by endometrial epithelial cells to attract PMN to the site of infection (LeBlanc 2012). In the last decade, CXCL chemokines in addition to IL8 have gained in importance to immunological studies of the endometrium in humans and animals (Sentman *et al.* 2004; Imakawa *et al.* 2006; Mokhtar *et al.* 2010; Baston-Bust *et al.* 2013; Gong *et al.* 2014). In the present study, significantly higher mRNA expression of the ligands CXCL1–3 and their corresponding receptor CXCR2 was detected in cows with an inflamed endometrium compared with healthy cows. Similar expression changes were observed in human studies. A higher CXCL1 expression was described *in vivo* and *in vitro* in endometrial epithelial cells of women with chronic endometritis compared with healthy endometrium (Kitaya and Yasuo 2010). Furthermore, increased expression of CXCL2 in human decidual cells was observed after pro-inflammatory stimulation (Huang *et al.* 2006). In the present study, a significantly higher CXCL1/2 and CXCR2 expression was only found in cows with subclinical endometritis,

indicating that these chemokines might be potential markers for subclinical endometritis. In contrast, CXCL3 might be an indicator for clinical endometritis.

In vitro experiments were performed to simulate a bacterial infection with the isolated *St. succinus*, *W. paramesenteroides* and *B. pumilus*, bacterial species not known as endometrial pathogens. Common pathogens associated with clinical endometritis such as *E. coli* and *T. pyogenes* seem to play a minor role in subclinical endometritis (Sens and Heuwieser 2013), thus further studies are required to detect lesser-known bacterial species that may be involved in the development of subclinical endometritis. In the present study, viability assays with bovine endometrial epithelial cells revealed cytotoxic capabilities of *B. pumilus*. This bacterium is a ubiquitous soil organism and is also found in the inner tissues of plants (Logan and De Vos 2009). In addition, *B. pumilus* is part of the microbiota in the gastrointestinal tract of humans, broilers and cattle (Barbosa *et al.* 2005; Fakhry *et al.* 2008; Rafii *et al.* 2009). Previous studies have demonstrated the presence of *Bacillus* spp. in the bovine postpartum uterus (Hussain *et al.* 1990; Bonnett *et al.* 1991; Dolezel *et al.* 2010). Moreover, *B. pumilus* was isolated from the cervico–vaginal mucus or uterus of normal fertile and repeat-breeder cows (Panangala *et al.* 1978; Messier *et al.* 1984). But up to now, *B. pumilus* was not known as a potentially pathogenic bacterial species concerning endometritis. *B. pumilus* seems to have opportunistic facilities i.e. it is not an obligate pathogen, but can take advantage when the host's resistance is lowered. This is the case in an *in vitro* system in the absence of immune cells. Previous studies support the hypothesis of the pathogenic potential of *B. pumilus* in cattle. Cytotoxic substances produced by *B. pumilus* were isolated from mastitic cow milk (Nieminen *et al.* 2007) and from tissue of a cow that died of septicaemia (Hare *et al.* 2008). Furthermore, in humans *B. pumilus* was occasionally implicated in cases of foodborne illness (Suominen *et al.* 2001; From *et al.* 2007) and in infections of immunocompromised patients (Logan 2012).

Increased expression of CXCL1/2 and -3 in co-cultured endometrial epithelial cells was induced by the presence of *B. pumilus* in all MOI after 2 h. This peak of expression in co-cultured cells may be interpreted as a very early reaction of the endometrial cells to this inflammatory stimulus for attracting PMN. Also in mice, higher CXCL1 expression was shown in endometrial epithelial and stromal cells after stimulation with LPS purified from *E. coli* (Sheldon and Roberts 2010). As expected, CXCR2 was not detected in the co-cultured endometrial epithelial cells because of the absence of immune cells, indicating that the observed immune response was independent of immune cells.

A similar time course to the CXCL1/2 and -3 expression was observed for the mRNA expression of IL1A and IL8 in co-cultured cells with peak expression after 2 h. The pro-inflammatory cytokine IL1A plays a central role in the inflammatory process, thus the early

reaction of bovine endometrial cells to *B. pumilus* by producing IL1A could be expected (Dinarelo *et al.* 2012). These findings are consistent with previous studies. IL1A expression was increased 1 week postpartum in four cows with persistent endometritis that failed to conceive compared with four healthy fertile cows (Herath *et al.* 2009a). Furthermore, IL1A expression was higher in endometrial samples from cows with clinical and subclinical endometritis compared with healthy cows 3 weeks postpartum (Gabler *et al.* 2009). In addition to the role in inflammatory processes in the bovine uterus, previous studies showed luteotrophic facilities of IL1A during the luteal phase of the oestrous cycle by promoting the release of prostaglandin E₂ (PGE₂; Tanikawa *et al.* 2005; Majewska *et al.* 2010).

IL8 is an important chemoattractant for neutrophils (Nomiya *et al.* 2010). Rapid production of IL8 by the endometrium contributes to the bacterial clearance in the postpartum period. Previous studies have shown that IL8 expression is increased in cows with severe uterine inflammation 2 weeks postpartum compared with healthy cows (Chapwanya *et al.* 2009; Gabler *et al.* 2010) and in cows with subclinical and clinical endometritis 3 weeks postpartum (Fischer *et al.* 2010). The possibility of predicting subclinical endometritis in cows by measuring IL8 gene expression was reported underlining the importance of IL8 during inflammatory processes of the endometrium (Ghasemi *et al.* 2012). Sheldon *et al.* (2010) showed that endometrial epithelial cells treated with LPS purified from the endometrial pathogen *E. coli* produced more IL8 compared with non-pathogenic *E. coli*.

IL6 is mainly produced by macrophages and monocytes (Bell *et al.* 2004) and acts as an activator of acute-phase responses and as a lymphocyte stimulatory factor. Higher IL6 expression was observed in samples from inflamed bovine endometrium 2 weeks postpartum compared with healthy controls (Chapwanya *et al.* 2009; Gabler *et al.* 2010). In contrast to these findings, no significant difference in IL6 expression was detected in endometrial samples from healthy, subclinical and clinical endometritic cows 3 weeks postpartum (Fischer *et al.* 2010). In the present study, IL6 was expressed in endometrial epithelial cells at a high level during co-culture with *B. pumilus*. The increased expression of this common pro-inflammatory factor is in accordance with the higher IL6 expression in bovine endometrial epithelial cells stimulated with *E. coli* (Chapwanya *et al.* 2013). In that trial, IL6 expression was decreasing after 24 h, indicating that IL6 represents an early reaction of the bovine endometrium to bacterial infection. Further studies reported that mRNA or protein expression of IL1B, IL6 and IL8 was increased in endometrial epithelial cells treated with LPS (Cronin *et al.* 2012), *E. coli* or *T. pyogenes* (Borges *et al.* 2012). These findings and our results indicate that not only pathogenic but also potentially pathogenic bacteria stimulate the uterine immune response.

PTGS2 is a key enzyme in the production of prostaglandin F_{2α} (PGF_{2α}) and

prostaglandin E₂ (PGE₂) (Fortier *et al.* 2008). Increased PTGS2 expression was observed in endometrial cells stimulated by *E. coli* or LPS (Herath *et al.* 2006). Our results are consistent with these findings. Bovine endometrial epithelial cells showed a high level of PTGS2 expression in all MOI all the time. A previous study showed an increased PGE₂ synthesis in collected cytobrush samples from cows with subclinical and clinical endometritis as well as PGF_{2α} in clinical endometritic cows (Barański *et al.* 2013). Furthermore, a switch from PGF_{2α} to PGE₂ release by endometrial cells was detected after stimulation with LPS (Herath *et al.* 2009b). This mechanism is assumed to cause prolonged luteal phases after uterine infections (Sheldon *et al.* 2009b). Further research is required to elucidate if these mechanisms can also be induced by other toxins produced by bacteria, e.g. by *B. pumilus*.

In conclusion, the transcript amounts of CXCL1/2 and their receptor CXCR2 was higher in endometrial samples of cows with subclinical endometritis and of CXCL3 in clinical endometritic cows compared with samples from a healthy endometrium. This *in vivo* observation suggests that these factors are involved in an inflammatory response caused by bacteria. This was confirmed by *in vitro* findings. Bovine endometrial epithelial cells showed an increased mRNA expression of PMN-attracting factors (CXCL1–3, CXCR2 and IL8) as well as pro-inflammatory factors (IL1A, IL6 and PTGS2) in up to 6 h of co-culture with an isolated *B. pumilus*. These results suggest that not only pathogens but also potential pathogens and opportunistic contaminants may play a role in the inflammatory stimulation of endometrial cells. In addition, this supports the hypothesis that the endometrium has the ability to react promptly to bacterial infections in a first immune response. Further studies are required to verify these *in vitro* findings *in vivo*.

Acknowledgements

We thank Schlachtbetrieb GmbH Perleberg (Perleberg, Germany) for the opportunity to harvest tissues for cell culture and acknowledge the cooperation with the dairy farms. We are also grateful to Christoph Holder for technical assistance. This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (GA 1077/5–1).

References

- Addison, C. L., Daniel, T. O., Burdick, M. D., Liu, H., Ehlert, J. E., Xue, Y. Y., Buechi, L., Walz, A., Richmond, A., and Strieter, R. M. (2000). The CXC chemokine receptor 2, CXCR2, is the putative receptor for ELR+ CXC chemokine-induced angiogenic activity. *J. Immunol.* **165**, 5269–5277. doi:10.4049/JIMMUNOL.165.9.5269
- Amos, M. R., Healey, G. D., Goldstone, R. J., Mahan, S. M., Düvel, A., Schuberth, H.-J., Sandra, O., Zieger, P., Dieuzy-Labayé, I., Smith, D. G., and Sheldon, I. M. (2014). Differential endometrial cell sensitivity to a cholesterol-dependent cytolysin links

- Trueperella pyogenes* to uterine disease in cattle. *Biol. Reprod.* **90**, 54. doi:10.1095/BIOLREPROD.113.115972
- Arosh, J. A., Parent, J., Chapdelaine, P., Sirois, J., and Fortier, M. A. (2002). Expression of cyclooxygenases 1 and 2 and prostaglandin E synthase in bovine endometrial tissue during the estrous cycle. *Biol. Reprod.* **67**, 161–169. doi:10.1095/BIOLREPROD67.1.161
- Baranski, W., Lukasik, K., Skarzynski, D., Sztachanska, M., Zdunczyk, S., and Janowski, T. (2013). Secretion of prostaglandins and leukotrienes by endometrial cells in cows with subclinical and clinical endometritis. *Theriogenology* **80**, 766–772. doi:10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2013.07.001
- Barbosa, T. M., Serra, C. R., La Ragione, R. M., Woodward, M. J., and Henriques, A. O. (2005). Screening for bacillus isolates in the broiler gastrointestinal tract. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 968–978. doi:10.1128/AEM.71.2.968-978.2005
- Baston-Bust, D. M., Schanz, A., Boddeker, S. J., Altergot-Ahmad, O., Krussel, J.-S., Rein, D., and Hess, A. P. (2013). CXCL1 expression in human decidua *in vitro* is mediated via the MAPK signalling cascade. *Cytokine* **64**, 79–85. doi:10.1016/J.CYTO.2013.07.023
- Bauersachs, S., and Wolf, E. (2013). Immune aspects of embryo-maternal cross-talk in the bovine uterus. *J. Reprod. Immunol.* **97**, 20–26. doi:10.1016/J.JRI.2012.11.002
- Bell, M. J., Hallenbeck, J. M., and Gallo, V. (2004). Determining the fetal inflammatory response in an experimental model of intrauterine inflammation in rats. *Pediatr. Res.* **56**, 541–546. doi:10.1203/01.PDR.0000139407.89883.6B
- Betts, J. G., and Hansen, P. J. (1992). Regulation of prostaglandin secretion from epithelial and stromal cells of the bovine endometrium by interleukin-1 beta, interleukin-2, granulocyte-macrophage colony stimulating factor and tumor necrosis factor-alpha. *Life. Sci.* **51**, 1171–1176. doi:10.1016/0024-3205(92)90520-Y
- Bonnett, B. N., Martin, S. W., Gannon, V. P., Miller, R. B., and Etherington, W. G. (1991). Endometrial biopsy in Holstein-Friesian dairy cows. III. Bacteriological analysis and correlations with histological findings. *Can. J. Vet. Res.* **55**, 168–173.
- Borges, A. M., Healey, G. D., and Sheldon, I. M. (2012). Explants of intact endometrium to model bovine innate immunity and inflammation *ex vivo*. *Am. J. Reprod. Immunol.* **67**, 526–539. doi:10.1111/J.1600-0897.2012.01106.X
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J., and Wittwer, C. T. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.* **55**, 611–622. doi:10.1373/CLINCHEM.2008.112797
- Chapwanya, A., Meade, K. G., Doherty, M. L., Callanan, J. J., Mee, J. F., and O'Farrelly, C. (2009). Histopathological and molecular evaluation of Holstein-Friesian cows postpartum:

- Toward an improved understanding of uterine innate immunity. *Theriogenology* **71**, 1396–1407. doi:10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2009.01.006
- Chapwanya, A., Meade, K. G., Doherty, M. L., Callanan, J. J., and O'Farrelly, C. (2013). Endometrial epithelial cells are potent producers of tracheal antimicrobial peptide and serum amyloid A3 gene expression in response to *E. coli* stimulation. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **151**, 157–162. doi:10.1016/J.VETIMM.2012.09.042
- Cronin, J. G., Turner, M. L., Goetze, L., Bryant, C. E., and Sheldon, I. M. (2012). Toll-like receptor 4 and MYD88-dependent signaling mechanisms of the innate immune system are essential for the response to lipopolysaccharide by epithelial and stromal cells of the bovine endometrium. *Biol. Reprod.* **86**, 51. doi:10.1095/BIOLREPROD.111.092718
- Davies, D., Meade, K., Herath, S., Eckersall, P., Gonzalez, D., White, J., Conlan, R., O'Farrelly, C., and Sheldon, I. M. (2008). Toll-like receptor and antimicrobial peptide expression in the bovine endometrium. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **6**, 53. doi:10.1186/1477-7827-6-53
- Dinarello, C. A., Simon, A., van der Meer, and Jos W. M. (2012). Treating inflammation by blocking interleukin-1 in a broad spectrum of diseases. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **11**, 633–652. doi:10.1038/NRD3800
- Dolezel, R., Palenik, T., Cech, S., Kohoutova, L., and Vyskocil M. (2010). Bacterial contamination of the uterus in cows with various clinical types of metritis and endometritis and use of hydrogen peroxide for intrauterine treatment. *Vet. Med. (Praha)* **55**, 504–511.
- Dubuc, J., Duffield, T. F., Leslie, K. E., Walton, J. S., and LeBlanc, S. J. (2010). Definitions and diagnosis of postpartum endometritis in dairy cows. *J. Dairy Sci.* **93**, 5225–5233. doi:10.3168/JDS.2010-3428
- Fakhry, S., Sorrentini, I., Ricca, E., Felice, M. de, and Baccigalupi, L. (2008). Characterization of spore forming Bacilli isolated from the human gastrointestinal tract. *J. Appl. Microbiol.* **105**, 2178–2186. doi:10.1111/J.1365-2672.2008.03934.X
- Fischer, C., Drillich, M., Odau, S., Heuwieser, W., Einspanier, R., and Gabler, C. (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. doi:10.1071/RD09120
- Fortier, M. A., Guilbault, L. A., and Grasso, F. (1988). Specific properties of epithelial and stromal cells from the endometrium of cows. *J. Reprod. Fertil.* **83**, 239–248. doi:10.1530/JRF.0.0830239
- Fortier, M. A., Krishnaswamy, K., Danyod, G., Boucher-Kovalik, S., and Chapdalaine, P. (2008). A postgenomic integrated view of prostaglandins in reproduction: implications for other body systems. *J. Physiol. Pharmacol.* **59**, 65–89.

- From, C., Hormazabal, V., and Granum, P. E. (2007). Food poisoning associated with pumilacidin-producing *Bacillus pumilus* in rice. *Int. J. Food Microbiol.* **115**, 319–324. doi:10.1016/J.IJFOODMICRO.2006.11.005
- Gabler, C., Drillich, M., Fischer, C., Holder, C., Heuwieser, W., and Einspanier, R. (2009). Endometrial expression of selected transcripts involved in prostaglandin synthesis in cows with endometritis. *Theriogenology* **71**, 993–1004. doi:10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2008.11.009
- Gabler, C., Fischer, C., Drillich, M., Einspanier, R., and Heuwieser, W. (2010). Time-dependent mRNA expression of selected pro-inflammatory factors in the endometrium of primiparous cows postpartum. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **8**, 152. doi:10.1186/1477-7827-8-152
- Ghasemi, F., Gonzalez-Cano, P., Griebel, P. J., and Palmer, C. (2012). Proinflammatory cytokine gene expression in endometrial cytobrush samples harvested from cows with and without subclinical endometritis. *Theriogenology* **78**, 1538–1547. doi:10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2012.06.022
- Gilbert, R. O., Shin, S. T., Guard, C. L., Erb, H. N., and Frajblat, M. (2005). Prevalence of endometritis and its effects on reproductive performance of dairy cows. *Theriogenology* **64**, 1879–1888. doi:10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2005.04.022
- Gong, X., Chen, Z., Liu, Y., Lu, Q., and Jin, Z. (2014). Gene expression profiling of the paracrine effects of uterine natural killer cells on human endometrial epithelial cells. *Int. J. Endocrinol.* **2014**, 393707. doi:10.1155/2014/393707
- Hare, W. R., Hoyt, P. G., Hohn, C., and Higgins, J. A. (2008). Ribosomal RNA-based analysis of the bacterial flora from the conjunctivae of cattle with bovine keratoconjunctivitis (BKC). *Vet. Microbiol.* **131**, 358–368. doi:10.1016/J.VETMIC.2008.04.018
- Herath, S., Fischer, D. P., Werling, D., Williams, E. J., Lilly, S. T., Dobson, H., Bryant, C. E., and Sheldon, I. M. (2006). Expression and function of Toll-like receptor 4 in the endometrial cells of the uterus. *Endocrinology* **147**, 562–570. doi:10.1210/EN.2005-1113
- Herath, S., Lilly, S. T., Santos, N. R., Gilbert, R. O., Goetze, L., Bryant, C. E., White, J. O., Cronin, J., and Sheldon, I. M. (2009a). Expression of genes associated with immunity in the endometrium of cattle with disparate postpartum uterine disease and fertility. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **7**, 55. doi:10.1186/1477-7827-7-55
- Herath, S., Lilly, S. T., Fischer, D. P., Williams, E. J., Dobson, H., Bryant, C. E., and Sheldon, I. M. (2009b). Bacterial lipopolysaccharide induces an endocrine switch from prostaglandin F2 to prostaglandin E2 in bovine endometrium. *Endocrinology* **150**, 1912–1920. doi:10.1210/EN.2008-1379

- Huang, S. J., Schatz, F., Masch, R., Rahman, M., Buchwalder, L., Niven-Fairchild, T., Tang, C., Abrahams, V. M., Krikun, G., and Lockwood, C. J. (2006). Regulation of chemokine production in response to pro-inflammatory cytokines in first trimester decidual cells. *J. Reprod. Immunol.* **72**, 60–73. doi:10.1016/J.JRI.2006.03.002
- Hussain, A. M., Daniel, R. C., and O'Boyle, D. (1990). Postpartum uterine flora following normal and abnormal puerperium in cows. *Theriogenology* **34**, 291–302. doi:10.1016/0093-691X(90)90522-U
- Imakawa, K., Imai, M., Sakai, A., Suzuki, M., Nagaoka, K., Sakai, S., Lee, S.-R., Chang, K.-T., Echtenkamp, S. E., and Christenson, R. K. (2006). Regulation of conceptus adhesion by endometrial CXC chemokines during the implantation period in sheep. *Mol. Reprod. Dev.* **73**, 850–858. doi:10.1002/MRD.20496
- Kasimanickam, R., Duffield, T. F., Foster, R. A., Gartley, C. J., Leslie, K. E., Walton, J. S., and Johnson, W. H. (2004). Endometrial cytology and ultrasonography for the detection of subclinical endometritis in postpartum dairy cows. *Theriogenology* **62**, 9–23. doi:10.1016/J.THERIOGEN OLOGY.2003.03.001
- Kim, J.J., Quin, P.A., and Fortier, M.A. (1994). *Ureaplasma diversum* infection *in vitro* alters prostaglandin E2 and prostaglandin F2a production by bovine endometrial cells without affecting cell viability. *Infect. Immun.* **62**, 1528–1533.
- Kitaya, K., and Yasuo, T. (2010). Aberrant expression of selectin E, CXCL1, and CXCL13 in chronic endometritis. *Mod. Pathol.* **23**, 1136–1146. doi:10.1038/MODPATHOL.2010.98
- Konnai, S., Usui, T., Ohashi, K., and Onuma, M. (2003). The rapid quantitative analysis of bovine cytokine genes by real-time RT-PCR. *Vet. Microbiol.* **94**, 283–294. doi:10.1016/S0378-1135(03)00119-6
- LeBlanc, S. J., Osawa, T., and Dubuc, J. (2011). Reproductive tract defense and disease in postpartum dairy cows. *Theriogenology* **76**, 1610–1618. doi:10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2011.07.017
- LeBlanc, S. J. (2012). Interactions of metabolism, inflammation, and reproductive tract health in the postpartum period in dairy cattle. *Reprod. Domest. Anim.* **47**, 18–30. doi:10.1111/J.1439-0531.2012.02109.X
- Liu, M.-C., Wu, C.-M., Liu, Y.-C., Zhao, J.-C., Yang, Y.-L., and Shen, J.-Z. (2009). Identification, susceptibility, and detection of integron-gene cassettes of *Arcanobacterium pyogenes* in bovine endometritis. *J. Dairy Sci.* **92**, 3659–3666. doi:10.3168/JDS.2008-1756
- Logan, N. A., and De Vos, P. (2009) Bacillus. In 'Bergey's Manual of Systematic Bacteriology'. 2nd edn. (Eds P. De Vos, G. Garrity, D. Jones, N. R. Krieg, W. Ludwig, F. A. Rainey, K.-H. Schleifer and W. Whitman) p. 48. (Springer, New York).

- Logan, N. A. (2012). *Bacillus* and relatives in foodborne illness. *J. Appl. Microbiol.* **112**, 417–429. doi:10.1111/J.1365-2672.2011.05204.X
- Majewska, M., Woclawek-Potocka, I., Bah, M. M., Hapunik, J., Piotrowska, K. K., Tasaki, Y., Acosta, T. J., Okuda, K., and Skarzynski, D. J. (2010). Is interleukin-1alpha a luteotropic or luteolytic agent in cattle? *Reproduction* **139**, 665–672. doi:10.1530/REP-09-0328
- Messier, S., Higgins, R., Couture, Y., and Morin, M. (1984). Comparison of swabbing and biopsy for studying the flora of the bovine uterus. *Can. Vet. J.* **25**, 283–288.
- Miessen, K., Einspanier, R., and Schoen, J. (2012). Establishment and characterization of a differentiated epithelial cell culture model derived from the porcine cervix uteri. *BMC Vet. Res.* **8**, 31. doi:10.1186/17466148-8-31
- Mokhtar, N. M., Cheng, C.-W., Cook, E., Bielby, H., Smith, S. K., and Charnock-Jones, D. S. (2010). Progesterin regulates chemokine (C-X-C motif) ligand 14 transcript level in human endometrium. *Mol. Hum. Reprod.* **16**, 170–177. doi:10.1093/MOLEHR/GAP100
- Nieminen, T., Rintaluoma, N., Andersson, M., Taimisto, A.-M., Ali-Vehmas, T., Seppälä, A., Priha, O., and Salkinoja-Salonen, M. (2007). Toxinogenic *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* from mastitic milk. *Vet. Microbiol.* **124**, 329–339. doi:10.1016/J.VETMIC.2007.05.015
- Nomiyama, H., Osada, N., and Yoshie, O. (2010). The evolution of mammalian chemokine genes. *Cytokine Growth Factor Rev.* **21**, 253–262. doi:10.1016/J.CYTOGFR.2010.03.004
- Oda, S., Gabler, C., Holder, C., and Einspanier, R. (2006). Differential expression of cyclooxygenase 1 and cyclooxygenase 2 in the bovine oviduct. *J. Endocrinol.* **191**, 263–274. doi:10.1677/JOE.1.06761
- Panangala, V. S., Fish, N. A., and Barnum, D. A. (1978). Microflora of the cervico-vaginal mucus of repeat breeder cows. *Can. Vet. J.* **19**, 83–89.
- Rafii, F., Williams, A. J., Park, M., Sims, L. M., Heinze, T. M., Cerniglia, C. E., and Sutherland, J. B. (2009). Isolation of bacterial strains from bovine fecal microflora capable of degradation of ceftiofur. *Vet. Microbiol.* **139**, 89–96. doi:10.1016/J.VETMIC.2009.04.023
- Reutershan, J., and Ley, K. (2004). Bench-to-bedside review: acute respiratory distress syndrome - how neutrophils migrate into the lung. *Crit. Care* **8**, 453–461. doi:10.1186/CC2881
- Santos, T. M., Gilbert, R. O., and Bicalho, R. C. (2011). Metagenomic analysis of the uterine bacterial microbiota in healthy and metritic postpartum dairy cows. *J. Dairy Sci.* **94**, 291–302. doi:10.3168/JDS.2010-3668

- Santos, T. M., and Bicalho, R. C. (2012). Diversity and succession of bacterial communities in the uterine fluid of postpartum metritic, endometritic and healthy dairy cows. *PLoS ONE* **7**, e53048. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0053048
- Sens, A., and Heuwieser, W. (2013). Presence of *Escherichia coli*, *Trueperella pyogenes*, α -hemolytic streptococci, and coagulase-negative staphylococci and prevalence of subclinical endometritis. *J. Dairy Sci.* **96**, 6347–6354. doi:10.3168/JDS.2013-6646
- Sentman, C. L., Meadows, S. K., Wira, C. R., and Eriksson, M. (2004). Recruitment of uterine NK cells: induction of CXC chemokine ligands 10 and 11 in human endometrium by estradiol and progesterone. *J. Immunol.* **173**, 6760–6766. doi:10.4049/JIMMUNOL.173.11.6760
- Sheldon, I. M., Lewis, G. S., LeBlanc, S., and Gilbert, R. O. (2006). Defining postpartum uterine disease in cattle. *Theriogenology* **65**, 1516–1530. doi:10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2005.08.021
- Sheldon, I. M., Cronin, J., Goetze, L., Donofrio, G., and Schuberth, H.-J. (2009a). Defining postpartum uterine disease and the mechanisms of infection and immunity in the female reproductive tract in cattle. *Biol. Reprod.* **81**, 1025–1032. doi:10.1095/BIOLREPROD.109.077370
- Sheldon, I. M., Price, S. B., Cronin, J., Gilbert, R. O., and Gadsby, J. E. (2009b). Mechanisms of infertility associated with clinical and subclinical endometritis in high producing dairy cattle. *Reprod. Domest. Anim.* **44**, 1–9. doi:10.1111/J.1439-0531.2009.01465.X
- Sheldon, I. M., and Roberts, M. H. (2010). Toll-like receptor 4 mediates the response of epithelial and stromal cells to lipopolysaccharide in the endometrium. *PLoS ONE* **5**, e12906. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0012906
- Sheldon, I. M., Rycroft, A. N., Dogan, B., Craven, M., Bromfield, J. J., Chandler, A., Roberts, M. H., Price, S. B., Gilbert, R. O., Simpson, K. W., and Sturtevant, J. (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. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0009192
- Sheldon, I. M., Cronin, J. G., Healey, G. D., Gabler, C., Heuwieser, W., Strey, D., Bromfield, J., Miyamoto, A., Fergani, C., and Dobson, H. (2014). Innate immunity and inflammation of the bovine female reproductive tract in health and disease. *Reproduction* **148**, R41–R51. doi:10.1530/REP-14-0163
- Silva A. P., Costa E. A., Macêdo A. A., Martins, T. da M., Borges A. M., Paixão T. A., and Santos, R. L. (2012). Transcription of pattern recognition receptors and abortive agents

- induced chemokines in the bovine pregnant uterus. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **145**, 248–256. doi:10.1016/J.VETIMM.2011.11.007
- Singh, J., Murray, R. D., Mshelia, G., and Woldehiwet, Z. (2008). The immune status of the bovine uterus during the peripartum period. *Vet. J.* **175**, 301–309. doi:10.1016/J.TVJL.2007.02.003
- Suominen, I., Andersson, M. A., Andersson, M. C., Hallaksela, A. M., Kämpfer, P., Rainey, F. A., and Salkinoja-Salonen, M. (2001). Toxic *Bacillus pumilus* from indoor air, recycled paper pulp, Norway spruce, food poisoning outbreaks and clinical samples. *Syst. Appl. Microbiol.* **24**, 267–276. doi:10.1078/0723-2020-00025
- Tanikawa, M., Acosta, T. J., Fukui, T., Murakami, S., Korzekwa, A., Skarzynski, D. J., Piotrowska, K. K., Park, C. K., and Okuda, K. (2005). Regulation of prostaglandin synthesis by interleukin-1 α in bovine endometrium during the estrous cycle. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **78**, 279–290. doi:10.1016/J.PROSTAGLANDINS.2005.09.003
- Turner, M. L., Cronin, J. G., Healey, G. D., and Sheldon, I. M. (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. doi:10.1210/EN.2013-1822
- Vandesompele, J., Preter, K. de, Pattyn, F., Poppe, B., van Roy, N., Paepe, A. de, and Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* **3**, 0034.1–0034.11. doi:10.1186/GB-2002-3-7-RESEARCH0034
- Wagener, K., Drillich, M., Baumgardt, S., Kampfer, P., Busse, H.-J., and Ehling-Schulz, M. (2014). *Falsiporphyromonas endometrii* gen. nov., sp. nov., isolated from the post-partum bovine uterus, and emended description of the genus *Porphyromonas* Shah and Collins 1988. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **64**, 642–649. doi:10.1099/IJS.0.057307-0
- Walker, C. G., Meier, S., Mitchell, M. D., Roche, J. R., and Littlejohn, M. (2009). Evaluation of real-time PCR endogenous control genes for analysis of gene expression in bovine endometrium. *BMC Mol. Biol.* **10**, 100. doi:10.1186/1471-2199-10-100
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., and Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* **173**, 697–703.
- Westermann, S., Drillich, M., Kaufmann, T. B., Madoz, L. V., and Heuwieser, W. (2010). A clinical approach to determine false positive findings of clinical endometritis by vaginoscopy by the use of uterine bacteriology and cytology in dairy cows. *Theriogenology* **74**, 1248–1255. doi:10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2010.05.028

- Williams, E. J., Fischer, D. P., Noakes, D. E., England, G. C. W., Rycroft, A., Dobson, H., and Sheldon, I. M. (2007). The relationship between uterine pathogen growth density and ovarian function in the postpartum dairy cow. *Theriogenology* **68**, 549–559. doi:10.1016/J.THERIOGENOL OGY.2007.04.056
- Zerbe, H., Schuberth, H.-J., Engelke, F., Frank, J., Klug, E., and Leibold, W. (2003). Development and comparison of *in vivo* and *in vitro* models for endometritis in cows and mares. *Theriogenology* **60**, 209–223. doi:10.1016/S0093-691X(02)01376-6

DARSTELLUNG DER VERÖFFENTLICHTEN ARBEITEN

Table 1. Selected gene transcripts, primer sequences and annealing temperatures used for real-time RT-PCR with resulting amplicon length

Gene	Primer sequence	Reference	Fragment size (bp)	Annealing temperature
<i>CXCL1/2</i>	F: 5'-GAC CTT GCA GGG GAT TCA CCT C-3' R: 5'-CGG GGT TGA GAC ACA CTT CCT G-3'	NM_174299	125	60°C
<i>CXCL3</i>	F: 5'-GCC ATT GCC TGC AAA CTT-3' R: 5'-TGC TGC CCT TGT TTA GCA-3'	NM_001046513	189	56°C
<i>CXCR2</i>	F: 5'-AAC AGA CTC TGC CCC ATG TC-3' R: 5'-AGT GAC AGA GCG ACC AAT CC-3'	DQ328664	151	60°C
<i>IL1A</i>	F: 5'-TCA TCC ACC AGG AAT GCA TC-3' R: 5'-AGC CAT GCT TTT CCC AGA AG-3'	Gabler <i>et al.</i> (2009)	300	59°C
<i>IL6</i>	F: 5'-TCC AGA ACG AGT ATG AGG-3' R: 5'-CAT CCG AAT AGC TCT CAG-3'	Konnai <i>et al.</i> (2003)	236	56°C
<i>IL8</i>	F: 5'-CGA TGC CAA TGC ATA AAA AC-3' R: 5'-CTT TTC CTT GGG GTT TAG GC-3'	Fischer <i>et al.</i> (2010)	153	56°C
<i>TLR2</i>	F: 5'-GTA CCC ATG ATG GAA TTG GC-3' R: 5'-TGG CCA CTG ACA AGT TTC AG-3'	NM_174197	446	60°C
<i>TLR4</i>	F: 5'-ACT GAG TTT CAG CTA CCA AGC C-3' R: 5'-AGG TTT GCA GAC TGA CTA AGC C-3'	NM_174198	325	60°C
<i>TLR6</i>	F: 5'-GGA AAG CTA CAA GGG AAC CC-3' R: 5'-ACC CAG GCA GAG TCA TGT TC-3'	NM_001001159	276	60°C
<i>PTGS2</i>	F: 5'-CTC TTC CTC CTG TGC CTG AT-3' R: 5'-CTG AGT ATC TTT GAC TGT GGG AG-3'	Oda <i>et al.</i> (2006)	359	60°C

Table 2. Selected gene transcripts, primer sequences and annealing temperatures used for normalisation of real-time RT-PCR with resulting amplicon

Gene	Primer sequence	Reference	Fragment size (bp)	Annealing temperature
<i>18S rRNA</i>	F: 5'-GAG AAA CGG CTA CCA CAT CCA A-3'	Odau <i>et al.</i> (2006)	337	61°C
	R: 5'-GAC ACT CAG CTA AGA GCA TCG A-3'			
<i>SUZ12</i>	F: 5'-GAA CAC CTA TCA CAC ACA TTC TTG T-3'	Walker <i>et al.</i> (2009)	359	60°C
	R: 5'-TAG AGG CGG TTG TGT CCA CT-3'			
<i>ACTB</i>	F: 5'-CGG TGC CCA TCT ATG AGG-3'	AY141970	266	58°C
	R: 5'-GAT GGT GAT GAC CTG CCC-3'			
<i>SDHA</i>	F: 5'-GGG AGG ACT TCA AGG AGA GG-3'	BT030722	219	60°C
	R: 5'-CTC CTC AGT AGG AGC GGA TG-3'			
<i>GAPDH</i>	F: 5'-CCC AGA AGA CTG TGG ATG G-3'	U85042	306	62°C
	R: 5'-AGT CGC AGG AGA CAA CCT G-3'			

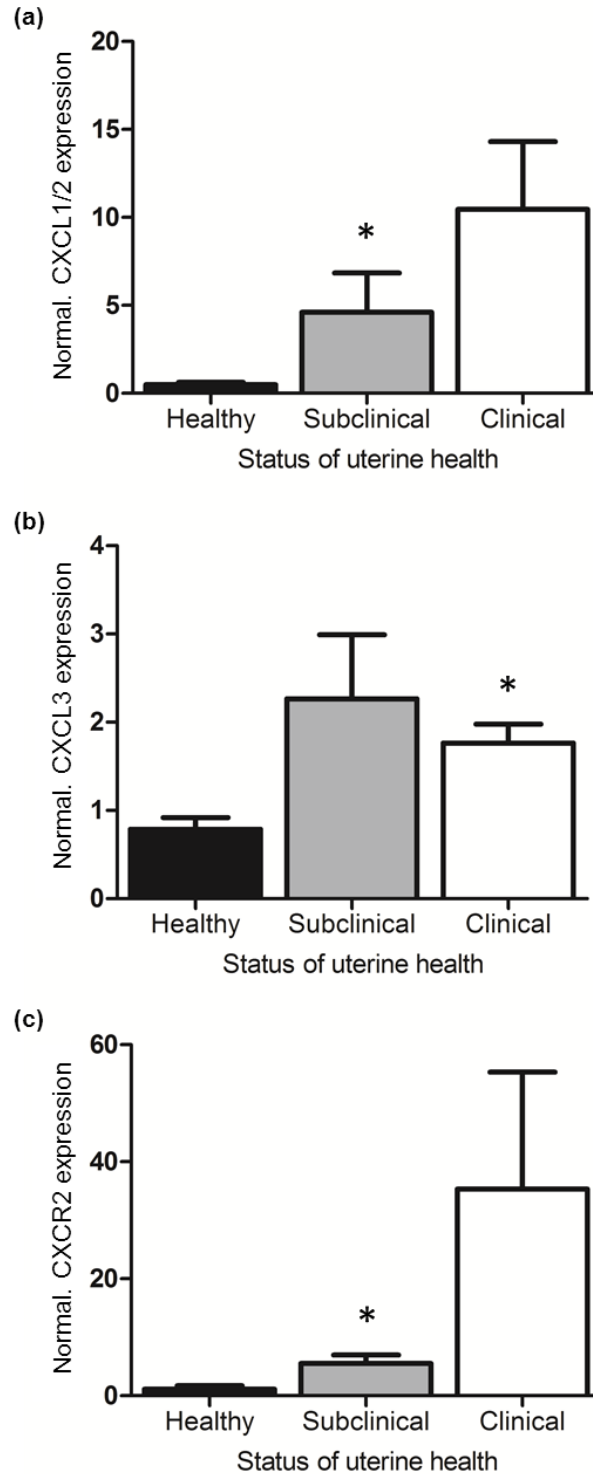


Fig. 1. Messenger RNA expression of (a) CXCL1/2, (b) CXCL3 and (c) CXCR2 in bovine endometrial epithelial samples collected from healthy cows and cows with subclinical or clinical endometritis on Days 24–30 postpartum ($n = 10$ each). Values represent the mean expression \pm s.e.m. normalised against the expression of SUZ12 and 18S rRNA. Asterisk indicates significant difference ($P < 0.05$) compared to healthy cows.

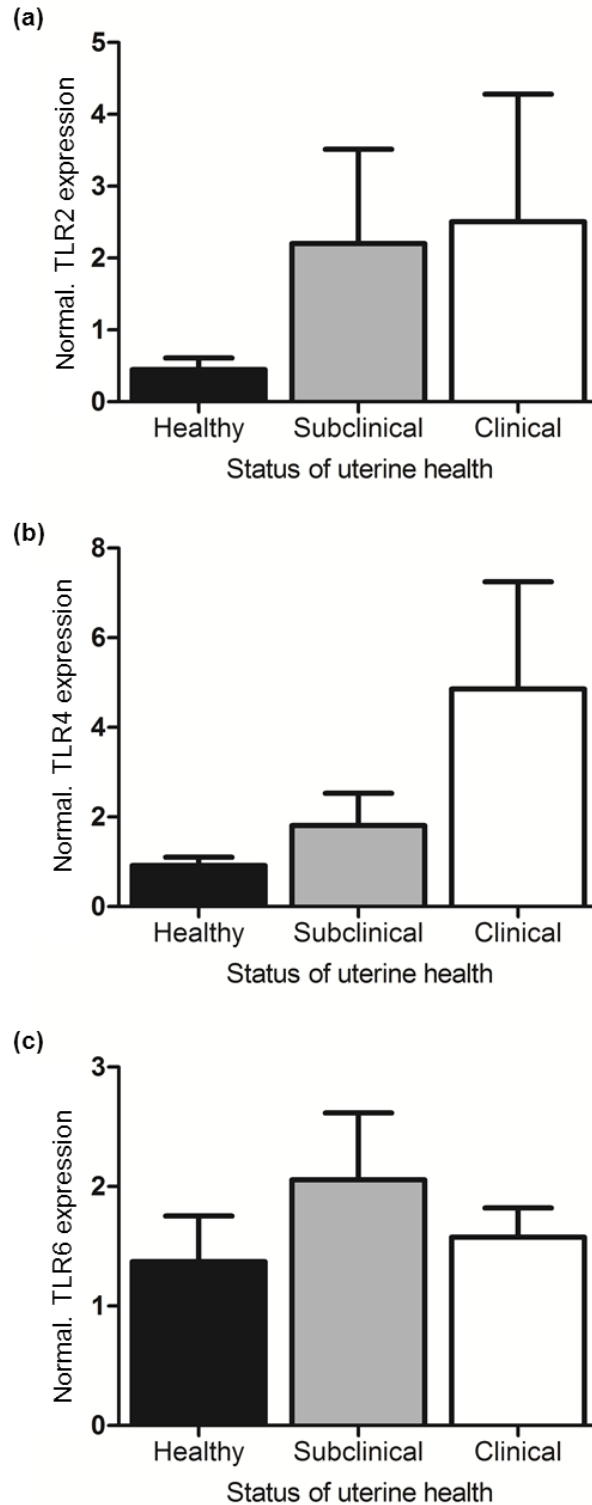


Fig. 2. Messenger RNA expression of (a) TLR2, (b) TLR4 and (c) TLR6 in bovine endometrial epithelial samples collected from healthy cows and cows with subclinical or clinical endometritis on Days 24–30 postpartum ($n = 10$ each). Values represent the mean expression \pm s.e.m. normalised against the expression of SUZ12 and 18S rRNA. Asterisk indicates significant difference ($P < 0.05$) compared to healthy cows.

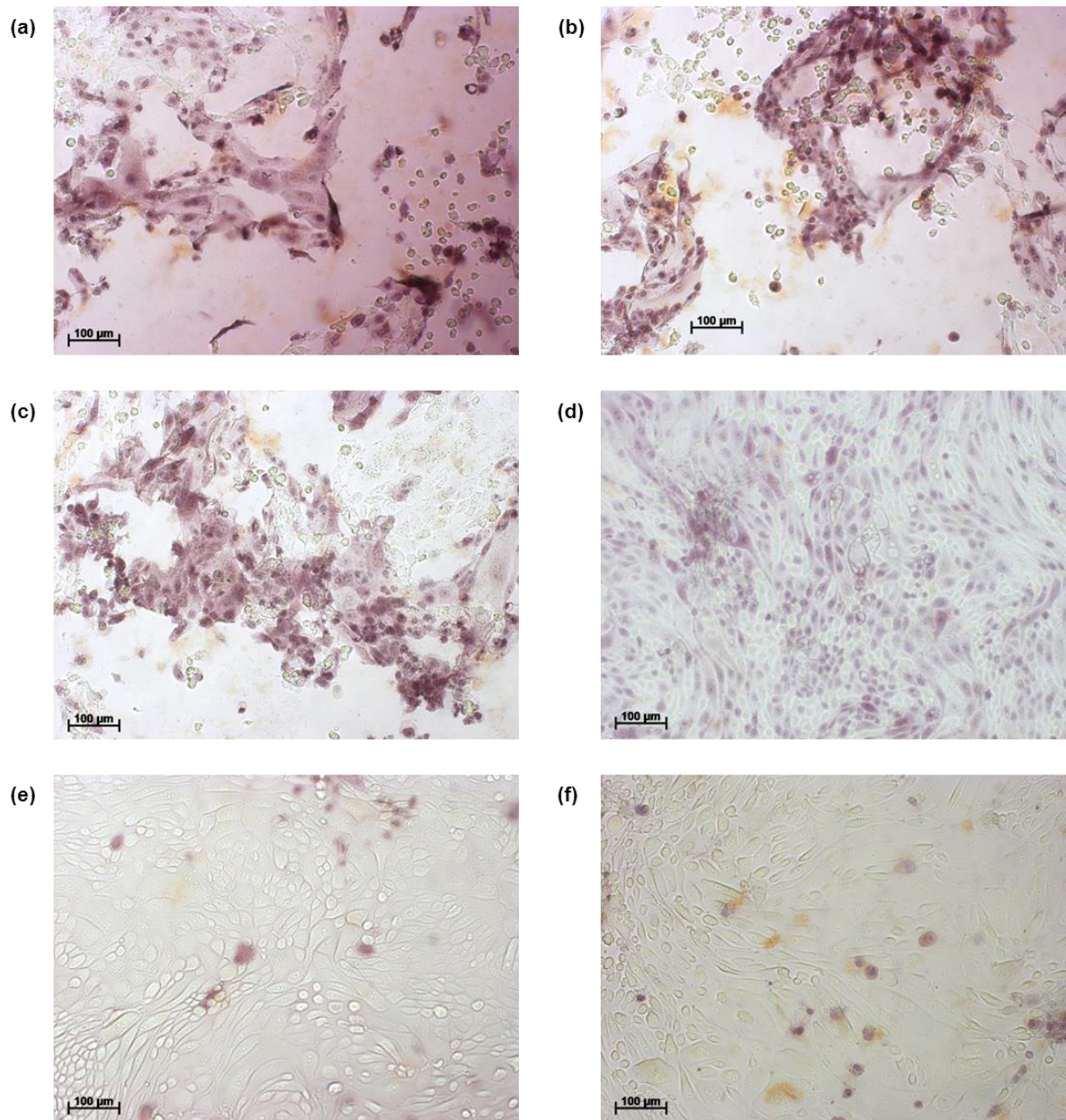


Fig. 3. Trypan blue staining of endometrial epithelial cells after 24 h of co-culturing: (a) epithelial cells co-cultured with *B. pumilus* in MOI 1; (b) epithelial cells co-cultured with *B. pumilus* in MOI 5; (c) epithelial cells co-cultured with *B. pumilus* in MOI 10; (d) epithelial cells co-cultured with *St. succinus* in MOI 1; (e) epithelial cells co-cultured with *W. paramesenteroides* in MOI 1; (f) control. 100× magnification.

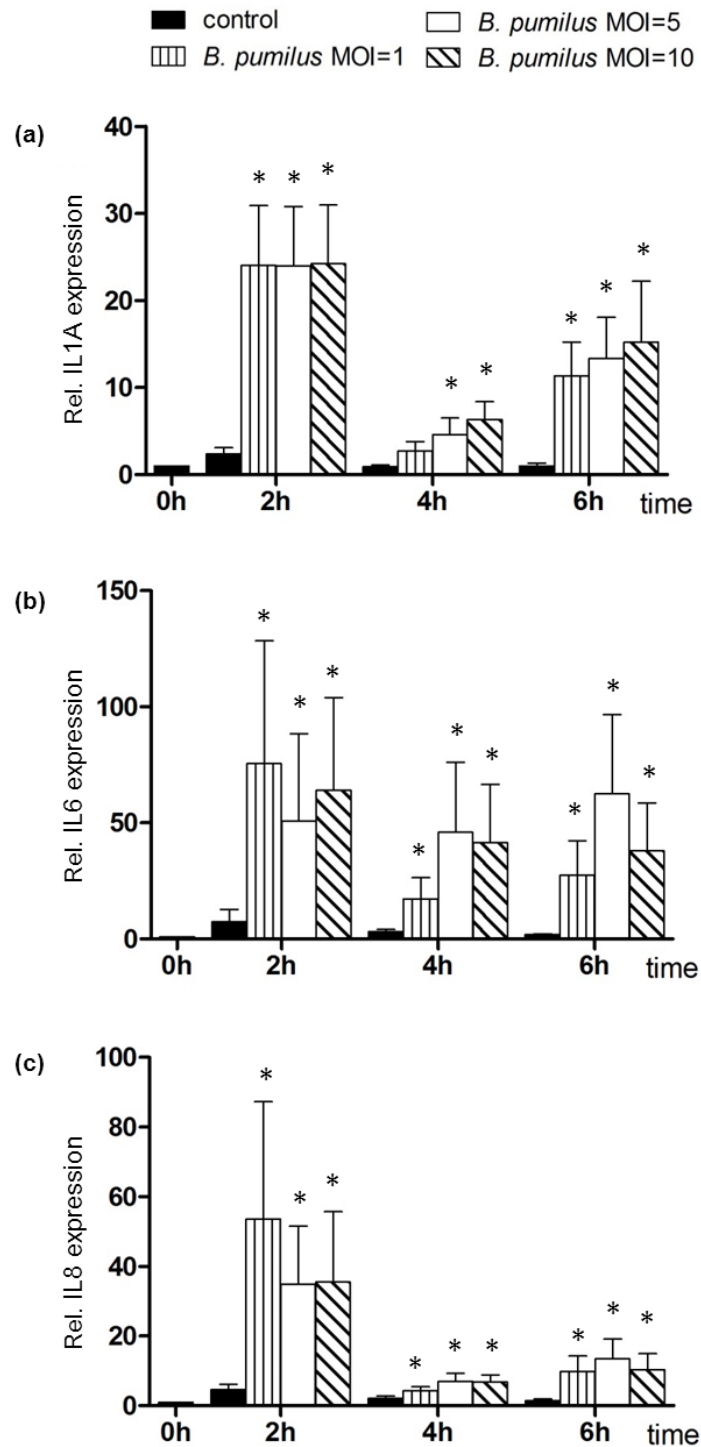


Fig. 4. Messenger RNA expression of (a) IL1A, (b) IL6 and (c) IL8 in bovine endometrial epithelial cells after co-culture with *B. pumilus* in MOI 1, 5 and 10 for up to 6 h ($n = 5$ animals). The expression of each factor was expressed as the mean \pm s.e.m. relative to the individual expression of ACTB, GAPDH and SDHA as internal control. All expressions were scaled relative to the control cells at time 0 h whose expression was defined as 1; values of each MOI were compared with the control at the same point in time. Asterisk indicates significant difference ($P < 0.05$) compared to control cells.

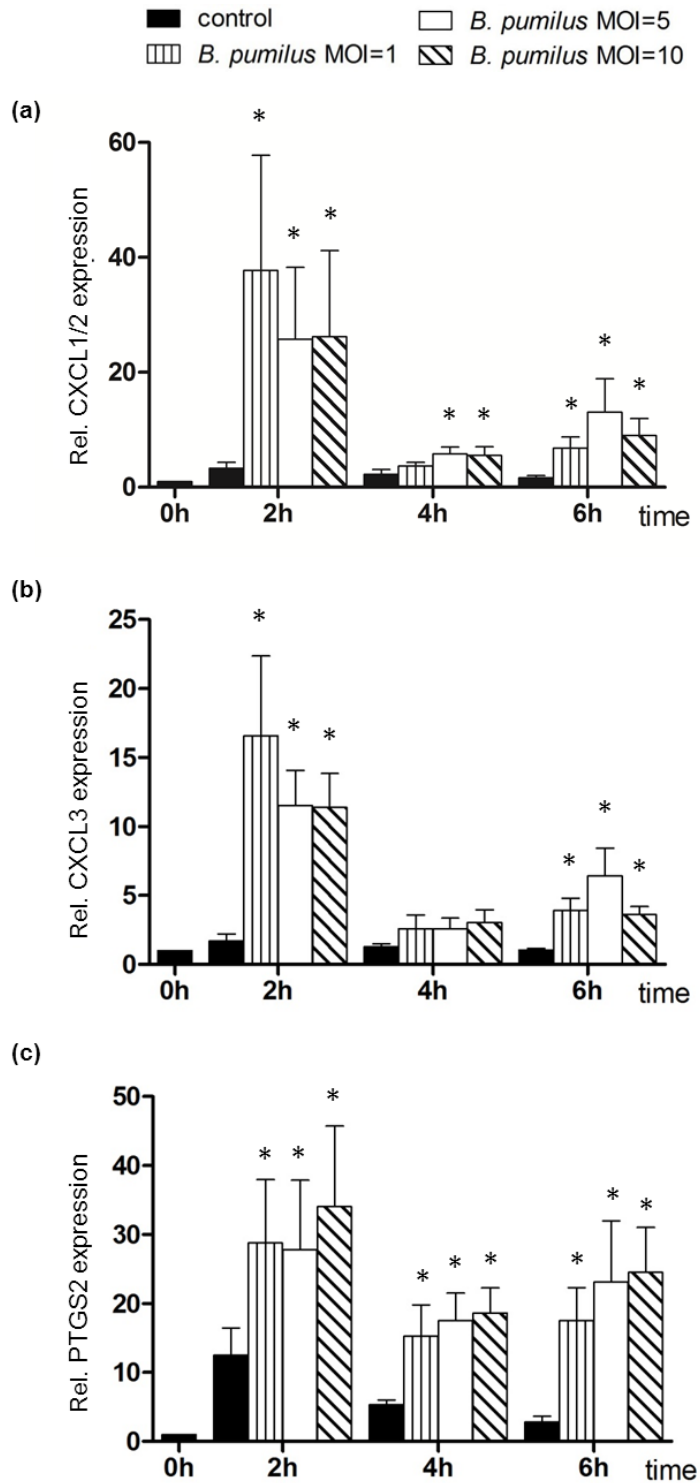


Fig. 5. Messenger RNA expression of (a) CXCL1/2, (b) CXCL3 and (c) PTGS2 in bovine endometrial epithelial cells after co-culture with *B. pumilus* in MOI 1, 5 and 10 for up to 6 h ($n = 5$). The expression of each factor was expressed as the mean \pm s.e.m. relative to the individual expression of ACTB, GAPDH and SDHA as internal control. All expressions were scaled relative to the control cells at time 0 h whose expression was defined as 1; values of each MOI were compared with the control at the same point in time. Asterisk indicates significant difference ($P < 0.05$) compared to control cells.

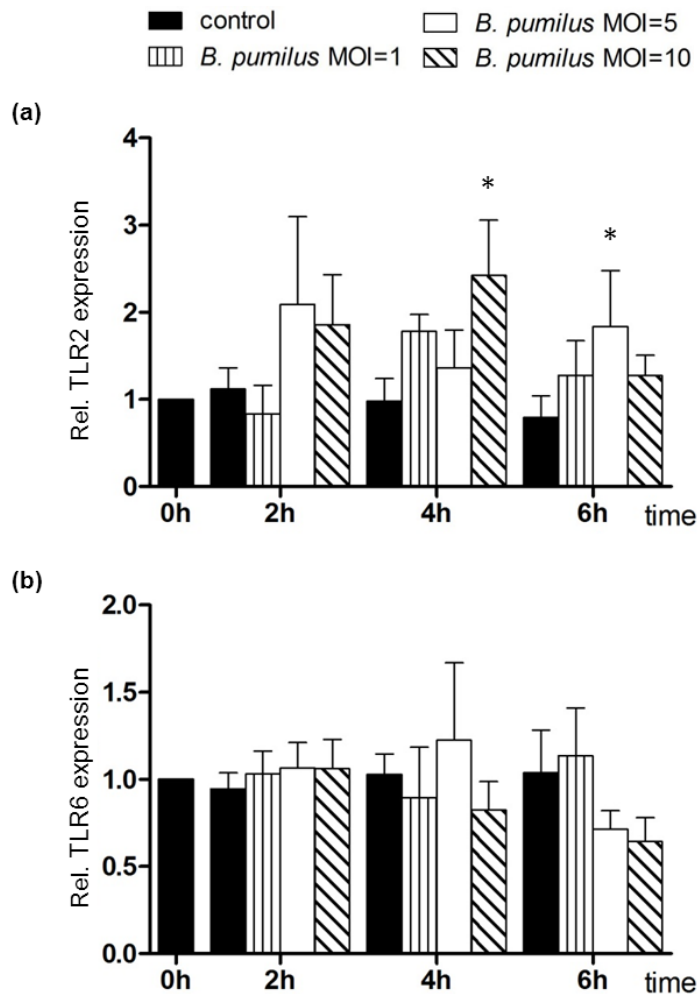


Fig. 6. Messenger RNA expression of (a) TLR2 and (b) TLR6 in bovine endometrial epithelial cells after co-culture with *B. pumilus* in MOI 1, 5 and 10 for up to 6 h ($n = 5$). The expression of each factor was expressed as the mean \pm s.e.m. relative to the individual expression of ACTB, GAPDH and SDHA as internal control. All expressions were scaled relative to the control cells at time 0 h whose expression was defined as 1; values of each MOI were compared with the control at the same point in time. Asterisk indicates significant difference ($P < 0.05$) compared to control cells.

3.2 Detection and characterisation of *Lactobacillus* spp. in the bovine uterus and their influence on bovine endometrial epithelial cells *in vitro*

Detection and Characterisation of *Lactobacillus* spp. in the Bovine Uterus and Their Influence on Bovine Endometrial Epithelial Cells *In Vitro*

Martina A. Gärtner¹, Angelika Bondzio¹, Nicole Braun², Markus Jung²,
Ralf Einspanier¹, Christoph Gabler^{1*}

¹ Institute of Veterinary Biochemistry, Department of Veterinary Medicine,
Freie Universität Berlin, Berlin, Germany

² Institute for the Reproduction of Farm Animals Schönow, Bernau, Germany

* Corresponding author: christoph.gabler@fu-berlin.de

PLoS ONE, published 24 March 2015, © 2015 Gärtner *et al.*
Volume 10, Issue 3, e0119793
DOI: 10.1371/journal.pone.0119793

RESEARCH ARTICLE

Detection and Characterisation of *Lactobacillus* spp. in the Bovine Uterus and Their Influence on Bovine Endometrial Epithelial Cells *In Vitro*

Martina A. Gärtner¹, Angelika Bondzio¹, Nicole Braun², Markus Jung², Ralf Einspanier¹, Christoph Gabler^{1*}

1 Institute of Veterinary Biochemistry, Department of Veterinary Medicine, Freie Universität Berlin, Berlin, Germany, **2** Institute for the Reproduction of Farm Animals Schönnow, Bernau, Germany

* christoph.gabler@fu-berlin.de



OPEN ACCESS

Citation: Gärtner MA, Bondzio A, Braun N, Jung M, Einspanier R, Gabler C (2015) Detection and Characterisation of *Lactobacillus* spp. in the Bovine Uterus and Their Influence on Bovine Endometrial Epithelial Cells *In Vitro*. PLoS ONE 10(3): e0119793. doi:10.1371/journal.pone.0119793

Academic Editor: Eliseo A Eugenin, Rutgers University, UNITED STATES

Received: August 14, 2014

Accepted: January 23, 2015

Published: March 24, 2015

Copyright: © 2015 Gärtner et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (GA 1077/5-1). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abstract

Bacterial infections and inflammation of the uterus are common in dairy cattle after parturition. In particular, pathogenic bacteria that cause endometritis have been the focus of research in cattle reproduction in the last ten years. The aim of the present study was to identify commensal lactobacilli in the bovine uterus and to examine their influence on the synthesis of pro-inflammatory factors in bovine endometrial epithelial cells *in vitro*. *Lactobacillus* species were isolated from healthy bovine uteri and further characterised. Bovine endometrial epithelial cells in the second passage (n = 5 animals) were co-cultured with the autochthonous isolates *L. buchneri*, *L. ruminis* and *L. amylovorus* as well as with a commercially available *L. vaginalis* in different multiplicities of infection (MOI = 1, 5 and 10, respectively). Endometrial epithelial cells cultured without bacteria served as controls. At distinct points in time (2, 4 and 6 h) total RNA was extracted from co-cultured epithelial cells and subjected to reverse transcription quantitative PCR of pro-inflammatory factors. Furthermore, the release of such factors by co-cultured epithelial cells was measured by ELISA or EIA after 24 and 48 h. *L. ruminis* and *L. amylovorus* induced increased interleukin (IL) *IL1A*, *IL6*, *IL8* and prostaglandin-endoperoxide synthase 2 mRNA levels and the release of *IL8* and prostaglandin *F_{2α}* in endometrial epithelial cells compared with control cells. In contrast, *L. buchneri* did not significantly influence the expression and release of these factors. Toll-like receptors 2 and 6 transcripts were found unchanged in co-cultured and untreated epithelial cells *in vitro*. However, endometrial epithelial cells of each animal showed individual differences in the response to bacterial load. These results suggest that *Lactobacillus* species are present in the bovine uterus, revealing immunomodulatory properties.

Introduction

Uterine bacterial invasion is common in dairy cattle after parturition. A wide range of different bacteria were isolated from samples collected from the uterus. Many studies have focused on pathogens such as *Trueperella pyogenes*, *Escherichia coli*, *Fusobacterium necrophorum*, *Prevotella* spp., *Staphylococcus* spp. and *Streptococcus* spp. [1–4]. However, commensal bacteria such as the genus *Lactobacillus* were detected in the uterus of cows, but not further investigated. Few studies have mentioned the culture of lactobacilli from uterine samples of cows [5,6], but their role in the uterine environment has not yet been elucidated. In the bovine vagina, the presence of lactobacilli has been shown during the growth of healthy heifers [7] and during the luteal phase of the oestrous cycle [8]. Lactobacilli are predominant in the human vaginal tract [9], where they play a role in maintaining the vaginal ecosystem in a healthy status by producing hydrogen peroxide, acetic and lactic acid and antibacterial molecules for a first defence against bacteria [10–12].

Bacteria that ascend into the uterus are recognised by endometrial epithelial cells via Toll-like receptors (TLRs). These proteins are able to detect pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) such as lipopolysaccharide (LPS) from Gram-negative bacteria and lipoteichoic acid from Gram-positive bacteria [13]. This recognition of invading pathogens is the first step of immune response of the endometrium followed by producing pro-inflammatory cytokines such as interleukins and chemokines to attract polymorphonuclear neutrophils (PMNs) to the uterine lumen for bacterial clearance [14]. Molecules involved in the inflammatory processes in the endometrium include the cytokines interleukin 1 alpha (IL1A), IL6 and IL8 [15] and prostaglandins whose production is under the regulation of prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (PTGS2) [16]. If the inflammation of the endometrium caused by bacterial infection is excessive or persistent, it results in the development of uterine diseases [15]. It has been shown that genital diseases have negative consequences for fertility by increasing the calving-to-conception interval and reducing conception rates [14,17,18].

Several studies have demonstrated that cows with genital diseases showed enhanced expression of interleukins and PTGS2. Cows with subclinical and clinical endometritis revealed increased mRNA expression of IL1A [19] and IL8 [20] in endometrial cytobrush samples compared with healthy cows. Furthermore, cows with inflamed endometrium showed enhanced IL6, IL8 and PTGS2 expression around two weeks postpartum (pp) compared with healthy endometrium [21,22]. The increased IL6 and IL8 expression in endometrial biopsies of endometritic cows compared with healthy cows supports these findings [23]. The results of these studies indicate that these interleukins as well as PTGS2 are involved in the immune response in inflammatory endometrial diseases.

The hypothesis of increased expression of interleukins and PTGS2 in cows with endometritis caused by a bacterial infection is supported by *in vitro* studies of endometrial cells co-cultured with pathogenic bacteria. Higher IL8 expression was observed after treatment of endometrial epithelial cells with LPS purified from endometrial pathogenic *E. coli* [24]. Additionally, PTGS2 was more highly expressed in bovine endometrial epithelial cells after stimulation with *E. coli* or LPS compared with control cells [16]. Not only pathogenic bacteria, but also commensal bacteria have been shown to upregulate pro-inflammatory factors. *L. rhamnosus* and *L. reuteri* increased IL1A expression in human vaginal epithelial cells [25], and IL6 as well as IL8 production by peripheral blood mononuclear cells was induced by *L. fermentum* and *L. salivarius* [26].

In contrast to the human or bovine vagina, lactobacilli have not been in the focus of studies concerning the bovine uterus so far and their role in the endometrial microbiota is unclear. Therefore, the aim of this study was to isolate and characterise lactobacilli from the bovine

uterus and to examine their influence on the expression and production of pro-inflammatory factors in bovine endometrial epithelial cells *in vitro*.

Materials and Methods

Isolation and culturing of *Lactobacillus* species

Cows were kept on two commercial dairy farms in freestall facilities in the state of Brandenburg (Germany) in accordance with the guidelines of the National Animal Welfare Legislation, and the local animal welfare officer (Berlin, Germany) approved the study. These bacterial samples from the dairy farm cows were taken by professional veterinarians as part of routine diagnostics. For this reason, no ethics committee approval is necessary because such an approach did not lead to any additional pain or discomfort-inducing manipulations for the cows during the entire study. The procedure of taking cytobrush samples from the uterus is similar to artificial insemination. Therefore, no sedation or local anaesthesia was applied. None of these cows had to be sacrificed because of the sampling.

Non-pregnant animals without signs of genital diseases were chosen for this study. Bacteriological samples of the endometrium were collected from 11 cows 40 to 90 days pp. One sample from each cow was taken using the cytobrush technique as described previously with slight modifications [27]. A sterile brush (Cytobrush Plus GT, Medscand Medical, Malmö, Sweden) was covered with a metallic catheter. To protect the cytobrush from vaginal and external contaminations, the catheter was enveloped by a sanitary plastic sleeve. The catheter was placed via the cervix into the uterine body and the sleeve was retracted followed by gently pushing the cytobrush into the uterine lumen. A bacterial sample was taken by rolling the cytobrush in contact with the uterine wall. The samples were stored in MRS broth (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) and transported to the laboratory at room temperature. Samples were cultured aerobically on Rogosa SL agar and LBS agar (both Sigma-Aldrich) at 37°C for up to 72 h to detect lactobacilli. Bacteria of single colonies were picked and subsequently grown in MRS broth followed by streaking on agar plates. This was repeated three times. Bacteria were plated on blood agar (Merck, Darmstadt, Germany) to ensure the purity of the bacterial strains. All isolates were stored at -80°C in 15% glycerol until further experiments.

Characterisation of isolated bacteria

Bacterial species were identified by the characteristics of Gram stain, colony morphology, catalase reaction, nitrate reduction and indole production. For a first screening, a PCR with *Lactobacillus*-specific primers [28] based on the ribosomal ribonucleic acid (rRNA) gene was performed. Briefly, the forward primer was based on the flanking terminal sequence of the 16S rRNA gene (5'-CTT GTA CAC ACC GCC CGT CA-3'). The sequence of the 16S to 23S ribosomal RNA intergenic spacer region of *L. acidophilus* starting at position 70 was used as reverse primer (5'-CTC AAA ACT AAA CAA AGT TTC-3'). Both primers were synthesised by Eurofins MWG (Ebersberg, Germany). A single colony of each isolate plated on MRS agar was picked and cultured in MRS broth for 24 h. The grown bacterial suspension was diluted 10x with TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) and stored at 4°C until use. PCR amplifications were performed in a thermocycler with a 25 µl total volume containing 0.4 µM of each primer, 0.4 mM each dNTP, 3 mM MgCl₂, 1x Immobuffer, 0.5 U Immolase (all Fermentas, St. Leon-Roth, Germany) and 5 µl of the diluted bacterial suspension mentioned above. Cycling conditions were as follows: 10 min at 95°C, followed by 40 cycles of 1 min at 95°C, 1 min at 55°C and 1 min at 72°C, and a 3 min final extension step at 72°C. PCR amplicons were analysed by 2% agarose gel electrophoresis containing ethidium bromide. An approximately 250 bp long PCR product was obtained.

Bacteria with amplicons obtained in this PCR approach were used for characterisation of extended products by sequencing. For that, DNA was extracted from 24 h bacterial cultures in MRS broth by using a QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) following the manufacturer's instructions. Isolated DNA was quantified spectrophotometrically at a wavelength of 260 nm and subjected to a PCR using phylogenetic 16S rDNA primers [29]. Briefly, the reaction mixture mentioned above was used except for 1.5 mM MgCl₂ and 200 ng of genomic bacterial DNA (primer for: 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3', primer rev: 5'-AAG GAG GTG ATC CAG CC-3'; synthesised by Eurofins MWG). Amplification of DNA fragments was performed as follows: 10 min at 95°C, 35 cycles of 95°C for 2 min, 42°C for 30 s and 72°C for 4 min, followed by a final elongation step at 72°C for 20 min. The PCR amplicons were subjected to 1% agarose gel electrophoresis containing ethidium bromide and extracted from the gel using an Invisorb Spin DNA Extraction Kit (Stratec, Berlin, Germany) according to the manufacturer's instructions. The forward and reverse sequences of the PCR products were obtained (GATC Biotech, Konstanz, Germany) followed by comparing the resulting sequences with the NCBI database to obtain the specific bacterial strain sequence information.

Isolation and culture of endometrial epithelial cells

All media, antibiotics and serum used for cell culture were supplied by Biochrom (Berlin, Germany). Isolation of bovine endometrial epithelial cells was performed as described previously [30] with slight modifications. Briefly, bovine uteri were collected from healthy, non-pregnant cows at a local slaughterhouse (Schlachtbetrieb GmbH Perleberg, Perleberg, Germany) approximately 15 min after death. For that, permission from the slaughterhouse to collect the uteri was obtained. The cows were slaughtered by the staff of the slaughterhouse according to standard procedures. Uteri were transported on ice to the laboratory. Pieces of the endometrium were dissected, minced very finely and placed into 25 ml of Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) containing 150 U/ml collagenase (Sigma-Aldrich), 150 U/ml hyaluronidase (Sigma-Aldrich), 200 U/ml penicillin and 200 µg/ml streptomycin for incubation at 37°C with mild agitation for 2 h. After one washing and trituration step, cells were suspended in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)/Ham's F-12 medium containing 10% fetal bovine serum (FBS) superior, 55 µg/ml gentamicin and 1.4 µg/ml amphotericin B. The cells were plated in 25 cm² culture flasks (Corning, Corning, USA) for 18 h, which allowed selective attachment of stromal cells. An epithelial cell culture was obtained by removing and reseeding the suspension after this time [24]. Immunocytochemistry against pan-keratins was performed for proofing of cell type and purity of epithelial cells as described previously [31]. Cells were incubated at 37°C and 5% CO₂ in a humidified atmosphere. Epithelial cell populations of the second passage with not more than 5% stromal cell contamination were used for further experiments.

Co-culture of endometrial epithelial cells with different *Lactobacillus* species

Bovine endometrial epithelial cells were cultured in the first passage until reaching confluency. Then they were seeded in 24-well plates (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany) in a density of 8×10^4 cells in 500 µl medium for viability assay, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) or enzyme immunoassay (EIA) as well as in 6-well plates (Greiner Bio-One) with 3×10^5 cells in 4 ml medium for mRNA expression analysis. After reaching confluency in the second passage, the medium was removed and cells were washed twice with Dulbecco's phosphate-buffered saline (PBS; PAA, Cölbe, Germany).

Isolated lactobacilli and *L. vaginalis* (purchased from Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Germany) were prepared for co-culturing with

endometrial epithelial cells by growing in MRS broth at 37°C for 48 h after storing in glycerol at -80°C. Bacteria were harvested by centrifugation for 10 min at 3800 g, washed once with PBS, resuspended in PBS and stored in aliquots at -80°C. The number of colony-forming units (CFU)/ml in aliquots was determined by plate counting on MRS agar after thawing. For co-culturing with epithelial cells, aliquots of lactobacilli were thawed and diluted in DMEM/Ham's F-12 medium without antibiotics in different multiplicities of infection (MOI = 1, 5 and 10, respectively). Epithelial cells in wells with medium without bacteria served as controls. To detect the influence on the viability of the cells, lactobacilli were co-cultured with epithelial cells for up to 96 h. mRNA expression analysis was performed after up to 6 h of co-culturing. Up to 48 h after the beginning of co-culture, the release of pro-inflammatory factors by endometrial epithelial cells was determined by ELISA or EIA.

Viability assay

After 72 and 96 h of co-culture, the medium was aspirated and epithelial cells were washed twice with PBS. Cell viability was determined by trypan blue exclusion test [32]. Dead cells were stained blue with a 1:1 mixture of 0.5% (w/v) trypan blue (Serva, Heidelberg, Germany) and PBS. In addition, cell nuclei were stained with fluorescent DNA dyes [33]. A mixture of ethidium bromide (10 mg/ml; Sigma Aldrich) and acridine orange (5 mg/ml; Sigma Aldrich) in PBS was added to the washed epithelial cells and immediately observed using a fluorescence microscope (Axiovert 35, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) with excitation by blue light (wavelength 450–490 nm). Five different optical fields were considered and pictures were taken. Epithelial cells cultured with the same medium without bacteria served as controls. Experiments were conducted using epithelial cells isolated from five different animals.

Extraction of total RNA and reverse transcription after co-culturing

mRNA expression of pro-inflammatory factors was analysed in co-cultured endometrial epithelial cells. For this purpose, the medium was removed after 2, 4 and 6 h of co-culture, and epithelial cells were washed twice with PBS and lysed with Lysis buffer TR (Strattec). Control cells were also lysed at 0 h. The lysates were stored at -80°C until use. Total RNA was extracted from the lysates by an InviMag Universal RNA Kit (Strattec) using the KingFisher Flex (Thermo Scientific, Langenselbold, Germany) according to the manufacturer's instructions. The yield of total RNA was estimated spectrophotometrically at 260 nm and isolated RNA was stored at -80°C. RNA quality and integrity was verified using the Agilent 2100 Bioanalyzer (RNA 6000 Nano Chip, Agilent, Waldbronn, Germany).

cDNA was synthesised out of 1 µg of total RNA using 2.5 µM random hexamers, 0.66 mM dNTPs, 1x RT buffer and 200 U RevertAid reverse transcriptase (all Fermentas) in a total volume of 60 µl [34]. Treatment with DNase I (Fermentas) was performed before reverse transcription to remove possible genomic DNA contaminations. The generated cDNA was stored at -20°C until use. Reactions omitting the reverse transcriptase served as negative controls to monitor the absence of any genomic DNA or contaminations.

Quantitative PCR

Quantitative PCR (qPCR) in the presence of SYBR Green I was performed using the Rotor Gene 3000 (Corbett Research, Mortlake, Australia) as described in detail [34] following the MIQE guidelines [35]. The 10 µl reaction mixture consisted of 1 µl cDNA, 1x SensiMix Low-ROX (Bioline, Luckenwalde, Germany) and 0.4 µM of each primer (primer pairs are given in Table 1; synthesised by Eurofins MWG). The following cycling conditions were performed: 10 min at 95°C, 45 cycles of 15 s at 95°C, 20 s at the indicated annealing temperature (Table 1)

Table 1. Selected gene transcripts, primer sequences and annealing temperatures used for qPCR with resulting amplicon length.

Gene	Primer sequence	Reference	Fragment size (bp)	Annealing temperature
IL1A	for 5'-TCA TCC ACC AGG AAT GCA TC-3'	[19]	300 bp	59°C
	rev 5'-AGC CAT GCT TTT CCC AGA AG-3'			
IL6	for 5'-TCC AGA ACG AGT ATG AGG-3'	[68]	236 bp	56°C
	rev 5'-CAT CCG AAT AGC TCT CAG-3'			
IL8	for 5'-CGA TGC CAA TGC ATA AAA AC-3'	[20]	153 bp	56°C
	rev 5'-CTT TTC CTT GGG GTT TAG GC-3'			
PTGS2	for 5'-CTC TTC CTC CTG TGC CTG AT-3'	[34]	359 bp	60°C
	rev 5'-CTG AGT ATC TTT GAC TGT GGG AG-3'			
TLR2	for 5'-GTA CCC ATG ATG GAA TTG GC-3'	NM_174197	446 bp	60°C
	rev 5'-TGG CCA CTG ACA AGT TTC AG-3'			
TLR6	for 5'-GGA AAG CTA CAA GGG AAC CC-3'	NM_001001159	276 bp	60°C
	rev 5'-ACC CAG GCA GAG TCA TGT TC-3'			
ACTB	for 5'-CGG TGC CCA TCT ATG AGG-3'	AY141970	266 bp	58°C
	rev 5'-GAT GGT GAT GAC CTG CCC-3'			
SDHA	for 5'-GGG AGG ACT TCA AGG AGA GG-3'	BT030722	219 bp	60°C
	rev 5'-CTC CTC AGT AGG AGC GGA TG-3'			
GAPDH	for 5'-CCC AGA AGA CTG TGG ATG G-3'	U85042	306 bp	62°C
	rev 5'-AGT CGC AGG AGA CAA CCT G-3'			

doi:10.1371/journal.pone.0119793.t001

and 30 s at 72°C. Melting point analysis of the amplified products confirmed specific amplification. For mRNA quantification, a dilution series of PCR products with known concentrations generated in a conventional PCR was amplified simultaneously with the samples as a standard. Quantities of specific mRNA were calculated using the standard curves and Rotor Gene 6.1 software (Corbett Research). Amplicons were commercially sequenced (GATC Biotech) and showed a 100% homology to known bovine sequences. For normalisation of mRNA expression, beta actin (*ACTB*), succinate dehydrogenase complex, subunit A (*SDHA*) and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) (Table 1) were used as reference genes. These selected reference genes were stably expressed.

ELISA and EIA

Supernatants of the co-culture of endometrial epithelial cells with isolated lactobacilli and *L. vaginalis* were analysed for concentrations of IL6 and IL8 by ELISA, as well as of prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) and prostaglandin E_2 (PGE_2) by EIA. Concentrations were measured after 24 and 48 h of co-culture using commercially available kits according to the manufacturer's instructions [Bovine IL-6 Screening Set (Thermo Scientific); Human CXCL8/IL-8 DuoSet (R&D Systems, Wiesbaden, Germany); Prostaglandin $F_{2\alpha}$ EIA Kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, USA); Prostaglandin E_2 EIA Kit (Cayman Chemical)]. Dilutions of the samples within the detection range were used for each ELISA or EIA. Cross-reaction of the antibody pairs of Human CXCL8/IL-8 DuoSet to bovine IL8 has previously been shown [36]. Cell culture supernatants were centrifuged twice (400 g and 16,200 g for 5 min, respectively) after harvesting to remove epithelial cells and bacteria. Supernatants were stored at -80°C until measurement. Each experiment was conducted in duplicate using endometrial epithelial cells isolated from three different animals. Concentrations of pro-inflammatory factors in cell culture supernatants were estimated using a microtitre reader (iMark Bio Rad, Bio-Rad Laboratories, Munich, Germany) by comparing with standard curves.

Statistical analysis

For relative quantification of the mRNA expression of the investigated factors, absolute quantities of each gene were divided through the corresponding normalisation factor calculated with the expression of the reference genes *ACTB*, *SDHA* and *GAPDH* by geNorm [37]. Normalised data were analysed by the Wilcoxon signed-rank test by comparing each MOI to the control at the same point in time. The normalised expression in controls and treatments at each point in time was calculated relative to the expression in control cells at 0 h that was set equal to one. Bar charts were generated using the relative values with bars representing the means \pm SEM (n = 5).

All values of pro-inflammatory factors in cell culture supernatants were scaled relative to the concentration in control cell supernatants after 24 h that was defined as one. Bar charts represent the means \pm SEM (n = 3).

All statistical calculations were performed by using SPSS version 20 (SPSS, Chicago, USA). Values of $P < 0.5$ were considered to be significant.

Results

Characterisation of isolated bacteria

Uterine cytobrush samples collected from 11 healthy lactating cows were analysed for the presence of lactobacilli. Gram-positive, catalase-negative, indole-negative and nitrate reduction-negative micro-organisms were identified as lactobacilli [38]. Samples from two animals were culture-negative. All culture-positive samples showed slight bacterial growth (<10 colonies). Only catalase-positive colonies grew on the agar plates of three samples. These bacteria were not further identified because this was not the focus of this study. A *Lactobacillus*-specific PCR revealed nine isolates belonging to the *Lactobacillus* group with a product size of approximately 250 bp (data not shown). Sequencing with phylogenetic 16S rDNA primers identified these isolates as *L. buchneri*, *L. ruminis*, *L. amylovorus*, *L. plantarum* and *L. similis*. Three isolates were determined as the closest relatives to *Weissella paramesenteroides* and one to *Pediococcus pentosaceus*. The identity of the isolates in comparison to the NCBI database is listed in Table 2.

Viability assay

The trypan blue exclusion test was performed 96 h after the beginning of co-culture staining dead cells blue. Almost the same quantity of dead cells was observed in the co-culture of endometrial epithelial cells with *L. buchneri*, *L. ruminis*, *L. amylovorus* and *L. vaginalis* compared with control (>95% viable cells; S1 Fig.). Cell nuclei were stained with the fluorescent dyes ethidium bromide and acridine orange 72 h after the start of co-culturing, with dead cells appearing red and living cells green. The amount of dead cells in co-culture with *L. buchneri*, *L. ruminis*, *L. amylovorus* and *L. vaginalis* in all MOI was similar to control cells up to 72 h (up to 5%; S2 Fig.). Culturing of supernatants on MRS agar showed that lactobacilli were still viable after 24 and 48 h of co-culture (data not shown). It was observed that half-confluent epithelial cells reached confluence in the presence of *L. vaginalis*, *L. buchneri*, *L. ruminis* and *L. amylovorus* (data not shown).

IL1A mRNA expression in endometrial epithelial cells after co-culturing with different *Lactobacillus* species

IL1A mRNA expression was measured in bovine endometrial epithelial cells co-cultured with different *Lactobacillus* species for up to 6 h (Fig. 1). The presence of *L. vaginalis* only slightly, but significantly, influenced *IL1A* expression in co-cultured cells compared with controls (max.

Table 2. Qualitative characterisation of isolated uterine lactic acid bacteria.

Animal #	Identified Species	Type Strain	% Identity to Type Strain	Accession #
1	<i>Lactobacillus plantarum</i>	BS16	99	JX968493.1
	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	4	99	HG328247.1
	<i>Weissella paramesenteroides</i>	FMA204	99	HQ721255.1
2	<i>Lactobacillus similis</i>	LZLJ10–3	99	JQ043373.1
	<i>Weissella paramesenteroides</i>	CTSPL5	99	EU855224.1
3	<i>Lactobacillus buchneri</i>	NRRL B-30929	99	CP002652.1
4	<i>Lactobacillus ruminis</i>	ATCC27782	100	CP003032.1
5	<i>Weissella paramesenteroides</i>	TR7.1.15	99	HQ009793.1
6	<i>Lactobacillus amylovorus</i>	GRL1112	99	NR_075048.1

doi:10.1371/journal.pone.0119793.t002

twofold, Fig. 1 A). In contrast, *L. buchneri* caused no significant difference in mRNA expression of *IL1A* independently of the time of co-culture (Fig. 1 B). *IL1A* expression increased over the time of co-culturing, with *L. ruminis* reaching the highest level (~ sixfold) after 6 h in MOI 10 compared with control cells (Fig. 1 C). mRNA expression of *IL1A* was on a similar level in endometrial epithelial cells co-cultured with *L. amylovorus* at each point in time, but increased from MOI 1 to 10 (up to eightfold) compared with cells cultured without bacteria (Fig. 1 D).

IL6 mRNA expression in endometrial epithelial cells after co-culturing with different *Lactobacillus* species

There was no significant difference in *IL6* expression in cells co-cultured with *L. vaginalis* and *L. buchneri* compared with control cells (Fig. 2 A, B). In contrast, *IL6* was significantly more highly expressed in cells co-cultured with *L. ruminis*, reaching the highest level (about fourfold) after 4 h in MOI 10 compared with the control (Fig. 2 C). The greatest influence on *IL6* expression was observed in endometrial epithelial cells co-cultured with *L. amylovorus*. Expression levels reached a maximum (about 12-fold) after 2 h MOI dependently compared with controls and decreased thereafter, but stayed on a higher level than controls (Fig. 2 D).

IL8 mRNA expression in endometrial epithelial cells after co-culturing with different *Lactobacillus* species

Co-culture with *L. vaginalis* and *L. buchneri* did not affect *IL8* expression in endometrial epithelial cells compared with untreated cells (Fig. 3 A, B). Increasing *IL8* expression levels were observed after 4 and 6 h in cells co-cultured with *L. ruminis* depending on the quantity of MOI (max. fourfold) compared with untreated control cells (Fig. 3 C). *IL8* expression was found on a higher level (two- to sixfold) during the whole time of co-culture of endometrial cells with *L. amylovorus* dependently on MOI compared with controls, reaching the highest levels at MOI 10 at each point in time (Fig. 3 D).

PTGS2 mRNA expression in endometrial epithelial cells after co-culturing with different *Lactobacillus* species

Comparable to *IL6* and *IL8* expression, *PTGS2* expression was not significantly different in cells co-cultured with *L. vaginalis* and *L. buchneri* compared with untreated cells (Fig. 4 A, B). A slight increase in *PTGS2* expression (up to ~ fourfold) was detected in endometrial cells co-cultured with *L. ruminis* compared with the control (Fig. 4 C). After 2 h exposure, *PTGS2*

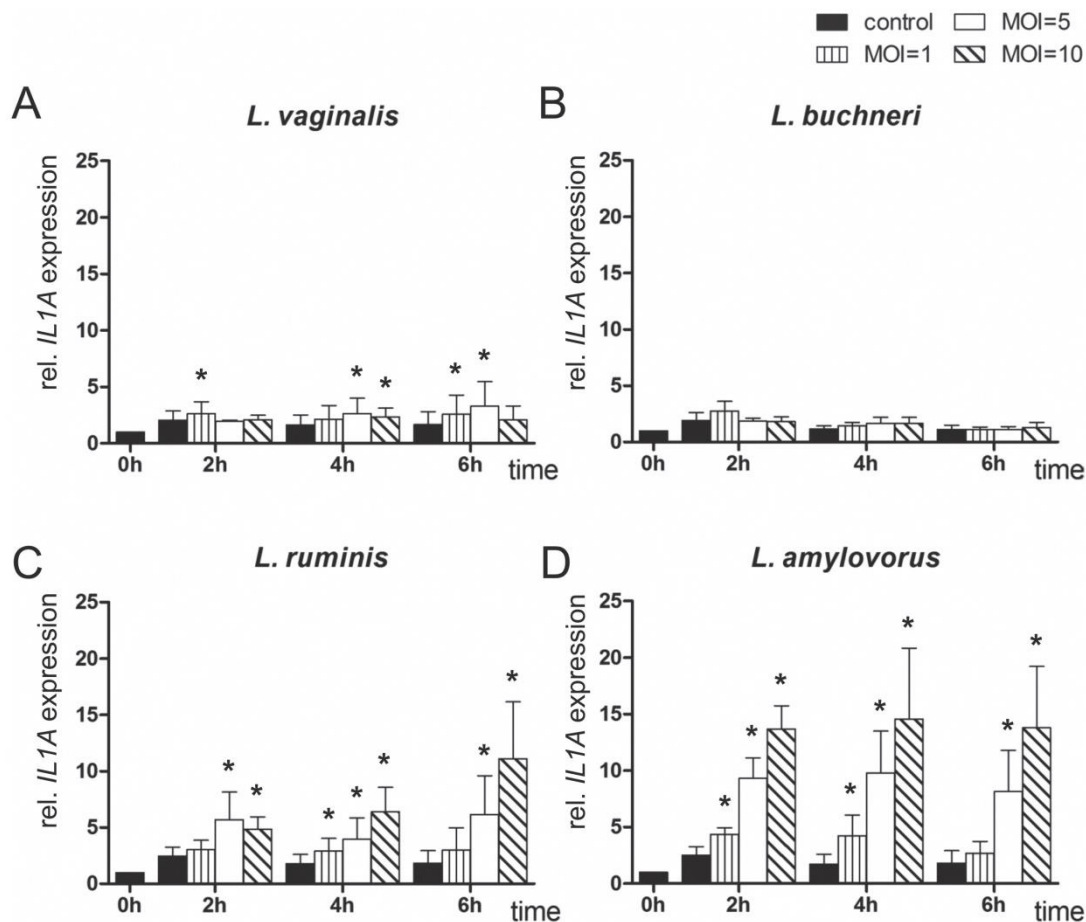


Fig 1. Expression analysis of *IL1A* by means of RT-qPCR. *IL1A* mRNA expression was determined in bovine endometrial epithelial cells after co-culture with (A) *L. vaginalis*; (B) *L. buchneri*; (C) *L. ruminis*; and (D) *L. amylovorus* in MOI 1, 5 and 10 for up to 6 h (n = 5 animals). All expression values were calculated relative to the individual expression of *ACTB*, *GAPDH* and *SDHA* as internal control. Normalised data were scaled relative to the expression in control cells at time 0 h, which was defined as one. Bars represent means \pm SEM; * = P < 0.05.

doi:10.1371/journal.pone.0119793.g001

expression was up to sixfold higher in cells co-cultured with *L. amylovorus* and decreased after 4 and 6 h, but remained higher than in control cells in MOI 5 and 10 (Fig. 4 D).

TLR2 and *TLR6* mRNA expression in endometrial epithelial cells after co-culturing with different *Lactobacillus* species

TLR2 and *TLR6* transcripts were present in co-cultured as well as in control cells, but did not differ significantly between these groups (data not shown).

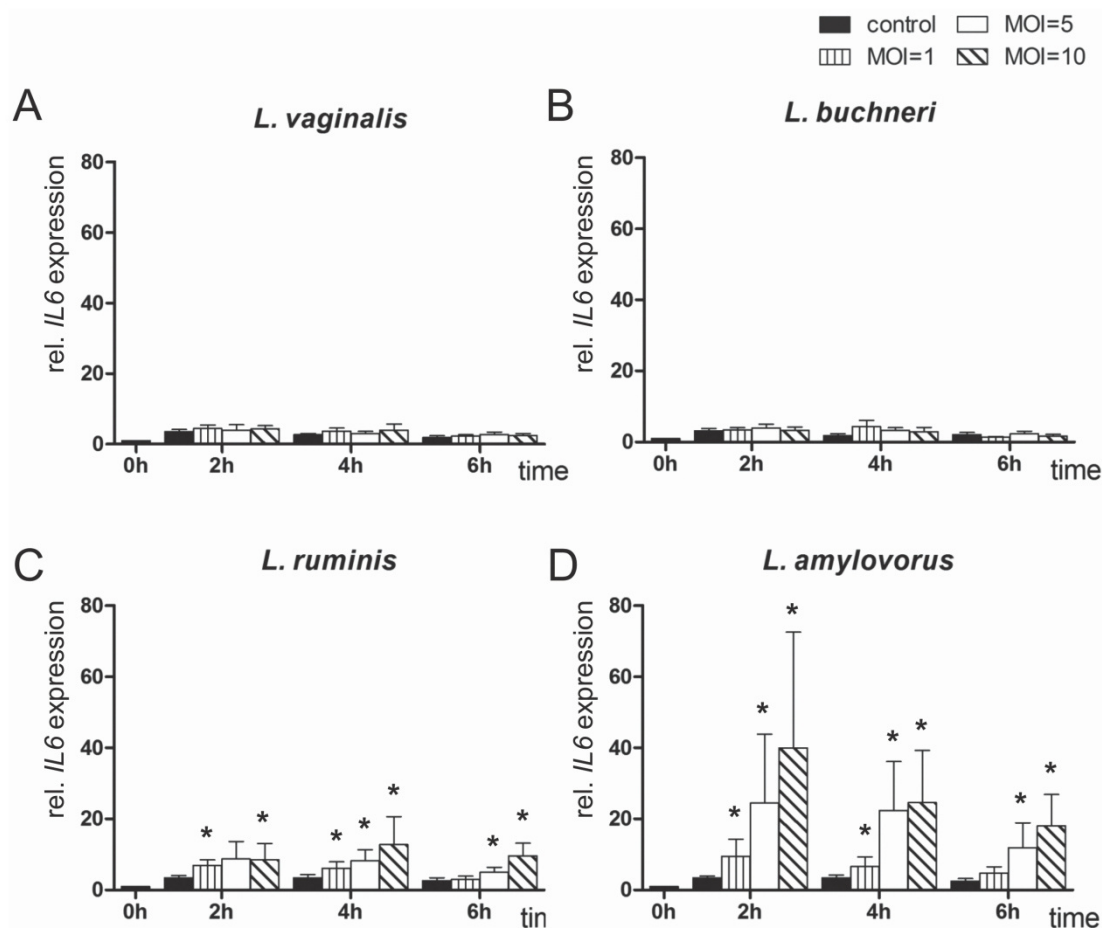


Fig 2. Expression analysis of IL6 by means of RT-qPCR. IL6 mRNA expression was determined in bovine endometrial epithelial cells after co-culture with (A) *L. vaginalis*; (B) *L. buchneri*; (C) *L. ruminis*; and (D) *L. amylovorus* in MOI 1, 5 and 10 for up to 6 h (n = 5 animals). All expression values were calculated relative to the individual expression of *ACTB*, *GAPDH* and *SDHA* as internal control. Normalised data were scaled relative to the expression in control cells at time 0 h, which was defined as one. Bars represent means \pm SEM; * = P < 0.05.

doi:10.1371/journal.pone.0119793.g002

Release of pro-inflammatory factors by co-cultured endometrial epithelial cells

Concentrations of IL6 remained in supernatants of co-cultured cells as well as in controls under the detection limit of 78 pg/ml of the Bovine IL-6 Screening Set, even after 48 h of co-culture in undiluted samples (data not shown). There was no difference in IL8 release in cells co-cultured with *L. buchneri* after 24 and 48 h compared with control cells (Fig. 5). Co-culture of endometrial cells with *L. vaginalis* and *L. ruminis* caused a similar accumulation of IL8 (up to fourfold) after 24 h compared with the controls. After 48 h, expression levels of IL8 were increased (up to seven- and ninefold in MOI 10) by *L. vaginalis* and *L. ruminis* compared with the controls, respectively (Fig. 5). The greatest difference in IL8 accumulation compared with untreated cells was detected in endometrial cells co-cultured with *L. amylovorus* (Fig. 5). IL8

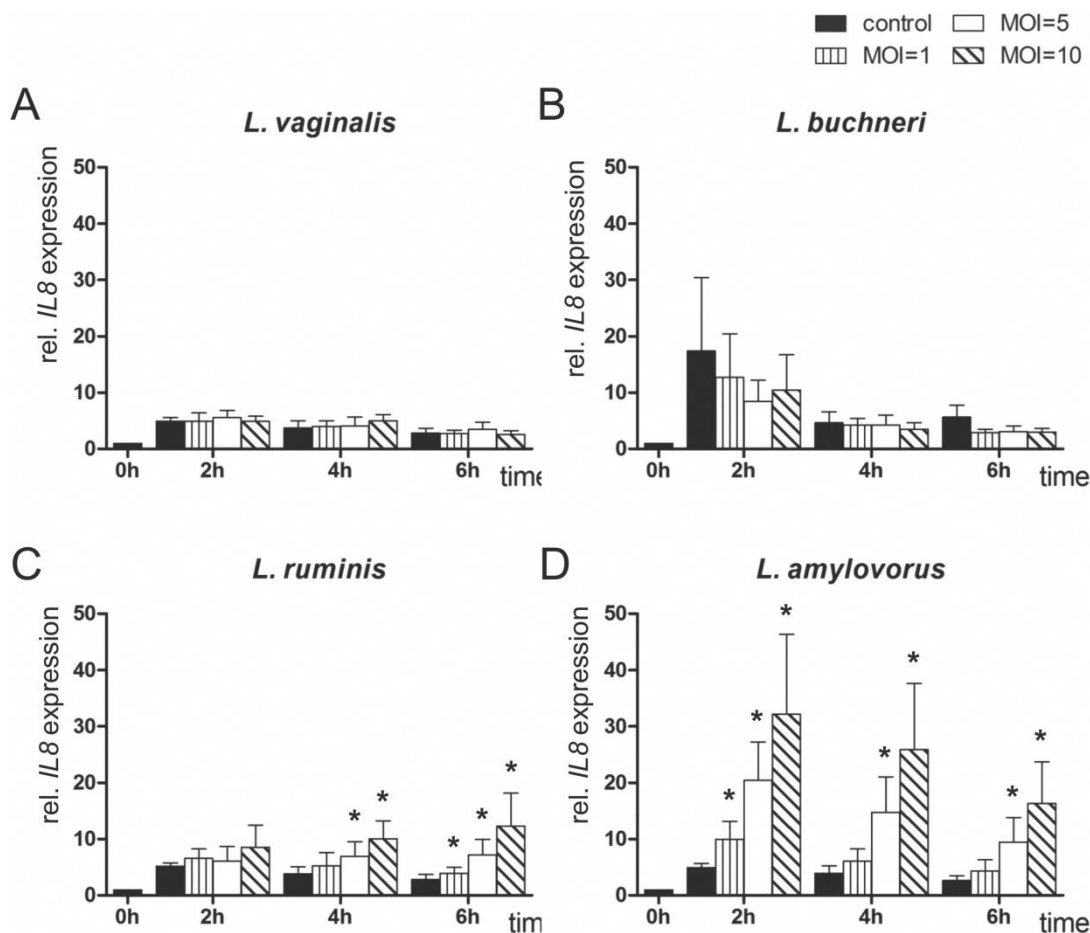


Fig 3. Expression analysis of *IL8* by means of RT-qPCR. *IL8* mRNA expression was determined in bovine endometrial epithelial cells after co-culture with (A) *L. vaginalis*; (B) *L. buchneri*; (C) *L. ruminis*; and (D) *L. amylovorus* in MOI 1, 5 and 10 for up to 6 h (n = 5 animals). All expression values were calculated relative to the individual expression of *ACTB*, *GAPDH* and *SDHA* as internal control. Normalised data were scaled relative to the expression in control cells at time 0 h, which was defined as one. Bars represent means \pm SEM; * = P < 0.05.

doi:10.1371/journal.pone.0119793.g003

concentration increased up to 14-fold in MOI 10 after 24 h and remained on this high level (about 12-fold) after 48 h compared with control cells with interindividual variations, respectively. IL8 accumulation differed up to threefold after 24 h and up to 10-fold after 48 h between epithelial cells isolated from different animals in co-culture with *L. amylovorus*. Between the epithelial cells obtained from different animals, a high variation was observed in the value range for IL8 (~ 1–32 pg/ml to 10–150 pg/ml).

A PGE₂ production by co-cultured as well as untreated epithelial cells could not be measured (detection limit = 15 pg/ml), neither could PGE₂ be measured in undiluted samples after 48 h of co-culturing (data not shown).

L. buchneri did not influence PGF_{2 α} accumulation in cell culture supernatants after 24 and 48 h compared with untreated cells (Fig. 6). PGF_{2 α} release by endometrial epithelial cells

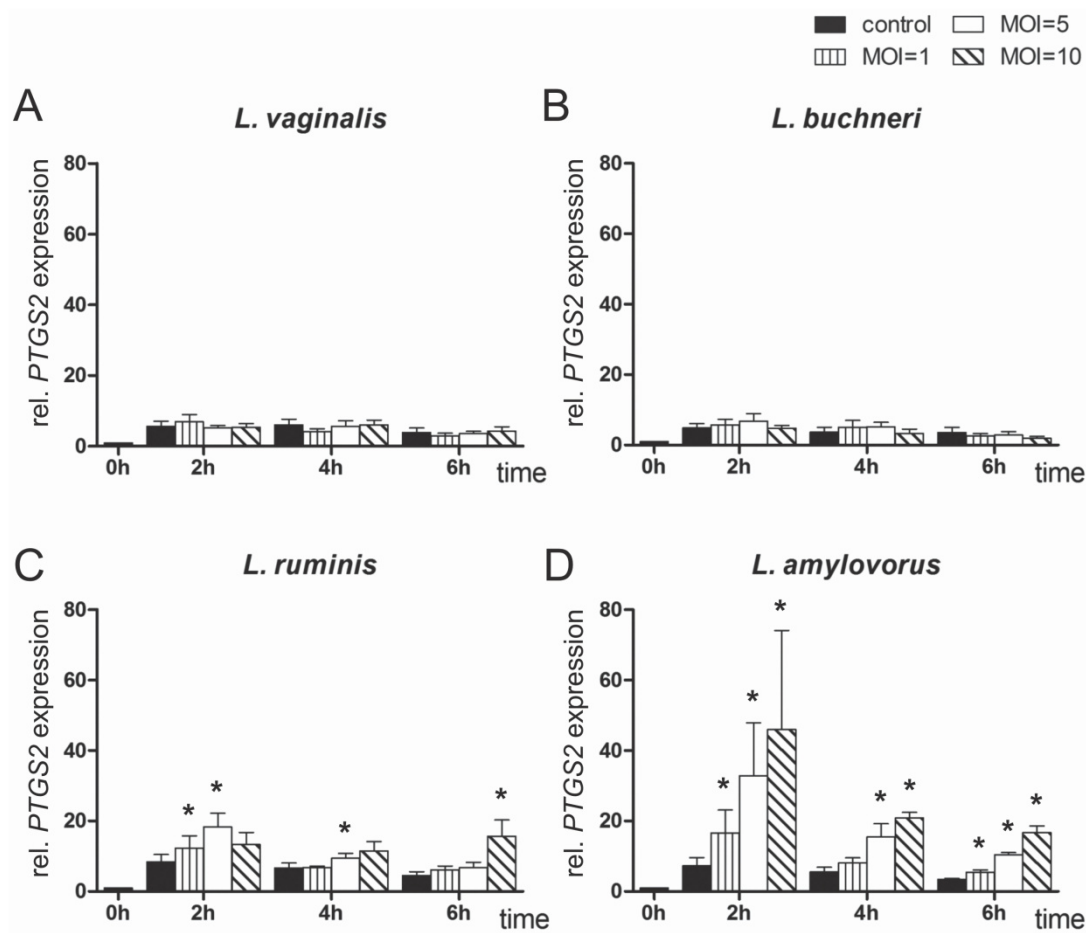


Fig 4. Expression analysis of *PTGS2* by means of RT-qPCR. *PTGS2* mRNA expression was determined in bovine endometrial epithelial cells after co-culture with (A) *L. vaginalis*; (B) *L. buchneri*; (C) *L. ruminis*; and (D) *L. amylovorus* in MOI 1, 5 and 10 for up to 6 h (n = 5 animals). All expression values were calculated relative to the individual expression of *ACTB*, *GAPDH* and *SDHA* as internal control. Normalised data were scaled relative to the expression in control cells at time 0 h, which was defined as one. Bars represent means \pm SEM; * = P < 0.05.

doi:10.1371/journal.pone.0119793.g004

slightly increased in co-culture with *L. vaginalis* and *L. ruminis* (up to fourfold after 24 h; up to two- and eightfold after 48 h, respectively) compared with control cells (Fig. 6). The highest release of $\text{PGF}_{2\alpha}$ by endometrial epithelial cells was detected in co-culture with *L. amylovorus* (Fig. 6). The difference was up to 38-fold after 24 h and up to 31-fold after 48 h in comparison between co-cultured and untreated cells with obvious interindividual variations (value range between around 100 pg/ml and 50 ng/ml). $\text{PGF}_{2\alpha}$ production in the presence of *L. amylovorus* differed up to 20-fold after 24 h and up to 33-fold after 48 h in comparison between endometrial epithelial cells isolated from different animals.

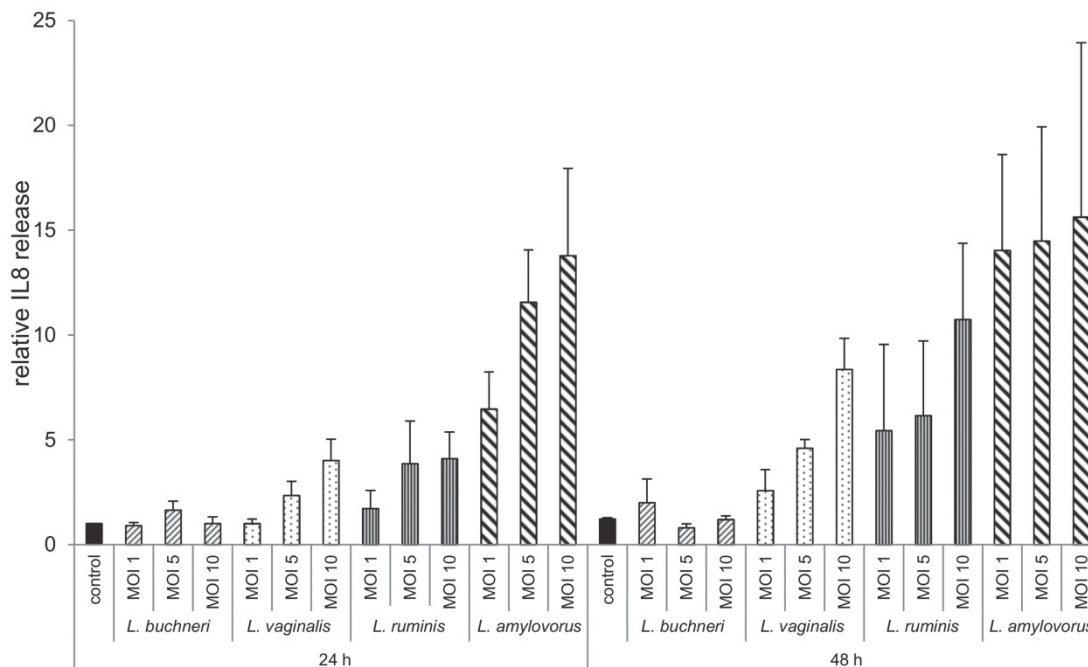


Fig 5. Analysis of IL8 release by means of ELISA. Accumulation of IL8 was measured in supernatants of bovine endometrial epithelial cells co-cultured with *L. buchneri*, *L. ruminis*, *L. amylovorus* and *L. vaginalis* in MOI 1, 5 and 10 for 24 and 48 h by ELISA (n = 3 animals). All data were scaled relative to the concentration in supernatants of control cells at time 24 h, which was defined as one. Bars represent means ± SEM.

doi:10.1371/journal.pone.0119793.g005

Discussion

The microbiota present in the uterus of postpartum cows has been the subject of various studies over the last few decades [1,5,39,40], whereby the main focus was on pathogenic bacteria that cause uterine diseases such as metritis, and clinical and subclinical endometritis [2,41,42]. This is the first study describing in depth the isolation and molecular characterisation of commensal lactobacilli from the bovine uterus. Several *Lactobacillus* spp. as well as *Weissella* spp. and *Pediococcus* sp. were isolated from endometrial cytobrush samples. Similarly, *L. buchneri* and *L. brevis* were present in the bovine vagina [43]. Machado et al. [44] found the genus *Lactobacillus* by metagenomic pyrosequencing of the 16S rRNA gene in 41% of uterine lavage samples from healthy cows. However, the presence of alive lactobacilli was not demonstrated in that study. *In vitro* experiments in the present study were performed with three isolates of *Lactobacillus* spp. in comparison to *L. vaginalis*, which is part of the microbiota in the human vagina [45]. This strain was chosen as being representative of the commensal, non-pathogenic bacteria in the female genital tract.

Bacteria that invade the bovine uterus can be categorised into three groups according to their expected pathogenic potential [1]: (1) pathogens that cause uterine endometrial lesions; (2) potential pathogens commonly not associated with endometrial lesions, but frequently isolated from the bovine uterine lumen and cases of endometritis; and (3) opportunist contaminants transiently isolated from the uterine lumen and not associated with endometritis. In the present study, viability assays demonstrated that *L. buchneri*, *L. ruminis*, *L. amylovorus* and

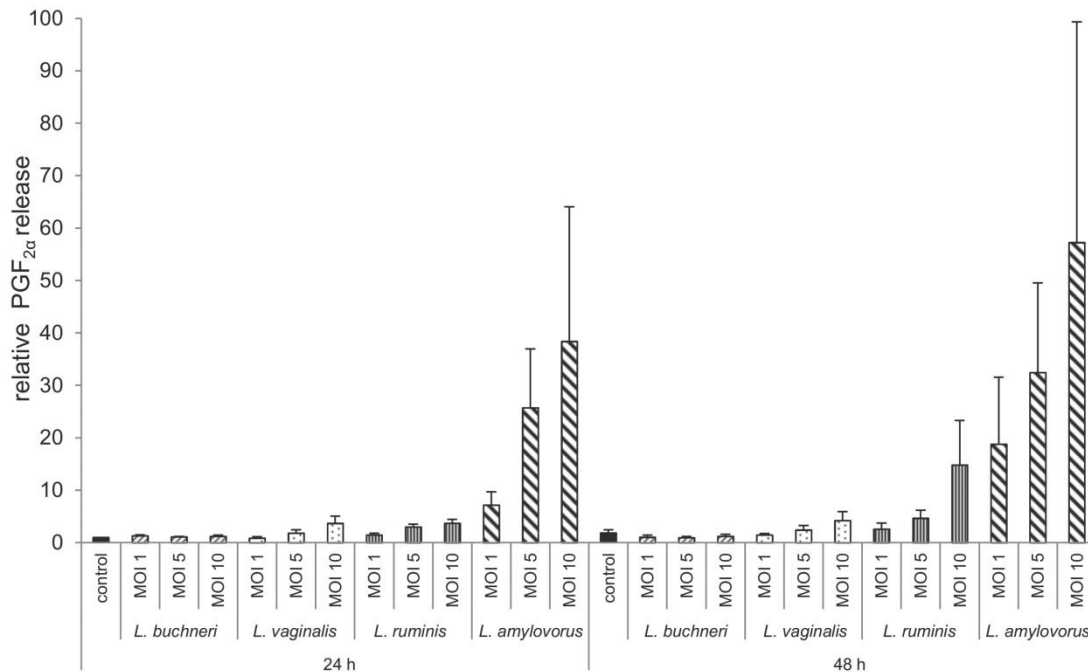


Fig 6. Analysis of PGF_{2α} release by means of EIA. Accumulation of PGF_{2α} was measured in supernatants of bovine endometrial epithelial cells co-cultured with *L. buchneri*, *L. ruminis*, *L. amylovorus* and *L. vaginalis* in MOI 1, 5 and 10 for 24 and 48 h by EIA (n = 3 animals). All data were scaled relative to the concentration in supernatants of control cells at time 24 h, which was defined as one. Bars represent means ± SEM.

doi:10.1371/journal.pone.0119793.g006

L. vaginalis have no negative influence on the survival and vitality of co-cultured endometrial epithelial cells. These results are comparable with findings of human vaginal epithelial cells exposed to *L. rhamnosus* and *L. reuteri* [25]. The viability of the co-cultured vaginal cells was not affected by lactobacilli. This indicates that also in the bovine uterus lactobacilli belong to the commensal microbiota not associated with endometrial lesions.

Even though the viability of endometrial cells was not influenced in the present study, the ability of lactic acid bacteria to modulate the host immune response has been described in cattle and humans [10,46,47], where increased cytokine expression is involved [48]. Therefore, one aim of this study was to examine the capability of different *Lactobacillus* species to modulate inflammatory responses in bovine endometrial epithelial cells. Interleukins such as IL1A, IL6 and IL8 play an important role in causing inflammation [15]. The pro-inflammatory cytokine IL1A stimulates the production of PGE₂, platelet activating factor as well as nitric oxide and promotes the infiltration of inflammatory cells into the extravascular space [49]. In addition, IL6 promotes inflammation by the activation of acute phase response and stimulation of lymphocytes [50]. In cattle, IL6 takes part in the immune defence of the endometrium against bacterial invasion [51]. The chemokine IL8 attracts neutrophils to inflammatory sites and activates them, resulting in the influx of PMNs into the uterine lumen, which is essential for bacterial clearance after calving [14].

In the present study, *L. ruminis* and especially *L. amylovorus* caused higher mRNA expression of *IL1A*, *IL6* and *IL8* in co-cultured endometrial epithelial cells than in control cells, showing the ability of lactobacilli to stimulate endometrial immune response. This result was

confirmed by the detection of a higher accumulation of IL8 in the supernatants of epithelial cells co-cultured with *L. ruminis*, and to a greater degree with *L. amylovorus*, than without bacteria. Previous studies have indicated immunomodulatory activities of lactic acid bacteria. In cattle, administration of *Lactococcus lactis* in the mammary gland induced enhanced *IL1B* and *IL8* mRNA expression [48]. Furthermore, in humans, stimulation of human vaginal epithelial cells with *L. rhamnosus* and *L. reuteri* resulted in an increased *IL1A*, *IL1B* and *IL8* mRNA expression [25]. Co-culture with *L. fermentum* or *L. salivarius* isolated from human breast milk induced enhanced IL8 production in peripheral blood mononuclear cells [26]. In contrast, colonisation of human vaginal epithelial cell multilayer cultures with *L. crispatus* or *L. jensenii* did not alter IL8 secretion [52]. Our results are consistent with these findings. *IL8* expression and release were not influenced by *L. buchneri*, assuming that lactobacilli isolated from bovine uteri have different immunomodulatory properties.

Not only commensal bacteria, but also several pathogenic bacteria have been shown to stimulate the expression and release of interleukins in endometrial cells. Treatment with *E. coli* for 6 h increased *IL1B*, *IL6* and *IL8* mRNA expression (17-fold to 121-fold) in bovine endometrial epithelial cells compared with untreated cells [53]. LPS purified from *E. coli* stimulated mRNA expression of *IL1B*, *IL6* and *IL8* (tenfold to 110-fold) in endometrial epithelial cells compared with control cells [54]. In addition, *IL1B*, *IL6* and *IL8* production by endometrial explants was increased after treatment with *E. coli* or *T. pyogenes* compared with controls [55]. Cows with uterine diseases, often associated with pathogens such as *E. coli* and *T. pyogenes*, are known for increased expression of pro-inflammatory factors in the endometrium. Recently, a study was performed with a potentially pathogenic *Bacillus pumilus* isolated from the bovine uterus [56]. mRNA expression of *IL1A*, *IL6* and *IL8* was around two- to threefold higher in bovine endometrial epithelial cells co-cultured with *B. pumilus* than with *L. amylovorus* in the present study. These findings show that excessive expression of pro-inflammatory factors by the endometrium supports the development of uterine diseases, but an adequate immune response is necessary for bacterial clearance after parturition. Commensal bacteria such as lactobacilli can moderately contribute to stimulating this immune reaction of the endometrium.

Besides interleukins, prostaglandins are involved in inflammatory processes, but they also have different reproductive functions in mammals as regulators of the oestrous cycle, implantation and parturition [57]. In cattle, $\text{PGF}_{2\alpha}$ and PGE_2 are considered to act in a luteolytic and lutetrophic manner, respectively [58]. Synthesis of $\text{PGF}_{2\alpha}$ and PGE_2 from arachidonic acid in the endometrium is regulated by *PTGS2* [59]. Pathogenic bacteria have been shown to influence *PTGS2* expression and prostaglandin production. Stimulation of bovine endometrial cells with *E. coli* or LPS increased the *PTGS2* mRNA expression and release of $\text{PGF}_{2\alpha}$ and PGE_2 [16]. Endometrial explants treated with LPS produced an increased ratio of PGE_2 to $\text{PGF}_{2\alpha}$. This switch from $\text{PGF}_{2\alpha}$ to PGE_2 production was confirmed by findings of higher concentrations of PGE_2 than $\text{PGF}_{2\alpha}$ in supernatants of bovine endometrial cells stimulated with LPS [60]. In addition, a bacteria-free filtrate of *T. pyogenes* was able to enhance $\text{PGF}_{2\alpha}$ and PGE_2 production in endometrial explants and bovine endometrial cells [61]. The endocrine switch in prostaglandin secretion from $\text{PGF}_{2\alpha}$ to PGE_2 by bovine endometrium has an influence on the fertility of cows assuming a mechanism for prolonged luteal phases in animals with uterine disease [60]. This study showed that *L. ruminis* and *L. amylovorus* isolated from bovine uteri also induced increased *PTGS2* expression in bovine endometrial epithelial cells. A $\text{PGF}_{2\alpha}$ release by endometrial epithelial cells was mainly increased by *L. amylovorus* promoting rather a luteolytic condition in the uterine environment. In contrast to the earlier findings mentioned above, we observed no influence of lactobacilli on PGE_2 production, which remained under the detection limit. However, previous studies support the finding of $\text{PGF}_{2\alpha}$ production by epithelial cells and PGE_2 by stromal cells [16,62].

In the human genital tract, lactobacilli are well studied, recognising their beneficial properties for women's health [9,12,63]. However, in cattle the role of lactobacilli in the uterus is virtually unstudied. Only one study demonstrated the stimulation of cell defence mechanisms of the bovine endometrium by intrauterine infusion of selected *Lactobacillus* strains [64]. The survival of the infused lactobacilli was confirmed for up to 12 days and cellular infiltration of the endometrium mostly by mononuclear cells was shown. Moreover, an intravaginal administration of different lactic acid bacteria resulted in a reduced incidence of purulent vaginal discharges in dairy cows [65]. Our outcome supports the finding that some *Lactobacillus* species have the ability to act as an immunostimulant to the female genital tract. Immunostimulatory properties of a *L. ruminis* strain have been shown in humans [66]. The finding of pro-inflammatory flagellin proteins produced by a *L. ruminis* strain could be a further explanation of immunostimulatory properties of *L. ruminis* [67].

In conclusion, the results of the present study demonstrate that there are *Lactobacillus* species present in the bovine uterus possessing immunomodulatory properties of endometrial cells. In particular, *L. amylovorus* and *L. ruminis* increased mRNA expression of the pro-inflammatory factors *IL1A*, *IL6* and *IL8* as well as *PTGS2* in bovine endometrial epithelial cells, which was confirmed by enhanced *IL8* and *PGF_{2α}* concentrations in cell culture supernatants. All examined *Lactobacillus* species had no negative influence on the viability of co-cultured bovine endometrial epithelial cells. These findings support the hypothesis that the presence of lactobacilli may stimulate the immune response without showing cytotoxic effects on the endometrium.

Supporting Information

S1 Fig. Viability evaluation of co-cultured bovine endometrial epithelial cells by means of trypan blue staining. Bovine endometrial epithelial cells were stained with trypan blue after 96 h of co-culture (A) with *L. buchneri* in MOI 10; (B) with *L. ruminis* in MOI 10; (C) with *L. amylovorus* in MOI 10; (D) with *L. vaginalis* in MOI 10; (E) control. Dead cells were stained in blue. 100x magnification. (TIF)

S2 Fig. Viability evaluation of co-cultured bovine endometrial epithelial cells by means of ethidium bromide/acridine orange staining. Bovine endometrial epithelial cells were stained with ethidium bromide/acridine orange after 72 h of co-culture (A) with *L. buchneri* in MOI 10; (B) with *L. ruminis* in MOI 10; (C) with *L. amylovorus* in MOI 10; (D) with *L. vaginalis* in MOI 10; (E) control. The nuclei of dead cells were stained in red and living cells in green. 200x magnification. (TIF)

Acknowledgments

We thank Schlachtbetrieb GmbH Perleberg (Perleberg, Germany) for the opportunity to harvest tissues and acknowledge the cooperation of the dairy farms. We are also grateful to Christoph Holder for his technical assistance.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MAG MJ RE CG. Performed the experiments: MAG NB. Analyzed the data: MAG CG. Contributed reagents/materials/analysis tools: MAG AB NB MJ RE CG. Wrote the paper: MAG AB MJ RE CG.

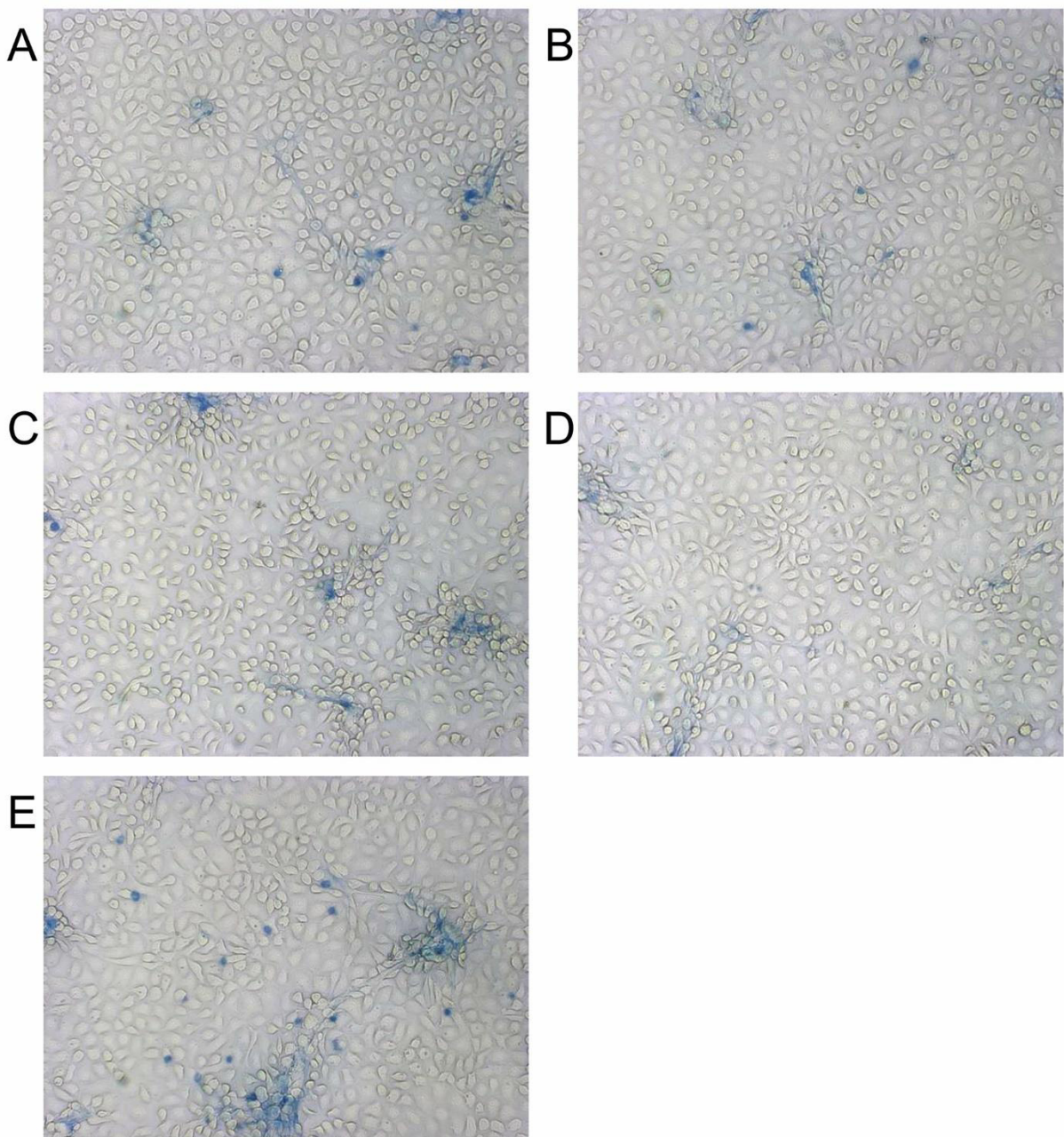
References

- Sheldon IM, Noakes DE, Rycroft AN, Pfeiffer DU, Dobson H. Influence of uterine bacterial contamination after parturition on ovarian dominant follicle selection and follicle growth and function in cattle. *Reproduction*. 2002; 123: 837–845. PMID: [12052238](#)
- Williams EJ, Fischer DP, Pfeiffer DU, England GCW, Noakes DE, Dobson H, et al. Clinical evaluation of postpartum vaginal mucus reflects uterine bacterial infection and the immune response in cattle. *Theriogenology*. 2005; 63: 102–117. PMID: [15589277](#)
- Santos TM, Caixeta LS, Machado VS, Rauf AK, Gilbert RO, Bicalho RC. Antimicrobial resistance and presence of virulence factor genes in *Arcanobacterium pyogenes* isolated from the uterus of postpartum dairy cows. *Vet Microbiol*. 2010; 145: 84–89. doi: [10.1016/j.vetmic.2010.03.001](#) PMID: [20346602](#)
- Werner A, Suthar V, Plöntzke J, Heuwieser W. Relationship between bacteriological findings in the second and fourth week postpartum and uterine infection in dairy cows considering bacteriological results. *J Dairy Sci*. 2012; 95: 7105–7114. doi: [10.3168/jds.2012-5627](#) PMID: [23021749](#)
- Messier S, Higgins R, Couture Y, Morin M. Comparison of swabbing and biopsy for studying the flora of the bovine uterus. *Can Vet J*. 1984; 25: 283–288. PMID: [17422427](#)
- Williams BL, Senger PL, Stephens LR, Ward AC. Relationships between days post partum, observed estrus and uterine microflora in commercial dairy cows. *Theriogenology*. 1988; 30: 555–561. PMID: [16726498](#)
- Otero C, Saavedra L, Silva de Ruiz C, Wilde O, Holgado AR, Nader-Macías ME. Vaginal bacterial microflora modifications during the growth of healthy cows. *Lett Appl Microbiol*. 2000; 31: 251–254. PMID: [10972739](#)
- Rodríguez C, Cofré JV, Sánchez M, Fernández P, Boggiano G, Castro E. Lactobacilli isolated from vaginal vault of dairy and meat cows during progesteronic stage of estrous cycle. *Anaerobe*. 2011; 17: 15–18. doi: [10.1016/j.anaerobe.2010.12.001](#) PMID: [21145403](#)
- Vitali B, Pugliese C, Biagi E, Candela M, Turroni S, Bellen G, et al. Dynamics of vaginal bacterial communities in women developing bacterial vaginosis, candidiasis, or no infection, analyzed by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and real-time PCR. *Appl Environ Microbiol*. 2007; 73: 5731–5741. PMID: [17644631](#)
- Reid G, Burton J. Use of *Lactobacillus* to prevent infection by pathogenic bacteria. *Microbes Infect*. 2002; 4: 319–324. PMID: [11909742](#)
- Atassi F, Brassart D, Grob P, Graf F, Servin AL. *Lactobacillus* strains isolated from the vaginal microbiota of healthy women inhibit *Prevotella bivia* and *Gardnerella vaginalis* in coculture and cell culture. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2006; 48: 424–432. PMID: [17059467](#)
- Dover SE, Aroutcheva AA, Faro S, Chikindas ML. Natural antimicrobials and their role in vaginal health: a short review. *Int J Probiotics Prebiotics*. 2008; 3: 219–230. PMID: [20657710](#)
- Beutler BA. TLRs and innate immunity. *Blood*. 2008; 113: 1399–1407. doi: [10.1182/blood-2008-07-019307](#) PMID: [18757776](#)
- Sheldon IM, Cronin J, Goetze L, Donofrio G, Schubert H. Defining postpartum uterine disease and the mechanisms of infection and immunity in the female reproductive tract in cattle. *Biol Reprod*. 2009; 81: 1025–1032. doi: [10.1095/biolreprod.109.077370](#) PMID: [19439727](#)
- LeBlanc SJ. Interactions of metabolism, inflammation, and reproductive tract health in the postpartum period in dairy cattle. *Reprod Domest Anim*. 2012; 47: 18–30. doi: [10.1111/j.1439-0531.2012.02109.x](#) PMID: [22913557](#)
- Herath S, Fischer DP, Werling D, Williams EJ, Lilly ST, Dobson H, et al. Expression and function of Toll-like receptor 4 in the endometrial cells of the uterus. *Endocrinology*. 2006; 147: 562–570. PMID: [16223858](#)
- Fourichon C, Seegers H, Malher X. Effect of disease on reproduction in the dairy cow: a meta-analysis. *Theriogenology*. 2000; 53: 1729–1759. PMID: [10968418](#)
- LeBlanc SJ. Postpartum uterine disease and dairy herd reproductive performance: a review. *Vet J*. 2008; 176: 102–114. doi: [10.1016/j.tvjl.2007.12.019](#) PMID: [18328749](#)
- Gabler C, Drillich M, Fischer C, Holder C, Heuwieser W, Einspanier R. Endometrial expression of selected transcripts involved in prostaglandin synthesis in cows with endometritis. *Theriogenology*. 2009; 71: 993–1004. doi: [10.1016/j.theriogenology.2008.11.009](#) PMID: [19162311](#)
- Fischer C, Drillich M, Odau S, Heuwieser W, Einspanier R, Gabler C. Selected pro-inflammatory factor transcripts in bovine endometrial epithelial cells are regulated during the oestrous cycle and elevated in case of subclinical or clinical endometritis. *Reprod Fertil Dev*. 2010; 22: 818–829. doi: [10.1071/RD09120](#) PMID: [20450834](#)

21. Chapwanya A, Meade KG, Doherty ML, Callanan JJ, Mee JF, O'Farrelly C. Histopathological and molecular evaluation of Holstein-Friesian cows postpartum: Toward an improved understanding of uterine innate immunity. *Theriogenology*. 2009; 71: 1396–1407. doi: [10.1016/j.theriogenology.2009.01.006](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.01.006) PMID: [19233457](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19233457/)
22. Gabler C, Fischer C, Drillich M, Einspanier R, Heuwieser W. Time-dependent mRNA expression of selected pro-inflammatory factors in the endometrium of primiparous cows postpartum. *Reprod Biol Endocrinol*. 2010; 8: 152. doi: [10.1186/1477-7827-8-152](https://doi.org/10.1186/1477-7827-8-152) PMID: [21176181](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21176181/)
23. Galvão KN, Santos NR, Galvão JS, Gilbert RO. Association between endometritis and endometrial cytokine expression in postpartum Holstein cows. *Theriogenology*. 2011; 76: 290–299. doi: [10.1016/j.theriogenology.2011.02.006](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.02.006) PMID: [21496904](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21496904/)
24. Sheldon IM, Rycroft AN, Dogan B, Craven M, Bromfield JJ, Chandler A, et al. Specific strains of *Escherichia coli* are pathogenic for the endometrium of cattle and cause pelvic inflammatory disease in cattle and mice. *PLoS ONE*. 2010; 5: e9192. doi: [10.1371/journal.pone.0009192](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009192) PMID: [20169203](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20169203/)
25. Wagner RD, Johnson SJ. Probiotic *Lactobacillus* and estrogen effects on vaginal epithelial gene expression responses to *Candida albicans*. *J Biomed Sci*. 2012; 19: 58. doi: [10.1186/1423-0127-19-58](https://doi.org/10.1186/1423-0127-19-58) PMID: [22715972](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22715972/)
26. Perez-Cano FJ, Dong H, Yaqoob P. In vitro immunomodulatory activity of *Lactobacillus fermentum* CECT5716 and *Lactobacillus salivarius* CECT5713: two probiotic strains isolated from human breast milk. *Immunobiology*. 2010; 215: 996–1004. doi: [10.1016/j.imbio.2010.01.004](https://doi.org/10.1016/j.imbio.2010.01.004) PMID: [20219262](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20219262/)
27. Kasimanickam R, Duffield TF, Foster RA, Gartley CJ, Leslie KE, Walton JS, et al. Endometrial cytology and ultrasonography for the detection of subclinical endometritis in postpartum dairy cows. *Theriogenology*. 2004; 62: 9–23. PMID: [15159097](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15159097/)
28. Dubernet S, Desmasures N, Guéguen M. A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level. *FEMS Microbiol Lett*. 2002; 214: 271–275. PMID: [12351242](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12351242/)
29. Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol*. 1991; 173: 697–703. PMID: [1987160](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1987160/)
30. Betts JG, Hansen PJ. Regulation of prostaglandin secretion from epithelial and stromal cells of the bovine endometrium by interleukin-1 beta, interleukin-2, granulocyte-macrophage colony stimulating factor and tumor necrosis factor-alpha. *Life Sci*. 1992; 51: 1171–1176. PMID: [1518379](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1518379/)
31. Miessen K, Einspanier R, Schoen J. Establishment and characterization of a differentiated epithelial cell culture model derived from the porcine cervix uteri. *BMC Vet Res*. 2012; 8: 31. doi: [10.1186/1746-6148-8-31](https://doi.org/10.1186/1746-6148-8-31) PMID: [22429795](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22429795/)
32. Strober W. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr Protoc Immunol*. 2001. Appendix 3: Appendix 3B.
33. Rusu D, Loret S, Peulen O, Mainil J, Dandriofosse G. Immunochemical, biomolecular and biochemical characterization of bovine epithelial intestinal primocultures. *BMC Cell Biol*. 2005; 6: 42. PMID: [16321165](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16321165/)
34. Odau S, Gabler C, Holder C, Einspanier R. Differential expression of cyclooxygenase 1 and cyclooxygenase 2 in the bovine oviduct. *J Endocrinol*. 2006; 191: 263–274. PMID: [17065409](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17065409/)
35. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellems J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*. 2009; 55: 611–622. doi: [10.1373/clinchem.2008.112797](https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797) PMID: [19246619](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19246619/)
36. Rinaldi M, Ceciliani F, Lecchi C, Moroni P, Bannerman DD. Differential effects of alpha1-acid glycoprotein on bovine neutrophil respiratory burst activity and IL-8 production. *Vet Immunol Immunopathol*. 2008; 126: 199–210. doi: [10.1016/j.vetimm.2008.07.001](https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.07.001) PMID: [18692908](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18692908/)
37. Vandesompele J, de Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*. 2002; 3: 0034.1–0034.11.
38. Kandler O, Weiss N. Regular, non-spore forming gram-positive rods. In: Sneath PHA, Bergey DH, Holt JG, editors. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore: William and Wilkins; 1986. pp. 1208–1233.
39. Hussain AM, Daniel RC, O'Boyle D. Postpartum uterine flora following normal and abnormal puerperium in cows. *Theriogenology*. 1990; 34: 291–302. PMID: [16726838](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16726838/)
40. Petit T, Spersger J, Rosengarten R, Aurich J. Prevalence of potentially pathogenic bacteria as genital pathogens in dairy cattle. *Reprod Domest Anim*. 2009; 44: 88–91. doi: [10.1111/j.1439-0531.2007.01002.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2007.01002.x) PMID: [18537907](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18537907/)
41. Bonnett BN, Martin SW, Gannon VP, Miller RB, Etherington WG. Endometrial biopsy in Holstein-Friesian dairy cows. III. Bacteriological analysis and correlations with histological findings. *Can J Vet Res*. 1991; 55: 168–173. PMID: [1884297](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1884297/)

42. Noakes DE, Wallace L, Smith GR. Bacterial flora of the uterus of cows after calving on two hygienically contrasting farms. *Vet Rec.* 1991; 128: 440–442. PMID: [1858270](#)
43. Otero C, Silva de Ruiz C, Ibañez R, Wilde OR, de Ruiz Holgado AAP, Nader-Macias ME. Lactobacilli and enterococci isolated from the bovine vagina during the estrous cycle. *Anaerobe.* 1999; 5: 305–307.
44. Machado VS, Oikonomou G, Bicalho MLS, Knauer WA, Gilbert R, Bicalho RC. Investigation of postpartum dairy cows' uterine microbial diversity using metagenomic pyrosequencing of the 16S rRNA gene. *Vet Microbiol.* 2012; 159: 460–469. doi: [10.1016/j.vetmic.2012.04.033](#) PMID: [22595139](#)
45. Embley TM, Faquir N, Bossart W, Collins MD. *Lactobacillus vaginalis* sp. nov. from the human vagina. *Int J Syst Bacteriol.* 1989; 39: 368–370.
46. Erickson KL, Hubbard NE. Probiotic immunomodulation in health and disease. *J Nutr.* 2000; 130: 403S–409S. PMID: [10721915](#)
47. Froila ID, Pellegrino MS, Magnano G, Giraudo JA, Espeche MC, Nader-Macias ME, et al. Histological examination of non-lactating bovine udders inoculated with *Lactobacillus perolens* CRL 1724. *J Dairy Res.* 2013; 80: 28–35. doi: [10.1017/S0022029912000581](#) PMID: [23199568](#)
48. Beecher C, Daly M, Berry DP, Klostermann K, Flynn J, Meaney W, et al. Administration of a live culture of *Lactococcus lactis* DPC 3147 into the bovine mammary gland stimulates the local host immune response, particularly IL-1 β and IL-8 gene expression. *J Dairy Res.* 2009; 76: 340–348. doi: [10.1017/S0022029909004154](#) PMID: [19445831](#)
49. Dinarello CA. The IL-1 family and inflammatory diseases. *Clin Exp Rheumatol.* 2002; 20: S1–13. PMID: [14989423](#)
50. Kishimoto T, Akira S, Narazaki M, Taga T. Interleukin-6 family of cytokines and gp130. *Blood.* 1995; 86: 1243–1254. PMID: [7632928](#)
51. Sheldon IM, Dobson H. Postpartum uterine health in cattle. *Anim Reprod Sci.* 2004; 82–83: 295–306.
52. Rose WA II, McGowin CL, Spagnuolo RA, Eaves-Pyles TD, Popov VL, Pyles RB. Commensal bacteria modulate innate immune responses of vaginal epithelial cell multilayer cultures. *PLoS ONE.* 2012; 7: e32728. doi: [10.1371/journal.pone.0032728](#) PMID: [22412914](#)
53. Chapwanya A, Meade KG, Doherty ML, Callanan JJ, O'Farrelly C. Endometrial epithelial cells are potent producers of tracheal antimicrobial peptide and serum amyloid A3 gene expression in response to *E. coli* stimulation. *Vet Immunol Immunopathol.* 2013; 151: 157–162. doi: [10.1016/j.vetimm.2012.09.042](#) PMID: [23200820](#)
54. Cronin JG, Turner ML, Goetze L, Bryant CE, Sheldon IM. Toll-like receptor 4 and MYD88-dependent signaling mechanisms of the innate immune system are essential for the response to lipopolysaccharide by epithelial and stromal cells of the bovine endometrium. *Biol Reprod.* 2012; 86: 51. doi: [10.1095/biolreprod.111.092718](#) PMID: [22053092](#)
55. Borges AM, Healey GD, Sheldon IM. Explants of intact endometrium to model bovine innate immunity and inflammation ex vivo. *Am J Reprod Immunol.* 2012; 67: 526–539. doi: [10.1111/j.1600-0897.2012.01106.x](#) PMID: [22324889](#)
56. Gärtner MA, Peter S, Jung M, Drillich M, Einspanier R, Gabler C. Increased mRNA expression of selected pro-inflammatory factors in inflamed bovine endometrium *in vivo* as well as in endometrial epithelial cells exposed to *Bacillus pumilus* *in vitro*. *Reprod Fertil Dev.* 2015 Jan 7. doi: [10.1071/RD14219](#).
57. Dubois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, Van De Putte LB, et al. Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J.* 1998; 12: 1063–1073. PMID: [9737710](#)
58. Asselin E, Lacroix D, Fortier MA. IFN-tau increases PGE2 production and COX-2 gene expression in the bovine endometrium *in vitro*. *Mol Cell Endocrinol.* 1997; 132: 117–126. PMID: [9324053](#)
59. Arosh JA, Parent J, Chapdelaine P, Sirois J, Fortier MA. Expression of cyclooxygenases 1 and 2 and prostaglandin E synthase in bovine endometrial tissue during the estrous cycle. *Biol Reprod.* 2002; 67: 161–169. PMID: [12080013](#)
60. Herath S, Lilly ST, Fischer DP, Williams EJ, Dobson H, Bryant CE, et al. Bacterial lipopolysaccharide induces an endocrine switch from prostaglandin F2 α to prostaglandin E2 in bovine endometrium. *Endocrinology.* 2009; 150: 1912–1920. doi: [10.1210/en.2008-1379](#) PMID: [19056817](#)
61. Miller ANA, Williams EJ, Sibley K, Herath S, Lane EA, Fishwick J, et al. The effects of *Arcanobacterium pyogenes* on endometrial function *in vitro*, and on uterine and ovarian function *in vivo*. *Theriogenology.* 2007; 68: 972–980. PMID: [17825901](#)
62. Asselin E, Goff AK, Bergeron H, Fortier MA. Influence of sex steroids on the production of prostaglandins F2 α and E2 and response to oxytocin in cultured epithelial and stromal cells of the bovine endometrium. *Biol Reprod.* 1996; 54: 371–379. PMID: [8788188](#)
63. Juarez Tomas MS, Zonenschain D, Morelli L, Nader-Macias ME. Characterisation of potentially probiotic vaginal lactobacilli isolated from Argentinean women. *Br J Biomed Sci.* 2005; 62: 170–174. PMID: [16411376](#)

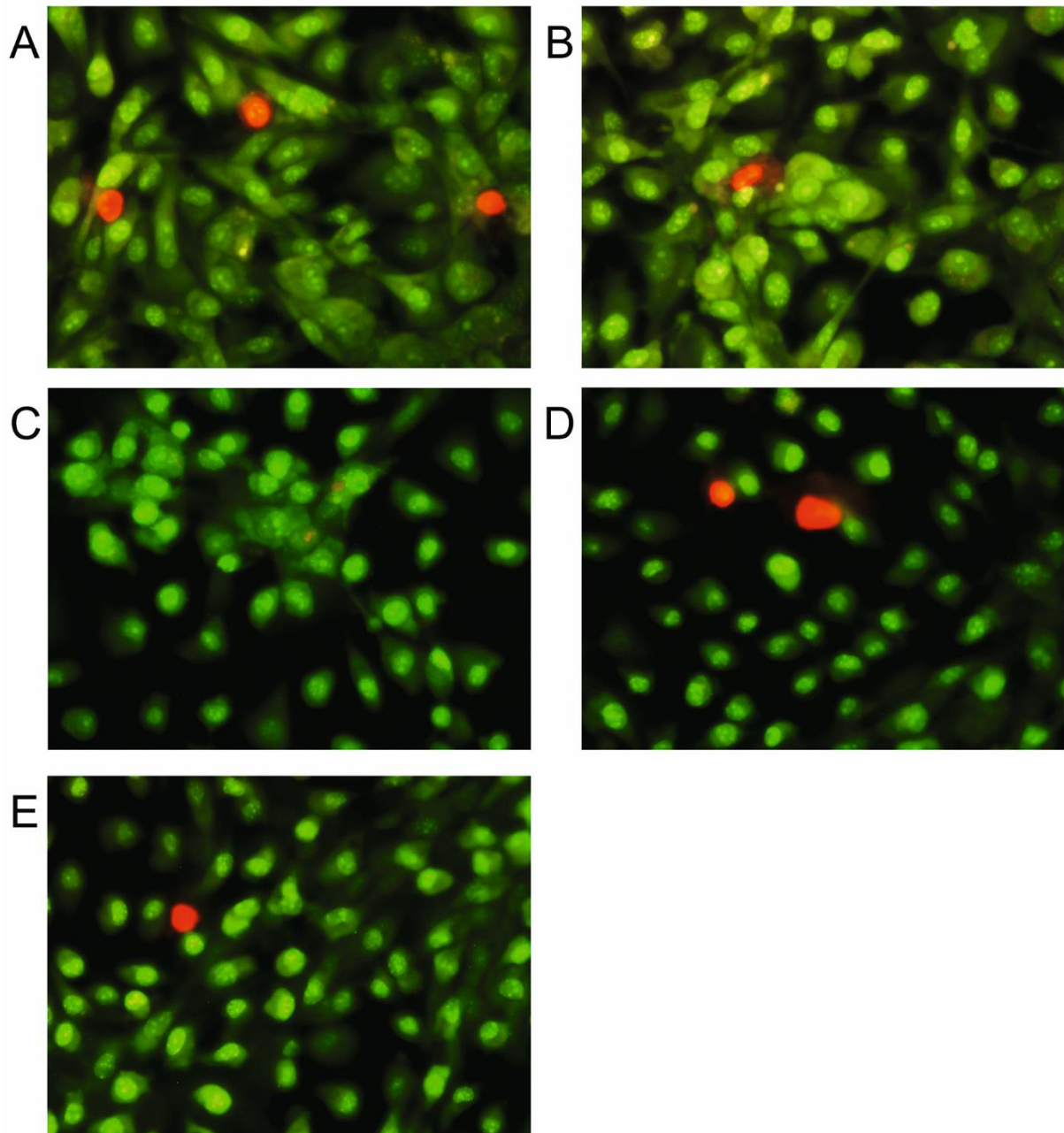
64. Kummer V, Lany P, Maskova J, Zraly Z, Canderle J. Stimulation of cell defense mechanism of bovine endometrium by temporal colonization with selected strains of lactobacilli. *Vet Med (Praha)*. 1997; 42: 217–224. PMID: [9313366](#)
65. Ametaj BN, Iqbal S, Selami F, Odhiambo JF, Wang Y, Gänzle MG, et al. Intravaginal administration of lactic acid bacteria modulated the incidence of purulent vaginal discharges, plasma haptoglobin concentrations, and milk production in dairy cows. *Res Vet Sci*. 2014; 96: 365–370. doi: [10.1016/j.rvsc.2014.02.007](#) PMID: [24612560](#)
66. Taweechotipatr M, Iyer C, Spinler JK, Versalovic J, Tumwasom S. *Lactobacillus saerimneri* and *Lactobacillus ruminis*: novel human-derived probiotic strains with immunomodulatory activities. *FEMS Microbiol Lett*. 2009; 293: 65–72. doi: [10.1111/j.1574-6968.2009.01506.x](#) PMID: [19222575](#)
67. Neville BA, Forde BM, Claesson MJ, Darby T, Coghlan A, Nally K, et al. Characterization of pro-inflammatory flagellin proteins produced by *Lactobacillus ruminis* and related motile Lactobacilli. *PLoS ONE*. 2012; 7: e40592. doi: [10.1371/journal.pone.0040592](#) PMID: [22808200](#)
68. Konnai S, Usui T, Ohashi K, Onuma M. The rapid quantitative analysis of bovine cytokine genes by real-time RT-PCR. *Vet Microbiol*. 2003; 94: 283–294. PMID: [12829382](#)



S1 Fig. Viability evaluation of co-cultured bovine endometrial epithelial cells by means of trypan blue staining.

Bovine endometrial epithelial cells were stained with trypan blue after 96 h of co-culture (A) with *L. buchneri* in MOI 10; (B) with *L. ruminis* in MOI 10; (C) with *L. amylovorus* in MOI 10; (D) with *L. vaginalis* in MOI 10; (E) control. Dead cells were stained in blue. 100x magnification.

doi:10.1371/journal.pone.0119793.s001



S2 Fig. Viability evaluation of co-cultured bovine endometrial epithelial cells by means of ethidium bromide/acridine orange staining.

Bovine endometrial epithelial cells were stained with ethidium bromide/acridine orange after 72 h of co-culture (A) with *L. buchneri* in MOI 10; (B) with *L. ruminis* in MOI 10; (C) with *L. amylovorus* in MOI 10; (D) with *L. vaginalis* in MOI 10; (E) control. The nuclei of dead cells were stained in red and living cells in green. 200x magnification.

doi:10.1371/journal.pone.0119793.s002

4 Diskussion

Bei der überwiegenden Mehrheit der Milchkühe lässt sich eine bakterielle Kontamination des Uterus in den ersten beiden Wochen postpartum feststellen. Viele Kühe sind in der Lage die eingewanderten Bakterien innerhalb der ersten 5 Wochen postpartum wieder zu beseitigen, doch in 10 - 17 % der Tiere persistiert die bakterielle Infektion und löst uterine Krankheiten wie Metritis, chronische sowie subklinische Endometritis aus, die sich negativ auf die Fruchtbarkeit der Kühe auswirken (Sheldon *et al.* 2002; Sheldon *et al.* 2006). Bisher lag das Augenmerk vieler Studien auf den Nachweis von Pathogenen aus dem bovinen Uterus wie *T. pyogenes*, *E. coli*, *Fusobacterium necrophorum*, *Prevotella* spp. sowie von potentiell Pathogenen wie *Staphylococcus* spp. und *Streptococcus* spp. (Sheldon *et al.* 2002; Williams *et al.* 2005; Santos *et al.* 2010; Werner *et al.* 2012). Doch es lassen sich auch eine Vielzahl anderer Bakterienspezies wie Kommensale sowie weitere potentiell pathogene Bakterien aus dem bovinen Uterus isolieren, deren Einfluss auf endometriale Epithelzellen des Rindes noch nicht eingehend untersucht wurde. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit behandelt.

4.1 Die Mikrobiota im bovinen Genitaltrakt

4.1.1 Potentiell pathogene Bakterien

Neben Bakterienspezies, die nicht mit dem Auftreten von Endometritis beim Rind assoziiert sind, lassen sich aus dem bovinen Uterus Bakterien isolieren, die über potentiell pathogene Eigenschaften für das bovine Endometrium verfügen. In dieser Arbeit wurden verschiedene bakterielle Isolate mit bovinen endometrialen Epithelzellen kokultiviert, um eine bakterielle Infektion zu simulieren und zelluläre Mechanismen der Immunantwort dieser Zellen zu untersuchen. Die untersuchten *Lactobacillus* spp. beeinflussten die Vitalität der kokultivierten Epithelzellen nicht (Gärtner *et al.* 2015). *Staphylococcus succinus* und *B. pumilus* hingegen zeigten zytotoxische Eigenschaften auf die Vitalität der kokultivierten Zellen. *B. pumilus* wurde für weitere Versuche als potentiell pathogenes Bakterium ausgewählt (Gärtner *et al.* 2016). Im Gegensatz zu Endometritis-assoziierten Pathogenen wie *T. pyogenes*, die in Kokultur den Zelltod von endometrialen Epithelzellen schon innerhalb von 16 Stunden auslösen konnten (Ibrahim *et al.* 2017), verursachte *B. pumilus* in dieser Arbeit erst nach 24 Stunden den Zelltod der kokultivierten Zellen und stellte sich daher als geeignet heraus, um die erste Antwort von bovinen endometrialen Epithelzellen auf eine bakterielle Infektion zu zeigen (Gärtner *et al.* 2016).

Bacillus spp. lassen sich häufig aus dem bovinen Uterus postpartum isolieren (Hussain *et al.* 1990; Bonnett *et al.* 1991; Dolezel *et al.* 2010; Prunner *et al.* 2014). Wagener *et al.* (2015) konnten mehr als 50 % der Bacilluspeziesisolate aus dem bovinen Uterus der Spezies *B. pumilus* und 23 % *B. licheniformis* zuordnen. *B. licheniformis* wird zu den Bakterienspezies gerechnet, die als potentiell pathogen für das bovine Endometrium eingeschätzt werden (Sheldon *et al.* 2002; Williams *et al.* 2005). Dabei gehört *B. licheniformis* zu den Bakterien, die häufig aus dem uterinen Lumen und bei Fällen von Endometritis isoliert werden, aber im Allgemeinen nicht mit uterinen Läsionen assoziiert sind (Williams *et al.* 2007).

Die Rolle von *B. pumilus* in der Mikrobiota des Uterus des Rindes ist dagegen bisher noch unzureichend erforscht. Verschiedene Studien geben aber Hinweis darauf, dass *B. pumilus* beim Rind über pathogenes Potential verfügen könnte. Nieminen *et al.* (2007) konnten aus der Milch von Kühen, die an Mastitis litten, zytotoxische Substanzen, die von *B. pumilus* produziert wurden, isolieren. Zudem wurde in Geweben einer Kuh, die an Septikämie gestorben war, *B. pumilus* nachgewiesen werden (Hare *et al.* 2008). In einer weiteren Studie untersuchten Ibrahim *et al.* (2016) den Einfluss von *B. pumilus* auf bovine endometriale Epithelzellen in Bezug auf die mRNA-Expression verschiedener Klassen von antimikrobiellen Peptiden (AMP). Diese entfalten ihre Wirkung im Falle der beta-Defensin (DEFB)-Familie durch die Permeabilisierung von bakteriellen Membranen und der S100-Calcium-bindende Protein (S100A)-Familie durch Chelatisierung von Ionen. Für den Versuch wurden die Epithelzellen mit *B. pumilus* bis zu sechs Stunden in einer Multiplizität der Infektion (Multiplicity of infection = MOI) von 1, 5 und 10 kokultiviert. *B. pumilus* zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die mRNA-Expression der DEFB-Familie. Ein Grund hierfür könnte nach Meinung der Autoren sein, dass *B. pumilus* über Verteidigungsmechanismen verfügt, um die Defensine auf Transkriptionsebene zu inhibieren, wie es schon für verschiedene Bakterienspezies beschrieben wurde (Menendez und Brett Finlay 2007; Mogensen 2009). Die mRNA-Expression von S100A8 und S100A9 dagegen war nach 4 bzw. 6 Stunden Koinkubation mit *B. pumilus* signifikant erhöht verglichen mit Kontrollzellen. Diese Ergebnisse unterstützen die These, dass es sich bei *B. pumilus* um ein für den bovinen Uterus potentiell pathogenes Bakterium handelt, das die angeborene Immunantwort der endometrialen Epithelzellen als erste Immunantwort des Uterus auslöst.

4.1.2 Kommensale Bakterien

Das Vorhandensein und die nähere Charakterisierung verschiedener kultivierbarer Milchsäurebakterien in der Mikrobiota des Uterus des Rindes konnte in dieser Arbeit

demonstriert werden. Dazu gehören Laktobazillen wie *L. buchneri*, *L. ruminis*, *L. amylovorus*, *L. plantarum* und *L. similis*. Des Weiteren wurden *Weissella paramesenteroides* (*W. paramesenteroides*), *P. pentosaceus* und *Aerococcus* spp. aus bovinen endometrialen Proben kultiviert (**Gärtner et al. 2015**). *L. buchneri* wurde bisher in der bovinen Vagina nachgewiesen (Otero et al. 1999). Ebenso sind Laktobazillen in der Vagina von heranwachsenden Färsen vorhanden, gehören aber nicht zur dominierenden Bakteriengattung der bovinen vaginalen Mikrobiota (Otero et al. 2000). Aus dem bovinen Uterus wurden bislang nur in wenigen Studien *Lactobacillus* spp. kultiviert (Messier et al. 1984; Williams et al. 1988), aber nicht weiter charakterisiert. Machado et al. (2012) konnten in 41 % der Proben, die durch uterine Lavage von gesunden Milchkühen genommen wurden, mittels metagenomischer Pyrosequenzierung des 16S rRNA Gens *Lactobacillus* spp. nachweisen. Bei Kühen mit hochgradiger Endometritis fanden sie *Lactobacillus* spp. dagegen nur bei 20 % der untersuchten Tiere. Einen deutlich signifikanten Unterschied stellten sie im Nachweis von *Lactobacillus* spp. bei trächtigen Kühen zum Zeitpunkt von 200 Tagen in der Laktation fest. Sie wiesen zu 49 % *Lactobacillus* spp. im Gegensatz zu 18 % bei nicht trächtigen Kühen auf. Dies deutet darauf hin, dass das Auftreten von *Lactobacillus* spp. im Uterus von Milchkühen mit einem guten uterinen Gesundheitszustand korreliert. Bei Büffelkühen konnte in einer Studie ein positiver Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von Laktobazillen und einem gesunden Uterus postpartum gezeigt werden (Azawi et al. 2008). *L. fermentus* und *L. acidophilus* wurden nur bei Büffelkühen 24 und 48 h postpartum isoliert, die einen komplikationslosen Geburtsverlauf und den natürlichen Abgang der Plazenta innerhalb von 24 h aufwiesen. Bei Büffelkühen mit Nachgeburtsverhaltung oder Dystokie konnten keine Laktobazillen aus dem Uterus kultiviert werden.

Die Vitalität und das Überleben von bovinen endometrialen Epithelzellen wurden durch die Kokultivierung mit *L. buchneri*, *L. ruminis*, *L. amylovorus* und *L. vaginalis* nicht negativ beeinflusst (**Gärtner et al. 2015**). Diese Ergebnisse lassen sich mit den Resultaten der Kokultivierung von *L. rhamnosus* und *L. reuteri* mit humanen vaginalen Epithelzellen vergleichen (Wagner und Johnson 2012). Die Laktobazillen führten nicht zu einer Einschränkung der Vitalität der kokultivierten Epithelzellen. Dies deutet darauf hin, dass auch im bovinen Uterus Laktobazillen zu den Kommensalen gerechnet werden können, die nicht mit endometrialen Läsionen assoziiert sind.

4.1.3 Laktobazillen und ihr Einsatz in der Reproduktion

Einige der in der uterinen Mikrobiota vorkommenden Bakterienspezies scheinen keinen oder nur einen äußerst geringen Einfluss auf die Expression der untersuchten pro-

inflammatorischen Faktoren in bovinen endometrialen Epithelzellen zu haben. Die Eigenschaft von *L. buchneri*, keine Immunantwort in bovinen endometrialen Epithelzellen auszulösen, wie in dieser Arbeit dargelegt (**Gärtner et al. 2015**), könnte in der Zukunft dafür eingesetzt werden, zu einer gegen eingewanderte Bakterien notwendigen, kontrollierten angeborenen Immunantwort des Endometriums postpartum beizutragen, um der Entwicklung einer chronischen oder subklinischen Endometritis entgegenzuwirken. In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass gesunde Kühe im Vergleich zu Kühen mit subklinischer oder chronischer Endometritis im frühen Puerperium (Tag 24 – 30 postpartum) über eine vorhandene, aber nicht ausufernde Expression von pro-inflammatorischen Faktoren wie AMP, Interleukinen und Chemokinen im Endometrium verfügten, die auch im späten Puerperium (Tag 45 – 51 postpartum) im Gegensatz zum entzündeten Endometrium moderat blieb (Chapwanya et al. 2009; Peter et al. 2015; Ibrahim et al. 2016). Eine angemessene, kontrollierte angeborene Immunantwort des Endometriums ist dementsprechend notwendig, um eingedrungene Bakterien wieder zu eliminieren. Ist dies nicht der Fall, kann es zur Entstehung einer Uteruserkrankung postpartum beitragen (Sheldon et al. 2009a).

Die positiven Eigenschaften von *Lactobacillus* spp. im weiblichen Genitaltrakt sind schon lange Gegenstand der Forschung. Laktobazillen tragen als natürliche Mikrobiota der Vagina der Frau über verschiedene Mechanismen zu einem gesunden vaginalen Milieu bei. Dazu gehören unter anderem die Ansäuerung durch Milchsäure- und Essigsäurebildung sowie die Verdrängung pathogener Keime durch zahlenmäßige Überlegenheit (Skarin und Sylwan 1986), die Produktion von H₂O₂ (Hawes et al. 1996; Atassi et al. 2006) und die Bildung von antimikrobiellen Proteinen (Aroutcheva et al. 2001; Dover et al. 2008).

Ebenso könnten diese Eigenschaften von Laktobazillen beim Rind zur Aufrechterhaltung eines gesunden Genitaltraktes bzw. einer verbesserten Reproduktionsleistung beitragen. Verschiedene Studien verfolgten bei der Milchkuh den Ansatz, Milchsäurebakterien vaginal zu verabreichen. Otero et al. (2006) untersuchten die Eigenschaften verschiedener boviner vaginaler Milchsäurebakterien für den potentiellen Einsatz als intravaginale Applikation zur Prävention von Metritis beim Rind. Viele Stämme waren in der Lage, *E. coli* 99/14 durch Säureproduktion im Wachstum zu hemmen, einzelne Stämme konnten *T. pyogenes* 96/393 inhibieren. Beide Pathogene waren von Kühen mit Metritis isoliert worden. Die meisten Stämme mit inhibierenden Eigenschaften konnten *L. fermentum*, einige *L. gasseri* und ein Stamm *L. rhamnosus* zugeordnet werden. In einer anderen Studie wurde gezeigt, dass *L. gasseri* CRL1421, isoliert aus der Vagina gesunder Färsen, fähig ist, durch Wasserstoffperoxid- und Milchsäureproduktion das Wachstum von *Staphylococcus aureus*, eines potentiellen Pathogens des bovinen Genitaltraktes, zu hemmen (Otero und Nader-

Macias 2006). Ametaj *et al.* (2014) verabreichten Milchkühen wöchentlich intravaginal lyophilisierte Milchsäurebakterien (*L. sakei* FUA3089, *P. acidilactici* FUA3140 und *P. acidilactici* FUA3138) in einem Zeitraum von zwei Wochen vor dem erwarteten Abkalbedatum bis vier Wochen postpartum. Die Verabreichung von Milchsäurebakterien führte bei den Milchkühen drei Wochen postpartum zu einer geringeren Inzidenz von purulentem vaginalen Ausfluss im Vergleich zu Kontrolltieren, denen zu denselben Zeitpunkten eine Trägerflüssigkeit intravaginal appliziert worden war. Die Gesamtträchtigkeitsrate konnte jedoch nicht positiv beeinflusst werden, was an der geringen Tierzahl liegen könnte. Eine andere Studie derselben Arbeitsgruppe gibt Hinweis auf einen möglichen positiven Einfluss auf die Fruchtbarkeit von Milchkühen durch die intravaginale Applikation von Milchsäurebakterien (Deng *et al.* 2015). Die Güstzeit von Milchkühen, denen eine und zwei Wochen präpartum *L. sakei* FUA3089, *P. acidilactici* FUA3140 und *P. acidilactici* FUA3138 intravaginal verabreicht wurde, war signifikant reduziert im Vergleich zur Kontrolle. Die mit Milchsäurebakterien behandelten Kühe wiesen eine geringere Inzidenz von Metritis auf. In einer weiteren Studie zeigten Deng *et al.* (2014), dass eine zwei- oder dreimalige intravaginale Gabe dieser Milchsäurebakterien das Auftreten von uterinen Infektionen im Vergleich zur Kontrolle reduzierte und die lokale und systemische Immunantwort verbesserte.

Weitere Studien verfolgten einen anderen Ansatz, die Applikation von *Lactobacillus* spp. in den Uterus von Kühen. Kummer *et al.* (1997) setzten erstmals Laktobazillen zur Verabreichung in den Uterus des Rindes ein. 60 – 95 Tage postpartum wurden klinisch unauffälligen Erstkalbinnen *Lactobacillus* spp. G 013 oder *L. casei* CCM 1753 in den Uterus appliziert. Eine Kolonisierung des Uterus mit diesen Stämmen konnte bis 12 Tage nach der Applikation nachgewiesen werden. Bereits nach 5 Tagen wies das Endometrium eine zelluläre Infiltration vor allem mit mononukleären Zellen, aber auch Mastzellen und Makrophagen auf. Dies hielt 12 Tage nach der Applikation der Laktobazillen noch an. Eine Untersuchung der Expression von pro-inflammatorischen Faktoren im Endometrium nach der Verabreichung der Laktobazillen fand nicht statt. Die Ergebnisse dieser Studie legen den Schluss nahe, dass intrauterin applizierte *Lactobacillus* spp. dazu in der Lage sind, die zellulären Abwehrmechanismen des bovinen Endometriums zu stimulieren.

In einer aktuellen Studie wurde gezeigt, dass die Applikation von *L. buchneri* DSM 32407 in den Uterus von Milchkühen mit subklinischer Endometritis im Vergleich zu einer Placebobehandlung am Tag 24 – 30 postpartum zu einer signifikanten Reduktion der endometrialen mRNA-Expression von CXCL1/2, CXCL3, CXCR2, IL1B und IL8 drei Wochen nach der Verabreichung führte (Peter *et al.* 2018). Eine Woche nach der Applikation von *L. buchneri* konnte eine leichte bis moderate Infiltration mit Immunzellen in

Endometriumsbiopsieproben festgestellt werden, was den Langzeiteffekt von *L. buchneri in vivo* im Gegensatz zu dem kurzzeitigen Effekt, der in dieser Arbeit untersucht wurde, zeigt. Zudem führte die Applikation bei gesunden Kühen und Kühen mit subklinischer Endometritis zu einer erhöhten Trächtigkeitsrate nach Erstbesamung. Des Weiteren war der Median der Günstzeit der Kühe, die an Tag 200 postpartum trächtig waren, kürzer als bei Kühen mit demselben Gesundheitszustand, die eine Placebobehandlung erhalten hatten. Dies deutet darauf hin, dass das uterine Umfeld mit der intrauterinen Verabreichung von Laktobazillen so zu verändern ist, dass die Reproduktionsleistung verbessert werden kann. Es ist aber auch festzuhalten, dass die Applikation von *L. buchneri* DSM 32407 bei Kühen mit subklinischer Endometritis nicht zu einer Verbesserung des Gesundheitszustands im Vergleich zur Placebogruppe in den folgenden drei Untersuchungswochen führte. Bei *L. buchneri* DSM 32407 handelt es sich um denselben Stamm, der in der vorliegenden Arbeit isoliert, charakterisiert und für die Versuche eingesetzt wurde (**Gärtner et al. 2015**).

4.1.4 Pathogene, potentiell pathogene und kommensale uterine Bakterien im Vergleich

Nach dem Abkalben sind fast alle Kühe von einer Bakterieneinwanderung in den Uterus betroffen (Sheldon *et al.* 2008). Doch nicht in jedem Fall kommt es dabei zu einer uterinen Erkrankung. Abhängig vom Gleichgewicht zwischen den Kontaminationsfaktoren der Bakterien wie Spezies, Virulenz und Menge und den Abwehrmechanismen des Tieres unterscheidet sich die Bakterienbesiedlung des Uterus postpartum quantitativ und qualitativ (Sheldon und Dobson 2004). Die Virulenz von Bakterien lässt sich anhand der folgenden vier Gruppen von Virulenzfaktoren bestimmen: Adhäsionsfaktoren, Anti-Phagozytose-Faktoren, Invasionsfaktoren und Toxine (Mayr 2006).

T. pyogenes als anerkannter Pathogen des Uterus verfügt über eine Reihe an möglichen Virulenzfaktoren wie Adhäsionsmechanismen, die Expression von Fimbrien und die Bildung von Biofilmen (Jost und Billington 2005). Doch hauptverantwortlich für die Pathogenität von *T. pyogenes* ist die Expression von Pyolysin, einem Cholesterol-abhängigen Zytolysin, das zur Lyse von Epithel-, Stroma- und Immunzellen in der Lage ist (Jost und Billington 2005; Amos *et al.* 2014). Ibrahim *et al.* (2017) untersuchten zwei verschiedene *T. pyogenes*-Stämme, die aus einer gesunden Kuh und einer Kuh, die im späteren Verlauf an chronischer Endometritis erkrankte, isoliert wurden. Der Stamm aus der später erkrankten Kuh wies im Vergleich zum *T. pyogenes*-Stamm aus der gesunden Kuh eine höhere Wachstumsrate auf, exprimierte mehr Virulenzfaktoren und resultierte in einer höheren mRNA-Expression von PTGS2, CXCL3 und IL8 in kokultivierten Epithelzellen. Dies zeigt, dass unterschiedliche

Stämme einer pathogenen Bakterienspezies über eine verschieden starke Virulenz verfügen können (Ibrahim *et al.* 2017).

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass *B. pumilus* den Zelltod von bovinen Endometriumsepithelzellen *in vitro* hervorrufen und eine erhöhte mRNA-Expression von pro-inflammatorischen Faktoren in den kokultivierten Epithelzellen auslösen konnte (**Gärtner *et al.* 2016**). Dies deutet daraufhin, dass *B. pumilus* über pathogene Eigenschaften verfügt. Dafür spricht auch der Nachweis von Toxin-produzierenden *B. pumilus* in Milchproben von Kühen mit Mastitis (Nieminen *et al.* 2007). Der Fall einer Lebensmittelvergiftung durch das Toxin Pumilacidin, das von *B. pumilus* gebildet wurde (From *et al.* 2007), unterstreicht die mögliche Pathogenität von *B. pumilus* und bestätigt die Hypothese, dass *B. pumilus* den potentiell pathogenen Bakterien zuzurechnen ist.

Im Gegensatz zu *B. pumilus* hatten *L. buchneri*, *L. ruminis*, *L. amylovorus* und *L. vaginalis* keinen negativen Effekt auf die Vitalität der kokultivierten bovinen endometrialen Epithelzellen (**Gärtner *et al.* 2015**). *L. ruminis* und vor allem *L. amylovorus* zeigten immunmodulatorische Eigenschaften auf die kokultivierten endometrialen Epithelzellen. Im Vergleich zu *L. amylovorus* erhöhte *B. pumilus* die mRNA-Expression von IL1A, IL6 und IL8 in bovinen endometrialen Epithelzellen zwei- bis dreifach (**Gärtner *et al.* 2015; Gärtner *et al.* 2016**). Pathogene wie *E. coli* oder aus *E. coli* aufgereinigtes LPS führten zu einer deutlich größeren Erhöhung der mRNA-Expression dieser Entzündungsmediatoren (17- bis 121-fach bzw. zehn- bis 110-fach) in Endometriumszellen verglichen mit Kontrollzellen (Cronin *et al.* 2012, Chapwanya *et al.* 2013). Dies gibt einen Hinweis darauf, dass *Lactobacillus* spp. über immunmodulatorische Eigenschaften verfügen können, aber im Vergleich zu potentiell Pathogenen und vor allem zu Pathogenen in geringerem Maß oder nicht mit Virulenzfaktoren ausgestattet sein könnten. Dies könnte eine Erklärung dafür sein, dass Laktobazillen nur selten im Zusammenhang mit Krankheitsgeschehen stehen wie von Cannon *et al.* (2005) gezeigt.

4.2 Entzündungsmediatoren im bovinen Uterus

4.2.1 Toll-like-Rezeptoren

Das endometriale Epithel fungiert bei der Invasion von Bakterien in den bovinen Uterus postpartum durch die geöffnete Zervix als natürliche Barriere und kann durch eine erste Immunantwort auf die Eindringlinge reagieren. Durch Toll-like Rezeptoren sind bovine endometriale Epithelzellen in der Lage, pathogen-assoziierte molekulare Strukturen der eindringenden Bakterien zu erkennen und eine Immunantwort auszulösen (Davies *et al.* 2008). Turner *et al.* (2014) fanden heraus, dass außer TLR2 und TLR6 beim Rind im

Gegensatz zur Maus und zum Menschen auch TLR1 in die Erkennung von gram-positiven Bakterien über diacylierte Lipopeptide beteiligt ist. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen dieser Arbeit. Die mRNA-Expression von TLR2, -4 und -6 konnte in endometrialen Proben von gesunden Kühen und Kühen mit subklinischer und chronischer Endometritis nachgewiesen werden (**Gärtner et al. 2016**). In bovinen endometrialen Epithelzellen wurden sowohl nach Kokultivierung mit *Lactobacillus* spp. als auch mit *B. pumilus* TLR2 und TLR6 exprimiert, jedoch bis auf TLR2 bei der Kokultivierung mit *B. pumilus* ohne signifikanten Unterschied zur Kontrolle (**Gärtner et al. 2015; Gärtner et al. 2016**).

4.2.2 Interleukin 1 alpha

Das endometriale Epithel reagiert auf die Erkennung der PAMPs durch TLR mit der Bildung von pro-inflammatorischen Zytokinen wie Interleukinen (Abbildung 1). Dazu gehört IL1A, das die Produktion von PGE₂, des Plättchenaktivierenden Faktors sowie von Stickstoffmonoxid stimuliert und die Einwanderung von Entzündungszellen in den extravaskulären Raum unterstützt (Dinarello 2002). In der vorliegenden Arbeit konnte die Expression von IL1A auf molekularer Ebene *in vitro* nach der Kokultivierung von bovinen, endometrialen Epithelzellen mit Laktobazillen bzw. dem potentiell pathogenen Bakterium *B. pumilus* nachgewiesen werden (**Gärtner et al. 2015; Gärtner et al. 2016**). Unter den Laktobazillen bewirkten *L. amylovorus*, *L. ruminis* und *L. vaginalis* eine erhöhte mRNA-Expression von IL1A, *L. buchneri* dagegen konnte keine signifikante Änderung der IL1A-mRNA-Expression in den kokultivierten Zellen auslösen. Dies verdeutlicht, dass Laktobazillen eine Immunantwort in bovinen endometrialen Epithelzellen hervorrufen können, wenn auch in unterschiedlicher Ausprägung. Frühere Studien haben schon den Schluss nahe gelegt, dass Milchsäurebakterien immunmodulatorische Fähigkeiten aufweisen. Beecher *et al.* (2009) zeigten, dass beim Rind die Verabreichung einer Lebendkultur von *Lactococcus lactis* in das Euter lokal zu einer signifikanten, stark erhöhten mRNA-Expression von IL1B und IL8 führte. Des Weiteren führte die Koinkubation von humanen vaginalen Epithelzellen mit *L. rhamnosus* und *L. reuteri* zu einer gesteigerten mRNA-Expression von IL1A, IL1B und IL8 (Wagner und Johnson 2012).

In größerem Maße als durch die untersuchten Laktobazillen wurde die IL1A-mRNA-Expression boviner endometrialer Epithelzellen durch den potentiell pathogenen *B. pumilus* mit einem Maximum nach zwei Stunden erhöht (**Gärtner et al. 2016**). Danesh Mesgaran *et al.* (2018) stellten den stärksten Anstieg der IL1A-mRNA-Expression nach zwei Stunden Kokultivierung von *B. pumilus* mit primären, bovinen Oviduktepithelzellen fest. Diese frühe

Reaktion der bovinen Epithelzellen des Endometriums bzw. des Ovidukts auf *B. pumilus* kann in dieser Form erwartet werden, da IL1A eine zentrale Funktion im Entzündungsgeschehen innehat (Dinarelli *et al.* 2012).

In einer neueren Studie konnten Ibrahim *et al.* (2017) zeigen, dass die mRNA-Expression von IL1A in bovinen endometrialen Epithelzellen in Kokultur mit einem lebenden *T. pyogenes*-Stamm, der aus dem Uterus einer Kuh, die im späteren Verlauf an chronischer Endometritis litt, isoliert worden war, durch die Anwesenheit von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (peripheral blood mononuclear cells = PBMC) verglichen mit unbehandelten Kontrollzellen verstärkt wurde. Die erhöhte Immunantwort der Epithelzellen könnte durch die Freisetzung von Botenstoffen wie IL1A aus den bakteriell aktivierten PBMC erfolgen. Dies stützt die These, dass das bovine Endometrium je nach Pathogenität der eingewanderten Bakterien zu einer unterschiedlich starken Reaktion in der Lage ist, angefangen von keiner Immunantwort auf Kommensale wie *L. buchneri* bis zu einer gesteigerten Immunantwort auf potentiell Pathogene wie *B. pumilus* und Pathogene wie *T. pyogenes*.

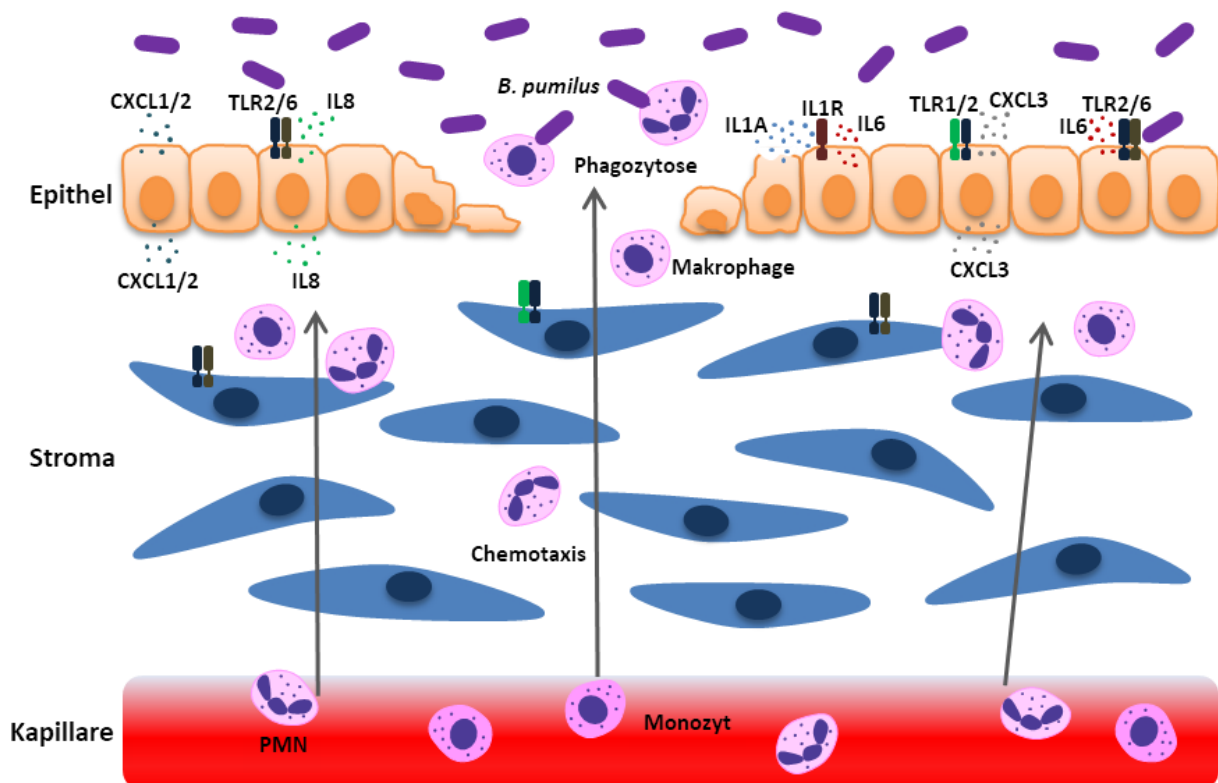


Abbildung 1. Bovine endometriale Zellen reagieren auf die Erkennung von eingewanderten gram-positiven Bakterien durch TLR1/TLR2- bzw. TLR2/TLR6-Komplexe mit der Expression von Entzündungsmarkern. Dazu gehören Interleukine wie IL1A und IL6 und Chemokine wie CXCL1/2, CXCL3 und IL8, die PMN und Makrophagen zum Ort der Entzündung locken, um die eingedrungenen Bakterien zu beseitigen und den Gewebsschaden abzubauen. IL1A wirkt lokal entzündungsfördernd über die Induktion der Synthese von IL1 und IL6 vermittelt durch IL1R.

4.2.3 Interleukin 6

Neben IL1 hat auch IL6 eine wichtige Rolle in der Entzündung (Abbildung 1). IL6 aktiviert die Akute-Phase-Antwort und stimuliert Lymphozyten (Kishimoto *et al.* 1995). Beim Rind hat IL6 Anteil an der Immunabwehr des Endometriums gegen eingewanderte Bakterien (Sheldon und Dobson 2004). Dabei bewirkt IL6 über positives Feedback, das durch den IL6-Rezeptor auf Endometriumszellen vermittelt wird, eine vermehrte Produktion vom IL6 und IL8 in bovinen Endometriumszellen nach der Exposition mit LPS (Cronin *et al.* 2016). In der vorliegenden Arbeit führten *L. ruminis* und in stärkerem Umfang *L. amylovorus* zu einer gesteigerten IL6-mRNA-Expression in kokultivierten bovinen Epithelzellen verglichen mit unbehandelten Kontrollzellen (**Gärtner *et al.* 2015**). *L. buchneri* und *L. vaginalis* zeigten keinen signifikanten Einfluss auf die IL6-mRNA-Expression. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen von Genis *et al.* (2017). Sie konnten darlegen, dass eine Kombination aus *L. rhamnosus*, *P. acidilactici* und *L. reuteri* in Kokultur nur zu einer geringgradigen Erhöhung der IL6-Expression in bovinen Uterusexplantaten führte. In dieser Arbeit war IL6 in bovinen endometrialen Epithelzellen auf einem hohen Niveau während der Kokultur mit *B. pumilus* exprimiert (**Gärtner *et al.* 2016**). Im Vergleich mit den Ergebnissen der Kokultur mit Milchsäurebakterien reagierten die Endometriumszellen auf den potentiell Pathogenen *B. pumilus* in viel stärkerem Ausmaß. Auch Pathogene wie *E. coli* verursachten eine deutliche Steigerung der IL6-Expression in bovinen endometrialen Epithelzellen, die aber nach 24 Stunden wieder nachließ (Chapwanya *et al.* 2013). Dies deutet darauf hin, dass IL6 für die frühe Reaktion des bovinen Endometriums auf eine bakterielle Infektion steht. Dies wird daran deutlich, dass eine erhöhte IL6-Expression in Proben aus entzündetem bovinen Endometrium zwei Wochen postpartum verglichen mit gesunden Kontrollen zu finden war (Chapwanya *et al.* 2009; Gabler *et al.* 2010). Drei Wochen postpartum dagegen konnte in endometrialen Proben weder von gesunden Kühen, noch von Kühen mit subklinischer oder chronischer Endometritis ein signifikanter Unterschied in der IL6-mRNA-Expression festgestellt werden (Fischer *et al.* 2010).

4.2.4 Interleukin 8

L. buchneri und *L. vaginalis* bewirkten keine bzw. nur eine geringe Erhöhung der mRNA-Expression von IL1A, IL6 und IL8 durch die kokultivierten Epithelzellen. Im Gegensatz dazu führte *L. ruminis* und noch deutlicher *L. amylovorus* zu einer signifikanten Induktion dieser pro-inflammatorischen Zytokine, was für IL8 auch auf der Proteinebene nachgewiesen werden konnte (**Gärtner *et al.* 2015**). Dies deutet auf eine mögliche Beeinflussung der

Immunantwort des Endometriums durch *L. ruminis* und *L. amylovorus* als Teil der Mikrobiota des Rindes postpartum hin. Ebenso konnten Genís *et al.* (2016) unterschiedliche Fähigkeiten von Milchsäurebakterien nachweisen, die Expression von pro-inflammatorischen Faktoren in bovinen Endometriumszellen *in vitro* zu beeinflussen. *L. sakei* und *L. rhamnosus* bewirkten konzentrationsabhängig nach Kokultivierung mit bovinen endometrialen Epithelzellen eine Erniedrigung der IL8-mRNA-Expression. Nach Kokultivierung mit *P. acidilactici* in hoher Konzentration konnte eine Erhöhung der IL8-Expression im Vergleich zur Kontrolle nachgewiesen werden. *L. reuteri* zeigte keine Beeinflussung der IL8-Expression. In mit *E. coli* infizierten endometrialen Epithelzellen konnte *P. acidilactici* die Genexpression von IL8 leicht reduzieren, *L. rhamnosus* zeigte die deutlichste Reduktion der IL8-Expression. Die Anzahl an koloniebildenden Einheiten (KBE) von *E. coli* konnte nach sechsstündiger Kokultivierung mit bovinen endometrialen Epithelzellen deutlich durch *L. sakei*, *L. reuteri* und *P. acidilactici* sowie in geringerem Ausmaß durch *L. rhamnosus* gesenkt werden. In einer weiteren Studie derselben Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass eine Kombination aus *L. rhamnosus*, *P. acidilactici* und *L. reuteri* in der Lage war, die Anzahl an KBE nach Kokultivierung mit bovinen endometrialen Epithelzellen um 95,1 % zu reduzieren (Genís *et al.* 2017). Mit dieser Kombination aus Milchsäurebakterien konnte in dieser Studie die Reduktion der Sekretion von IL1B, IL6 und IL8 aus bovinen Endometriumsexplantaten nach akuter Inflammation, die durch eine künstliche *E. coli* Infektion hervorgerufen wurde, gezeigt werden.

In dieser Arbeit konnte *B. pumilus* als Vertreter der potentiell pathogenen Bakterien der bovinen uterinen Mikrobiota in Kokultur mit endometrialen Epithelzellen die pro-inflammatorischen Zytokine IL1A, IL6 und IL8 deutlich stärker induzieren als die untersuchten Laktobazillen (Gärtner *et al.* 2015; Gärtner *et al.* 2016), was auf ein mögliches pathogenes Potential von *B. pumilus* im Genitaltrakt des Rindes hindeutet. Diese Hypothese wird durch eine aktuelle Studie unterstützt, die zeigte, dass mit *B. pumilus* kokultivierte bovine Oviduktepithelzellen IL1A, IL1B, IL6 und IL8 stärker exprimieren als Kontrolloviduktzellen (Danesh Mesgaran *et al.* 2018).

Die Ergebnisse der Kokultivierung boviner Endometriumszellen mit *B. pumilus* in dieser Arbeit lassen sich in den Zusammenhang von Befunden, die durch die Kokultivierung von bovinen endometrialen Epithelzellen mit dem Pathogen *E. coli* oder LPS, das aus *E. coli* gewonnen wurden, einordnen. IL1A bzw. IL1B, IL6 und IL8 wurden in diesen Studien in den kokultivierten Endometriumszellen im Vergleich zu Kontrollzellen vermehrt exprimiert (Cronin *et al.* 2012; Chapwanya *et al.* 2013). Dies konnte zudem in der Kokultivierung von *E. coli* bzw. *T. pyogenes* in bovinen endometrialen Explantaten im Vergleich zur Kontrolle nachgewiesen werden (Borges *et al.* 2012). Endometriale Explantate sind gut geeignet, um

die Interaktionen zwischen Wirt und Pathogen im bovinen Uterus zu untersuchen, wie die Autoren in ihrer Studie belegen konnten. In der vorliegenden Arbeit wurden dagegen reine endometriale Epithelzellkulturen verwendet, um explizit die Reaktion dieser Zellen auf den Kontakt mit Kommensalen und potentiell Pathogenen als erste Barriere gegen eingewanderte Bakterien zu untersuchen.

Die Ergebnisse der *B. pumilus*-Kokultur stehen im Einklang zu Studien, die eine erhöhte Expression von IL1, IL6 und IL8 im Endometrium von Kühen mit uterinen Erkrankungen, die häufig mit *E. coli* oder *T. pyogenes* assoziiert sind, zeigten. Gabler *et al.* (2009) fanden in endometrialen Cytobrushproben aus Kühen mit subklinischer Endometritis und chronischer Endometritis drei Wochen postpartum eine erhöhte IL1A-mRNA-Expression im Vergleich zu gesunden Kühen. Eine erhöhte IL6- und IL8-mRNA-Expression konnte in Proben aus entzündetem Endometrium von Kühen zwei Wochen postpartum gefunden werden (Chapwanya *et al.* 2009; Gabler *et al.* 2010). Dies verdeutlicht, dass nicht nur Pathogene, sondern auch potentiell Pathogene am Entzündungsgeschehen im bovinen Uterus postpartum beteiligt sein können.

4.2.5 CXC-Chemokin-Liganden 1 - 3

Neben IL8 locken auch die Chemokine CXCL1-3 neutrophile Granulozyten zum Ort der Entzündung oder des Gewebeschadens (Addison *et al.* 2000). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass CXCL1-3 in Proben von Kühen mit entzündetem Endometrium höher exprimiert wurde als im Endometrium von gesunden Kühen (**Gärtner *et al.* 2016**). Signifikante Unterschiede in der mRNA-Expression waren bei subklinischer Endometritis für CXCL1/2 und CXCR2 vorhanden im Vergleich zur Kontrolle, bei chronischer Endometritis für CXCL3, was als potentielle Marker für diese Erkrankungen genutzt werden könnte. Ähnliche Ergebnisse fanden Peter *et al.* (2015). Im ersten Untersuchungszeitraum (24 – 30 Tage postpartum) wurde eine signifikante Erhöhung der CXCL1/2-Expression in Endometriumsproben von Kühen mit subklinischer Endometritis im Vergleich zu gesunden Kühen nachgewiesen. Im vierten Untersuchungszeitraum (45 – 51 Tage postpartum) konnte dies nicht nur bei subklinischer Endometritis, sondern auch bei chronischer Endometritis gezeigt werden. Eine erhöhte Induktion der CXCL3-Expression konnte für diese beiden Untersuchungszeiträume bei chronischer Endometritis nachgewiesen werden.

In vitro konnte eine erhöhte mRNA-Expression in bovinen endometrialen Epithelzellen nach Kokultivierung mit *B. pumilus* gezeigt werden (**Gärtner *et al.* 2016**). Dies steht in Einklang mit Ergebnissen von murinen endometrialen Epithelzellen, die nach Stimulation mit LPS, das aus *E. coli* gewonnen wurde, eine Erhöhung der CXCL1-Expression im Vergleich zur

Kontrolle zeigten (Sheldon und Roberts 2010). Außerdem konnte in endometrialen Epithelzellen von Frauen, die an chronischer Endometritis litten, *in vivo* sowie *in vitro* eine erhöhte CXCL1-Expression verglichen mit gesunden Frauen festgestellt werden (Kitaya und Yasuo 2010).

4.2.6 Prostaglandin E₂ und F_{2α}

Die Prostaglandin-Endoperoxid-Synthase 2 wird unter anderem durch die Entzündungsfaktoren IL1, IL6 und IL8 induziert (Morita 2002). Sie ist ein Schlüsselenzym in der Produktion von PGE₂ und PGF_{2α} (Williams und Dubois 1996). Es konnte in früheren Studien gezeigt werden, dass die PTGS2-Expression und Produktion von Prostaglandinen durch pathogene Bakterien beeinflusst wird. Die Kokultivierung boviner endometrialer Zellen mit *E. coli* oder LPS führte zu einer vermehrten Bildung von PTGS2-mRNA sowie zur Freisetzung von PGE₂ und PGF_{2α} aus den Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen (Herath *et al.* 2006). In einer neueren Studie konnten Peter *et al.* (2015) in bovinen endometrialen Cytobrushproben, die Kühen mit chronischer Endometritis 45 bis 51 Tage postpartum entnommen wurden, im Vergleich zu gesunden Kühen eine signifikant erhöhte mRNA-Expression von PTGS2 nachweisen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind mit diesen Resultaten vergleichbar. Es konnte eine vermehrte Bildung von PTGS2-mRNA in bovinen endometrialen Epithelzellen nach Kokultivierung mit *L. ruminis*, *L. amylovorus* und *B. pumilus* nachgewiesen werden (Gärtner *et al.* 2015; Gärtner *et al.* 2016). Dabei bewirkte *B. pumilus* unter den untersuchten Bakterien die stärkste Erhöhung der PTGS2-mRNA-Expression in den kokultivierten Epithelzellen. Eine vermehrte Freisetzung von PGF_{2α} aus den kokultivierten Zellen konnte *L. amylovorus* bewirken, die Bildung von PGE₂ blieb jedoch unter der Detektionsgrenze. Ebenso konnten Baranski *et al.* (2013) in endometrialen Cytobrushproben von Kühen mit chronischer Endometritis eine erhöhte PGF_{2α}-Synthese zeigen. Eine erhöhte Produktion von PGE₂ wurde dagegen in den Proben von Kühen mit subklinischer oder chronischer Endometritis nachgewiesen. Einen Wechsel von der Synthese von PGF_{2α} zu PGE₂ konnte in einer anderen Studie nach der Behandlung von bovinen Endometriumszellen mit LPS gezeigt werden (Herath *et al.* 2009). Dieser Mechanismus könnte bei Kühen für eine verlängerte Lutealphase nach uteriner Infektion mit Pathogenen verantwortlich sein, die sich negativ auf die Fruchtbarkeit der betroffenen Tiere auswirken kann (Sheldon *et al.* 2009b).

4.3 Schlussfolgerung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl autochthone, aus dem Uterus des Rindes isolierte *Lactobacillus* spp., die als nicht pathogen angesehen werden, als auch der potentiell pathogene *B. pumilus* in der Lage sind, eine erste Immunantwort in bovinen endometrialen Epithelzellen hervorzurufen. Dabei könnte der Unterschied in der Expression von pro-inflammatorischen Faktoren bei der Kokultivierung mit Kommensalen oder potentiell pathogenen Bakterien auf die Fähigkeit des Endometriums hinweisen, auf die jeweilige Pathogenität der umgebenden bakteriellen Mikrobiota unterschiedlich stark zu reagieren.

Die Ergebnisse dieser Arbeit legen den Schluss nahe, dass die Applikation von Milchsäurebakterien zur Aufrechterhaltung bzw. Wiedererlangung der Gesundheit des Reproduktionstraktes und einer verbesserten Fruchtbarkeit von Milchkühen beitragen könnte. Dafür könnte eine uterine Applikation von *L. buchneri* prophylaktisch nach dem Abkalben bzw. bei der Diagnose einer subklinischen Endometritis eingesetzt werden. Für dieses Ziel sind noch weitere Studien notwendig, um die Wirksamkeit und Verträglichkeit von *L. buchneri* in diesen Indikationen zu belegen. In dieser Arbeit konnten für diesen Ansatz grundlegende Erkenntnisse gewonnen werden.

5 Zusammenfassung

Nach dem Abkalben tritt häufig eine bakterielle Einwanderung in den Uterus des Rindes auf, die zu Krankheiten wie Metritis, chronischer oder subklinischer Endometritis führen kann. Dabei stellt das Endometrium die erste physikalische Barriere für eingedrungene Bakterien dar und ist beteiligt an der Antwort des angeborenen Immunsystems durch die Produktion von Zytokinen, um polymorphkernige neutrophile Granulozyten und Makrophagen anzulocken und zu aktivieren. Das Augenmerk der Forschung lag bisher in diesem Zusammenhang auf pathogenen Bakterien, die uterine Erkrankungen beim Rind hervorrufen können. Der Einfluss von kommensalen und potentiell pathogenen Bakterien auf das bovine Endometrium ist dagegen weitgehend unerforscht. Ziel des Forschungsprojektes war es daher, potentiell pathogene Bakterien sowie kommensale *Lactobacillus* spp. aus dem bovinen Uterus zu isolieren und zu charakterisieren. Die inflammatorische Immunantwort des Endometriums sollte *in vitro* und für bestimmte Entzündungsfaktoren *in vivo* untersucht werden.

Nicht-trächtigen, gesunden Kühen wurden mittels Cytobrushmethode endometriale Proben entnommen und daraus bakterielle Isolate gewonnen. Im ersten Teil dieser Arbeit wurde das pathogene Potential von den autochthonen Isolaten *Bacillus pumilus*, *Staphylococcus succinus* und *Weissella paramesenteroides* verglichen, um eine erste Immunantwort des bovinen Endometriums auf eine bakterielle Infektion *in vitro* zu untersuchen. *B. pumilus* verursachte innerhalb von 24 Stunden den Zelltod kokultivierter Epithelzellen und wurde als der potentiell pathogenste Kandidat für weitere *in vitro* Versuche ausgewählt.

Bovine endometriale Epithelzellen wurden mit *B. pumilus* in unterschiedlicher Anzahl (Multiplicity of infection (MOI) 1, 5 und 10) für 2, 4 und 6 Stunden kokultiviert. Gesamt-RNA wurde aus den kokultivierten Endometriumszellen isoliert. Mittels quantitativer reverser Transkriptions-Polymerase Kettenreaktion (RT-qPCR) wurde die Quantifizierung der mRNA-Expression der Entzündungsmediatoren Interleukin 1 alpha (IL1A), IL6, IL8, Prostaglandin-Endoperoxid-Synthase 2 (PTGS2), der CXC-Chemokin-Liganden 1-3 (CXCL1-3), des CXC-Chemokinrezeptors 2 (CXCR2), des Toll-like-Rezeptors 2 (TLR2) und TLR6 durchgeführt.

Zum Vergleich mit der mRNA-Expression von Entzündungsfaktoren *in vivo* wurden endometriale Cytobrushproben von gesunden Kühen und Kühen mit subklinischer oder chronischer Endometritis entnommen und mittels RT-qPCR analysiert. Die mRNA-Expression von CXCL1/2 und CXCR2 war in Endometriumsproben von Kühen mit subklinischer Endometritis und von CXCL3 bei Kühen mit chronischer Endometritis verglichen mit Endometriumsproben von gesunden Kühen signifikant erhöht. *B. pumilus*

ZUSAMMENFASSUNG

verursachte vergleichbar zu den *in vivo* Ergebnissen eine signifikant erhöhte mRNA-Expression von CXCL1-3, CXCR2, IL1A, IL6, IL8 und PTGS2 in den kokultivierten bovinen endometrialen Epithelzellen verglichen mit Kontrollzellen. Die Entzündungsfaktoren zeigten bereits nach zwei Stunden Kokultivierung mit *B. pumilus* in fast allen MOI die größte Erhöhung der mRNA-Expression im Vergleich zur Kontrolle.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden verschiedene Milchsäurebakterien wie *Lactobacillus buchneri*, *L. ruminis*, *L. amylovorus*, *L. plantarum*, *L. similis*, *Weissella paramesenteroides* und *Pediococcus pentosaceus* aus endometrialen Proben nicht-trächtiger, gesunder Kühe identifiziert. Die autochthonen Isolate *L. buchneri*, *L. ruminis* und *L. amylovorus* und ein kommerziell erhältlicher *L. vaginalis* wurden in einer MOI von 1, 5 und 10 mit bovinen endometrialen Epithelzellen kokultiviert. Die Laktobazillen zeigten keinen negativen Einfluss auf die Vitalität der kokultivierten Epithelzellen. Mittels RT-qPCR wurde die Quantifizierung der mRNA-Expression von IL1A, IL6, IL8, PTGS2, TLR2 und TLR6 nach 2, 4 und 6 Stunden durchgeführt. Die Freisetzung von IL6, IL8, Prostaglandin E₂ (PGE₂) und PGF_{2α} wurde mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) oder Enzyme Immunoassay (EIA) nach 24 und 48 Stunden bestimmt.

L. ruminis und *L. amylovorus* bewirkten in den Epithelzellen eine gesteigerte mRNA-Expression von IL1A, IL6, IL8 und PTGS2 sowie eine erhöhte Freisetzung von IL8 und PGF_{2α} im Vergleich zu Kontrollzellen. Im Gegensatz dazu beeinflusste *L. buchneri* die Expression und Freisetzung der untersuchten Faktoren nicht signifikant. Die mRNA-Expression von TLR2 und TLR6 zeigte sich nach der Kokultivierung unverändert zu den Kontrollzellen.

Die Ergebnisse der beiden Studien legen den Schluss nahe, dass sowohl potentiell pathogene Bakterien als auch bestimmte Kommensale die angeborene Immunantwort in bovinen endometrialen Epithelzellen auslösen können. Die Feststellung, dass *L. buchneri* keine Immunantwort in kokultivierten endometrialen Epithelzellen auslöste, könnte in der Prophylaxe oder Therapie von uterinen Erkrankungen Verwendung finden.

6 Summary

Evaluation of the influence of autochthonous potentially pathogenic bacteria and lactobacilli on bovine endometrial cells *in vitro*

Bacterial invasion of the uterus, which is able to lead to diseases like metritis, clinical and subclinical endometritis, is common in cattle after calving. The endometrium represents the first physical barrier for invading bacteria and is involved in the innate immune response by producing cytokines to attract and activate polymorphonuclear neutrophil granulocytes and macrophages. So far, the focus of research in this context has been on pathogenic bacteria that can cause uterine bovine diseases. However, the influence of commensal and potentially pathogenic bacteria on the bovine endometrium is mainly unknown. Therefore, the aim of the research project was to isolate and characterize potentially pathogenic bacteria and commensal *Lactobacillus* spp. from the bovine uterus. The inflammatory immune response of the endometrium was examined *in vitro* and for selected inflammatory factors *in vivo*.

Endometrial samples were collected from non-pregnant healthy cows by using the cytobrush method and out of them bacterial isolates were gained. In the first part of this project, the pathogenic potential of the autochthonous isolates *Bacillus pumilus*, *Staphylococcus succinus*, and *Weissella paramesenteroides* was examined to reveal a first immune response to a bacterial infection of the bovine endometrium *in vitro*. *B. pumilus* caused cell death of co-cultured epithelial cells within 24 h and was selected as the potentially most pathogenic candidate for further *in vitro* experiments.

Bovine endometrial epithelial cells were co-cultured with *B. pumilus* at a multiplicity of infection (MOI) of 1, 5, and 10 for 2, 4 and 6 h. Total RNA was isolated from co-cultured endometrial cells and subjected to quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-qPCR) for quantification of the mRNA expression of the inflammatory mediators interleukin 1 alpha (IL1A), IL6, IL8, prostaglandin endoperoxide synthase 2 (PTGS2), CXC chemokine ligands 1-3 (CXCL1-3), CXC chemokine receptor 2 (CXCR2), Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR6.

Endometrial cytobrush samples from healthy cows and cows with subclinical or clinical endometritis were collected for comparison with the mRNA expression of inflammatory factors *in vivo* and analyzed by using RT-qPCR. CXCL1/2 and CXCR2 mRNA expression was significantly increased in endometrial samples from cows with subclinical endometritis and CXCL3 in cows with clinical endometritis compared to endometrial samples from healthy

SUMMARY

cows. Comparable to the *in vivo* results, *B. pumilus* caused a significantly increased mRNA expression of CXCL1-3, CXCR2, IL1A, IL6, IL8, and PTGS2 in co-cultured bovine endometrial epithelial cells compared to control cells. The inflammatory factors showed the highest increase of mRNA expression in almost all MOI after only two hours of co-cultivation with *B. pumilus* compared to the control.

In the second part of this work, various lactic acid bacteria such as *Lactobacillus buchneri*, *L. ruminis*, *L. amylovorus*, *L. plantarum*, *L. similis*, *Weissella paramesenteroides* and *Pediococcus pentosaceus* were identified from endometrial samples from non-pregnant healthy cows. The autochthonous isolates *L. buchneri*, *L. ruminis* and *L. amylovorus* and a commercially available *L. vaginalis* were co-cultured with bovine endometrial epithelial cells at a MOI of 1, 5, and 10. The lactobacilli showed no negative impact on the viability of the co-cultured epithelial cells. By using RT-qPCR, quantification of the mRNA expression of IL1A, IL6, IL8, PTGS2, TLR2 and TLR6 was performed after 2, 4, and 6 h. The release of IL6, IL8, prostaglandin E₂ (PGE₂) and PGF_{2α} was measured by using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) or enzyme immunoassay (EIA) after 24 h and 48 h.

L. ruminis and *L. amylovorus* caused in the epithelial cells increased mRNA expression of IL1A, IL6, IL8, and PTGS2 as well as a higher release of IL8 and PGF_{2α} compared to control cells. In contrast, *L. buchneri* did not significantly affect the expression and release of the examined factors. The mRNA expression of TLR2 and TLR6 was unaffected after co-culture compared to the control cells.

The results of the two studies suggest that potentially pathogenic bacteria as well as distinct commensals may induce an innate immune response in bovine endometrial epithelial cells. The finding that *L. buchneri* elicits no immune response in co-cultured endometrial epithelial cells could be used in the prophylaxis or therapy of uterine diseases.

7 Literaturverzeichnis

- Addison, C. L., Daniel, T. O., Burdick, M. D., Liu, H., Ehlert, J. E., Xue, Y. Y., Buechi, L., Walz, A., Richmond, A., Strieter, R. M.** (2000). The CXC chemokine receptor 2, CXCR2, is the putative receptor for ELR+ CXC chemokine-induced angiogenic activity. *JOURNAL OF IMMUNOLOGY (BALTIMORE, MD. 1950)* **165**, 5269–5277.
- Akira, S., Takeda, K., Kaisho, T.** (2001). Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *NATURE IMMUNOLOGY* **2**, 675–680.
- Ametaj, B. N., Iqbal, S., Selami, F., Odhiambo, J. F., Wang, Y., Gänzle, M. G., Dunn, S. M., Zebeli, Q.** (2014). Intravaginal administration of lactic acid bacteria modulated the incidence of purulent vaginal discharges, plasma haptoglobin concentrations, and milk production in dairy cows. *RESEARCH IN VETERINARY SCIENCE* **96**, 365–370.
- Amos, M. R., Healey, G. D., Goldstone, R. J., Mahan, S. M., Düvel, A., Schuberth, H.-J., Sandra, O., Zieger, P., Dieuzy-Labaye, I., Smith, D. G. E., Sheldon, I. M.** (2014). Differential endometrial cell sensitivity to a cholesterol-dependent cytolysin links *Trueperella pyogenes* to uterine disease in cattle. *BIOLOGY OF REPRODUCTION* **90**, 54.
- Arend, W. P.** (1991). Interleukin 1 receptor antagonist. A new member of the interleukin 1 family. *THE JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION* **88**, 1445–1451.
- Arosh, J. A., Parent, J., Chapdelaine, P., Sirois, J., Fortier, M. A.** (2002). Expression of cyclooxygenases 1 and 2 and prostaglandin E synthase in bovine endometrial tissue during the estrous cycle. *BIOLOGY OF REPRODUCTION* **67**, 161–169.
- Aroutcheva, A. A., Simoes, J. A., Faro, S.** (2001). Antimicrobial protein produced by vaginal *Lactobacillus acidophilus* that inhibits *Gardnerella vaginalis*. *INFECTIOUS DISEASES IN OBSTETRICS AND GYNECOLOGY* **9**, 33–39.
- Asselin, E., Lacroix, D., Fortier, M. A.** (1997). IFN-tau increases PGE2 production and COX-2 gene expression in the bovine endometrium in vitro. *MOLECULAR AND CELLULAR ENDOCRINOLOGY* **132**, 117–126.
- Atassi, F., Brassart, D., Grob, P., Graf, F., Servin, A.** (2006). *Lactobacillus* strains isolated from the vaginal microbiota of healthy women inhibit *Prevotella bivia* and *Gardnerella vaginalis* in coculture and cell culture. *FEMS IMMUNOLOGY AND MEDICAL MICROBIOLOGY* **48**, 424–432.
- Ausubel, F. M.** (2005). Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved? *NATURE IMMUNOLOGY* **6**, 973–979.
-

- Azawi, O. I., Rahawy, M. A., Hadad, J. J.** (2008). Bacterial isolates associated with dystocia and retained placenta in iraqi buffaloes. *REPRODUCTION IN DOMESTIC ANIMALS = ZUCHTHYGIENE* **43**, 286–292.
- Baggiolini, M.** (1993). Novel aspects of inflammation: interleukin-8 and related chemotactic cytokines. *THE CLINICAL INVESTIGATOR* **71**, 812–814.
- Baggiolini, M.** (2001). Chemokines in pathology and medicine. *JOURNAL OF INTERNAL MEDICINE* **250**, 91–104.
- Baggiolini, M., Clark-Lewis, I.** (1992). Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. *FEBS LETTERS* **307**, 97–101.
- Baggiolini, M., Walz, A., Kunkel, S. L.** (1989). Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. *THE JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION* **84**, 1045–1049.
- Baranski, W., Lukasik, K., Skarzynski, D., Sztachanska, M., Zdunczyk, S., Janowski, T.** (2013). Secretion of prostaglandins and leukotrienes by endometrial cells in cows with subclinical and clinical endometritis. *THERIOGENOLOGY* **80**, 766–772.
- Barbosa, T. M., Serra, C. R., La Ragione, R. M., Woodward, M. J., Henriques, A. O.** (2005). Screening for *Bacillus* isolates in the broiler gastrointestinal tract. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY* **71**, 968–978.
- Barlund, C. S., Carruthers, T. D., Waldner, C. L., Palmer, C. W.** (2008). A comparison of diagnostic techniques for postpartum endometritis in dairy cattle. *THERIOGENOLOGY* **69**, 714–723.
- Baron, V. T., Pio, R., Jia, Z., Mercola, D.** (2015). Early Growth Response 3 regulates genes of inflammation and directly activates IL6 and IL8 expression in prostate cancer. *BRITISH JOURNAL OF CANCER* **112**, 755–764.
- Bartlett, P. C., Kirk, J. H., Wilke, M. A., Kaneene, J. B., Mather, E. C.** (1986). Metritis complex in Michigan Holstein-Friesian cattle: incidence, descriptive epidemiology and estimated economic impact. *PREVENTIVE VETERINARY MEDICINE* **4**, 235–248.
- Basak, S., Dubanchet, S., Zourbas, S., Chaouat, G., Das, C.** (2002). Expression of pro-inflammatory cytokines in mouse blastocysts during implantation: modulation by steroid hormones. *AMERICAN JOURNAL OF REPRODUCTIVE IMMUNOLOGY (NEW YORK, N.Y. 1989)* **47**, 2–11.
- Baumgärtner, W; Gruber, A.** (2010). Allgemeine Pathologie für die Tiermedizin. 1. Aufl. (Enke: Stuttgart)

-
- Beecher, C., Daly, M., Berry, D. P., Klostermann, K., Flynn, J., Meaney, W., Hill, C., McCarthy, T. V., Ross, R. P., Giblin, L.** (2009). Administration of a live culture of *Lactococcus lactis* DPC 3147 into the bovine mammary gland stimulates the local host immune response, particularly IL-1 β and IL-8 gene expression. *JOURNAL OF DAIRY RESEARCH* **76**, 340.
- Benzaquen, M. E., Risco, C. A., Archbald, L. F., Melendez, P., Thatcher, M.-J., Thatcher, W. W.** (2007). Rectal temperature, calving-related factors, and the incidence of puerperal metritis in postpartum dairy cows. *JOURNAL OF DAIRY SCIENCE* **90**, 2804–2814.
- Bishayi, B., Samanta, A. K.** (1996). Identification and characterization of specific receptor for interleukin-8 from the surface of human monocytes. *SCANDINAVIAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY* **43**, 531–536.
- Bondurant, R. H.** (1999). Inflammation in the bovine female reproductive tract. *JOURNAL OF ANIMAL SCIENCE* **77 Suppl 2**, 101–110.
- Bonnett, B. N., Martin, S. W., Gannon, V. P., Miller, R. B., Etherington, W. G.** (1991). Endometrial biopsy in Holstein-Friesian dairy cows. III. Bacteriological analysis and correlations with histological findings. *CANADIAN JOURNAL OF VETERINARY RESEARCH* **55**, 168–173.
- Bonnett, B. N., Martin, S. W., Meek, A. H.** (1993). Associations of clinical findings, bacteriological and histological results of endometrial biopsy with reproductive performance of postpartum dairy cows. *PREV. VET. MED.* **15**, 205–220.
- Bordoni, R., Fine, R., Murray, D., Richmond, A.** (1990). Characterization of the role of melanoma growth stimulatory activity (MGSA) in the growth of normal melanocytes, nevocytes, and malignant melanocytes. *JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY* **44**, 207–219.
- Borges, A. M., Healey, G. D., Sheldon, I. M.** (2012). Explants of intact endometrium to model bovine innate immunity and inflammation ex vivo. *AMERICAN JOURNAL OF REPRODUCTIVE IMMUNOLOGY (NEW YORK, N.Y. 1989)* **67**, 526–539.
- Bourdiec, A., Martel, V., Akoum, A.** (2014). Synchronous regulation of the determinants of endometrial receptivity to interleukin 1 at key stages of early embryo implantation in vivo. *FERTILITY AND STERILITY* **101**, 1183–1193.
- Cannon, J. P., Lee, T. A., Bolanos, J. T., Danziger, L. H.** (2005). Pathogenic relevance of *Lactobacillus*: a retrospective review of over 200 cases. *EUROPEAN JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY & INFECTIOUS DISEASES OFFICIAL* **24**, 31–40.
- Chapwanya, A., Meade, K. G., Doherty, M. L., Callanan, J. J., Mee, J. F., O'Farrelly, C.** (2009). Histopathological and molecular evaluation of Holstein-Friesian cows postpartum:
-

- Toward an improved understanding of uterine innate immunity. *THERIOGENOLOGY* **71**, 1396–1407.
- Chapwanya, A., Meade, K. G., Doherty, M. L., Callanan, J. J., O'Farrelly, C.** (2013). Endometrial epithelial cells are potent producers of tracheal antimicrobial peptide and serum amyloid A3 gene expression in response to *E. coli* stimulation. *VETERINARY IMMUNOLOGY AND IMMUNOPATHOLOGY* **151**, 157–162.
- Charpigny, G., Reinaud, P., Tamby, J. P., Créminon, C., Martal, J., Maclouf, J., Guillomot, M.** (1997). Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in ovine endometrium during the estrous cycle and early pregnancy. *ENDOCRINOLOGY* **138**, 2163–2171.
- Cheong, S. H., Nydam, D. V., Galvão, K. N., Crosier, B. M., Gilbert, R. O.** (2011). Cow-level and herd-level risk factors for subclinical endometritis in lactating Holstein cows. *JOURNAL OF DAIRY SCIENCE* **94**, 762–770.
- Clark-Lewis, I., Dewald, B., Geiser, T., Moser, B., Baggiolini, M.** (1993). Platelet factor 4 binds to interleukin 8 receptors and activates neutrophils when its N terminus is modified with Glu-Leu-Arg. *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA* **90**, 3574–3577.
- Cronin, J. G., Kanamarlapudi, V., Thornton, C. A., Sheldon, I. M.** (2016). Signal transducer and activator of transcription-3 licenses Toll-like receptor 4-dependent interleukin (IL)-6 and IL-8 production via IL-6 receptor-positive feedback in endometrial cells. *MUCOSAL IMMUNOLOGY* **9**, 1125–1136.
- Cronin, J. G., Turner, M. L., Goetze, L., Bryant, C. E., Sheldon, I. M.** (2012). Toll-like receptor 4 and MYD88-dependent signaling mechanisms of the innate immune system are essential for the response to lipopolysaccharide by epithelial and stromal cells of the bovine endometrium. *BIOLOGY OF REPRODUCTION* **86**, 51.
- Curtis, C. R., Erb, H. N., Sniffen, C. J., Smith, R. D., Kronfeld, D. S.** (1985). Path analysis of dry period nutrition, postpartum metabolic and reproductive disorders, and mastitis in Holstein cows. *JOURNAL OF DAIRY SCIENCE* **68**, 2347–2360.
- Danesh Mesgaran, S., Gärtner, M. A., Wagener, K., Drillich, M., Ehling-Schulz, M., Einspanier, R., Gabler, C.** (2018). Different inflammatory responses of bovine oviductal epithelial cells in vitro to bacterial species with distinct pathogenicity characteristics and passage number. *THERIOGENOLOGY* **106**, 237–246.
- Danet-Desnoyers, G., Meyer, M. D., Gross, T. S., Johnson, J. W., Thatcher, W. W.** (1995). Regulation of endometrial prostaglandin synthesis during early pregnancy in cattle: Effects of phospholipases and calcium in vitro. *PROSTAGLANDINS* **50**, 313–330.

- Davies, D., Meade, K., Herath, S., Eckersall, P., Gonzalez, D., White, J., Conlan, R., O'Farrelly, C., Sheldon, I. M.** (2008). Toll-like receptor and antimicrobial peptide expression in the bovine endometrium. *REPRODUCTIVE BIOLOGY AND ENDOCRINOLOGY RB&E* **6**, 53.
- De, M., Sanford, T. R., Wood, G. W.** (1992). Interleukin-1, interleukin-6, and tumor necrosis factor alpha are produced in the mouse uterus during the estrous cycle and are induced by estrogen and progesterone. *DEVELOPMENTAL BIOLOGY* **151**, 297–305.
- Deng, Q., Odhiambo, J. F., Farooq, U., Lam, T., Dunn, S. M., Ametaj, B. N.** (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.
- Deng, Q., Odhiambo, J. F., Farooq, U., Lam, T., Dunn, S. M., Gänzle, M. G., Ametaj, B. N.** (2015). Intravaginally administered lactic acid bacteria expedited uterine involution and modulated hormonal profiles of transition dairy cows. *JOURNAL OF DAIRY SCIENCE* **98**, 6018–6028.
- Dhawan, P., Richmond, A.** (2002). Role of CXCL1 in tumorigenesis of melanoma. *JOURNAL OF LEUKOCYTE BIOLOGY* **72**, 9–18.
- Dillon, P., Berry, D. P., Evans, R. D., Buckley, F., Horan, B.** (2006). Consequences of genetic selection for increased milk production in European seasonal pasture based systems of milk production. *LIVESTOCK SCIENCE* **99**, 141–158.
- Dinarello, C. A.** (1991). Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. *BLOOD* **77**, 1627–1652.
- Dinarello, C. A.** (2002). The IL-1 family and inflammatory diseases. *CLINICAL AND EXPERIMENTAL RHEUMATOLOGY* **20**, 13.
- Dinarello, C. A.** (2009). Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *ANNUAL REVIEW OF IMMUNOLOGY* **27**, 519–550.
- Dinarello, C. A., Simon, A., van der Meer, J. W. M.** (2012). Treating inflammation by blocking interleukin-1 in a broad spectrum of diseases. *NATURE REVIEWS DRUG DISCOVERY* **11**, 633–652.
- Dohmen, M. J. W., Joop, K., Sturk, A., Bols, P. E., Lohuis, J. A.** (2000). Relationship between intra-uterine bacterial contamination, endotoxin levels and the development of endometritis in postpartum cows with dystocia or retained placenta. *THERIOGENOLOGY* **54**, 1019–1032.

- Dohmen, M. J. W., Lohuis, J. A. C. M., Huszenicza, G., Nagy, P., Gacs, M.** (1995). The relationship between bacteriological and clinical findings in cows with subacute/chronic endometritis. *THERIOGENOLOGY* **43**, 1379–1388.
- Dolezel, R., Palenik, T., Cech, S., Kohoutova, L., Vyskocil M.** (2010). Bacterial contamination of the uterus in cows with various clinical types of metritis and endometritis and use of hydrogen peroxide for intrauterine treatment. *VETERINARNI MEDICINA* **55**, 504–511.
- Dover, S. E., Aroutcheva, A. A., Faro, S., Chikindas, M. L.** (2008). Natural antimicrobials and their role in vaginal health: a short review. *INTERNATIONAL JOURNAL OF PROBIOTICS & PREBIOTICS* **3**, 219–230.
- Drastich, P., Frolova-Brizova, L., Zanvit, P., Spicak, J., Tlaskalova-Hogenova, H.** (2011). Spontaneous in vitro IL-6 production in various intestinal segments in patients with inflammatory bowel disease. *FOLIA MICROBIOLOGICA* **56**, 185–190.
- Drillich, M., Beetz, O., Pfutzner, A., Sabin, M., Sabin, H. J., Kutzer, P., Nattermann, H., Heuwieser, W.** (2001). Evaluation of a systemic antibiotic treatment of toxic puerperal metritis in dairy cows. *JOURNAL OF DAIRY SCIENCE* **84**, 2010–2017.
- Drillich, M., Raab, D., Wittke, M., Heuwieser, W.** (2005). Treatment of chronic endometritis in dairy cows with an intrauterine application of enzymes. A field trial. *THERIOGENOLOGY* **63**, 1811–1823.
- Dubois, R. N., Abramson, S. B., Crofford, L., Gupta, R. A., Simon, L. S., Van De Putte, L. B., Lipsky, P. E.** (1998). Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB JOURNAL OFFICIAL PUBLICATION OF THE FEDERATION OF AMERICAN SOCIETIES FOR EXPERIMENTAL BIOLOGY* **12**, 1063–1073.
- Dubuc, J., Duffield, T. F., Leslie, K. E., Walton, J. S., LeBlanc, S. J.** (2010). Risk factors for postpartum uterine diseases in dairy cows. *JOURNAL OF DAIRY SCIENCE* **93**, 5764–5771.
- Dubuc, J., Duffield, T. F., Leslie, K. E., Walton, J. S., LeBlanc, S. J.** (2011). Randomized clinical trial of antibiotic and prostaglandin treatments for uterine health and reproductive performance in dairy cows. *JOURNAL OF DAIRY SCIENCE* **94**, 1325–1338.
- Fakhry, S., Sorrentini, I., Ricca, E., Felice, M. de, Baccigalupi, L.** (2008). Characterization of spore forming Bacilli isolated from the human gastrointestinal tract. *JOURNAL OF APPLIED MICROBIOLOGY* **105**, 2178–2186.
- FAO** (2018). Dairy market review. (Rome)

- Farhat, K., Riekenberg, S., Heine, H., Debarry, J., Lang, R., Mages, J., Buwitt-Beckmann, U., Roschmann, K., Jung, G., Wiesmuller, K. -H., Ulmer, A. J.** (2007). Heterodimerization of TLR2 with TLR1 or TLR6 expands the ligand spectrum but does not lead to differential signaling. *JOURNAL OF LEUKOCYTE BIOLOGY* **83**, 692–701.
- Farin, P. W., Ball, L., Olson, J. D., Mortimer, R. G., Jones, R. L., Adney, W. S., McChesney, A. E.** (1989). Effect of *Actinomyces pyogenes* and gram-negative anaerobic bacteria on the development of bovine pyometra. *THERIOGENOLOGY* **31**, 979–989.
- Felis, G. E., Dellaglio, F.** (2007). Taxonomy of Lactobacilli and Bifidobacteria. *CURRENT ISSUES IN INTESTINAL MICROBIOLOGY* **8**, 44–61.
- Fischer, C., Drillich, M., Odau, S., Heuwieser, W., Einspanier, R., Gabler, C.** (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. *REPRODUCTION, FERTILITY, AND DEVELOPMENT* **22**, 818–829.
- Földi, J., Kulcsar, M., Pecsí, A., Huyghe, B., Sa, C. de, Lohuis, J. A. C. M., Cox, P., Huszenicza, G.** (2006). Bacterial complications of postpartum uterine involution in cattle. *ANIMAL REPRODUCTION SCIENCE* **96**, 265–281.
- Fortier, M. A., Krishnaswamy, K., Danyod, G., Boucher-Kovalik, S., Chapdalaine, P.** (2008). A postgenomic integrated view of prostaglandins in reproduction: implications for other body systems. *JOURNAL OF PHYSIOLOGY AND PHARMACOLOGY AN OFFICIAL JOURNAL OF THE POLISH PHYSIOLOGICAL SOCIETY* **59 Suppl 1**, 65–89.
- From, C., Hormazabal, V., Granum, P. E.** (2007). Food poisoning associated with pumilacidin-producing *Bacillus pumilus* in rice. *INTERNATIONAL JOURNAL OF FOOD MICROBIOLOGY* **115**, 319–324.
- Fukuda, J., Nasu, K., Sun, B., Mine, S., Kawano, Y., Miyakawa, I.** (2003). Expression of growth-regulated oncogene beta in an endometrial epithelial cell line, HHUA, and cultured human endometrial cells. *JOURNAL OF REPRODUCTIVE IMMUNOLOGY* **59**, 61–70.
- Gabler, C., Drillich, M., Fischer, C., Holder, C., Heuwieser, W., Einspanier, R.** (2009). Endometrial expression of selected transcripts involved in prostaglandin synthesis in cows with endometritis. *THERIOGENOLOGY* **71**, 993–1004.
- Gabler, C., Fischer, C., Drillich, M., Einspanier, R., Heuwieser, W.** (2010). Time-dependent mRNA expression of selected pro-inflammatory factors in the endometrium of primiparous cows postpartum. *REPRODUCTIVE BIOLOGY AND ENDOCRINOLOGY RB&E* **8**, 152.

- Galvão, K. N., Frajblat, M., Brittin, S. B., Butler, W. R., Guard, C. L., Gilbert, R. O.** (2009a). Effect of prostaglandin F2 α on subclinical endometritis and fertility in dairy cows. *JOURNAL OF DAIRY SCIENCE* **92**, 4906–4913.
- Galvão, K. N., Greco, L. F., Vilela, J. M., Sá Filho, M. F., Santos, J. E. P.** (2009b). Effect of intrauterine infusion of ceftiofur on uterine health and fertility in dairy cows. *JOURNAL OF DAIRY SCIENCE* **92**, 1532–1542.
- Galvão, K. N., Santos, N. R., Galvão, J. S., Gilbert, R. O.** (2011). Association between endometritis and endometrial cytokine expression in postpartum Holstein cows. *THERIOGENOLOGY* **76**, 290–299.
- Gärtner, M. A., Bondzio, A., Braun, N., Jung, M., Einspanier, R., Gabler, C.** (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, M. A., Peter, S., Jung, M., Drillich, M., Einspanier, R., Gabler, C.** (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. *REPRODUCTION, FERTILITY AND DEVELOPMENT* **28**, 982–994.
- Genís, S., Bach, A., Fabregas, F., Aris, A.** (2016). Potential of lactic acid bacteria at regulating *Escherichia coli* infection and inflammation of bovine endometrium. *THERIOGENOLOGY* **85**, 625–637.
- Genís, S., Sanchez-Chardi, A., Bach, A., Fabregas, F., Aris, A.** (2017). A combination of lactic acid bacteria regulates *Escherichia coli* infection and inflammation of the bovine endometrium. *JOURNAL OF DAIRY SCIENCE* **100**, 479–492.
- Gilbert, R. O., Shin, S. T., Guard, C. L., Erb, H. N., Frajblat, M.** (2005). Prevalence of endometritis and its effects on reproductive performance of dairy cows. *THERIOGENOLOGY* **64**, 1879–1888.
- Griffin, J. F., Hartigan, P. J., Nunn, W. R.** (1974). Non-specific uterine infection and bovine fertility. I. Infection patterns and endometritis during the first seven weeks post-partum. *THERIOGENOLOGY* **1**, 91–106.
- Haimerl, P., Heuwieser, W., Arlt, S.** (2013). Therapy of bovine endometritis with prostaglandin F2 α : A meta-analysis. *JOURNAL OF DAIRY SCIENCE* **96**, 2973–2987.
- Haimerl, P., Heuwieser, W., Arlt, S.** (2018). Short communication: Meta-analysis on therapy of bovine endometritis with prostaglandin F2 α -An update. *JOURNAL OF DAIRY SCIENCE* **101**, 10557–10564.

- Hammes, W. P., Hertel, C.** (2009). Genus I. *Lactobacillus* Beijerinck 1901. In 'Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 3: The Firmicutes (2. Aufl.)'. (Hrsg. P. Vos de, G. Garrity, D. Jones, N.R. Krieg, W. Ludwig, F.A. Rainey, K.H. Schleifer, and W. Whitman) pp. 465–510. (Springer: New York)
- Hare, W. R., Hoyt, P. G., Hohn, C., Higgins, J. A.** (2008). Ribosomal RNA-based analysis of the bacterial flora from the conjunctivae of cattle with bovine keratoconjunctivitis (BKC). *VETERINARY MICROBIOLOGY* **131**, 358–368.
- Hawes, S. E., Hillier, S. L., Benedetti, J., Stevens, C. E., Koutsky, L. A., Wolner-Hanssen, P., Holmes, K. K.** (1996). Hydrogen peroxide-producing lactobacilli and acquisition of vaginal infections. *THE JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES* **174**, 1058–1063.
- Hébert, C. A., Vitangcol, R. V., Baker, J. B.** (1991). Scanning mutagenesis of interleukin-8 identifies a cluster of residues required for receptor binding. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* **266**, 18989–18994.
- Heinrich, P. C., Behrmann, I., Haan, S., Hermanns, H. M., Müller-Newen, G., Schaper, F.** (2003). Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *BIOCHEMICAL JOURNAL* **374**, 1.
- Heinrich, P. C.; Müller, M.; Graeve, L.** (2014). Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. (Springer: Berlin Heidelberg)
- Helliwell, R. J., Adams, L. F., Mitchell, M. D.** (2004). Prostaglandin synthases: recent developments and a novel hypothesis. *PROSTAGLANDINS, LEUKOTRIENES, AND ESSENTIAL FATTY ACIDS* **70**, 101–113.
- Herath, S., Fischer, D. P., Werling, D., Williams, E. J., Lilly, S. T., Dobson, H., Bryant, C. E., Sheldon, I. M.** (2006). Expression and function of Toll-like receptor 4 in the endometrial cells of the uterus. *ENDOCRINOLOGY* **147**, 562–570.
- Herath, S., Lilly, S. T., Fischer, D. P., Williams, E. J., Dobson, H., Bryant, C. E., Sheldon, I. M.** (2009). Bacterial lipopolysaccharide induces an endocrine switch from prostaglandin F2 to prostaglandin E2 in bovine endometrium. *ENDOCRINOLOGY* **150**, 1912–1920.
- Hussain, A. M., Daniel, R. C., O'Boyle, D.** (1990). Postpartum uterine flora following normal and abnormal puerperium in cows. *THERIOGENOLOGY* **34**, 291–302.
- Huszenicza, G., Fodor, M., Gacs, M., Kulcsar, M., Dohmen, M. J. W., Vamos, M., Porkolab, L., Kegl, T., Bartyik, J., Lohuis, J., Janosi, S., Szita, G.** (1999). Uterine bacteriology, resumption of cyclic ovarian activity and fertility in postpartum cows kept in large-scale dairy herds. *REPRODUCTION IN DOMESTIC ANIMALS* **34**, 237–245.

- Ibrahim, M., Peter, S., Gärtner, M. A., Michel, G., Jung, M., Einspanier, R., Gabler, C.** (2016). Increased mRNA expression of selected antimicrobial peptides around ovulation and during inflammatory processes in the bovine endometrium postpartum. *THERIOGENOLOGY* **86**, 2040–2053.
- Ibrahim, M., Peter, S., Wagener, K., Drillich, M., Ehling-Schulz, M., Einspanier, R., Gabler, C.** (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. *FRONTIERS IN CELLULAR AND INFECTION MICROBIOLOGY* **7**, 264.
- Ishikawa, Y., Nakada, K., Hagiwara, K., Kirisawa, R., Iwai, H., Moriyoshi, M., Sawamukai, Y.** (2004). Changes in interleukin-6 concentration in peripheral blood of pre- and post-partum dairy cattle and its relationship to postpartum reproductive diseases. *THE JOURNAL OF VETERINARY MEDICAL SCIENCE / THE JAPANESE SOCIETY OF VETERINARY SCIENCE* **66**, 1403–1408.
- Jasper, M. J., Tremellen, K. P., Robertson, S. A.** (2007). Reduced expression of IL-6 and IL-1 α mRNAs in secretory phase endometrium of women with recurrent miscarriage. *JOURNAL OF REPRODUCTIVE IMMUNOLOGY* **73**, 74–84.
- Jin, M. S., Kim, S. E., Heo, J. Y., Lee, M. E., Kim, H. M., Paik, S.-G., Lee, H., Lee, J.-O.** (2007). Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a triacylated lipopeptide. *CELL* **130**, 1071–1082.
- Jones, S. A.** (2005). Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6. *JOURNAL OF IMMUNOLOGY (BALTIMORE, MD. 1950)* **175**, 3463–3468.
- Jost, B. H., Billington, S. J.** (2005). *Arcanobacterium pyogenes*: molecular pathogenesis of an animal opportunist. *ANTONIE VAN LEEUWENHOEK* **88**, 87–102.
- Kasimanickam, R., Duffield, T. F., Foster, R. A., Gartley, C. J., Leslie, K. E., Walton, J. S., Johnson, W. H.** (2004). Endometrial cytology and ultrasonography for the detection of subclinical endometritis in postpartum dairy cows. *THERIOGENOLOGY* **62**, 9–23.
- Kasimanickam, R., Duffield, T. F., Foster, R. A., Gartley, C. J., Leslie, K. E., Walton, J. S., Johnson, W. H.** (2005). The effect of a single administration of cephalixin or cloprostenol on the reproductive performance of dairy cows with subclinical endometritis. *THERIOGENOLOGY* **63**, 818–830.
- Kim, B., Lee, Y., Kim, E., Kwak, A., Ryoo, S., Bae, S. H., Azam, T., Kim, S., Dinarello, C. A.** (2013). The interleukin-1 α precursor is biologically active and is likely a key alarm in the IL-1 family of cytokines. *FRONTIERS IN IMMUNOLOGY* **4**, 391.

- Kim, I.-H., Kang, H.-G.** (2003). Risk factors for postpartum endometritis and the effect of endometritis on reproductive performance in dairy cows in Korea. *THE JOURNAL OF REPRODUCTION AND DEVELOPMENT* **49**, 485–491.
- Kishimoto, T., Akira, S., Narazaki, M., Taga, T.** (1995). Interleukin-6 family of cytokines and gp130. *BLOOD* **86**, 1243–1254.
- Kitaya, K., Yasuo, T.** (2010). Aberrant expression of selectin E, CXCL1, and CXCL13 in chronic endometritis. *MODERN PATHOLOGY* **23**, 1136–1146.
- Kumagai, A., Yoshioka, S., Sakumoto, R., Okuda, K.** (2014). Auto-amplification system for prostaglandin F2alpha in bovine corpus luteum. *MOLECULAR REPRODUCTION AND DEVELOPMENT* **81**, 646–654.
- Kummer, V., Lany, P., Maskova, J., Zraly, Z., Canderle, J.** (1997). Stimulation of cell defense mechanism of bovine endometrium by temporal colonization with selected strains of lactobacilli. *VETERINARNI MEDICINA* **42**, 217–224.
- Lamont, R. F., Sobel, J. D., Akins, R. A., Hassan, S. S., Chaiworapongsa, T., Kusanovic, J. P., Romero, R.** (2011). The vaginal microbiome: new information about genital tract flora using molecular based techniques. *BJOG AN INTERNATIONAL JOURNAL OF OBSTETRICS AND GYNAECOLOGY* **118**, 533–549.
- LeBlanc, S. J.** (2012). Interactions of metabolism, inflammation, and reproductive tract health in the postpartum period in dairy cattle. *REPRODUCTION IN DOMESTIC ANIMALS = ZUCHTHYGIENE* **47**, 18–30.
- LeBlanc, S. J., Duffield, T. F., Leslie, K. E., Bateman, K. G., Keefe, G. P., Walton, J. S., Johnson, W. H.** (2002a). Defining and diagnosing postpartum clinical endometritis and its impact on reproductive performance in dairy cows. *JOURNAL OF DAIRY SCIENCE* **85**, 2223–2236.
- LeBlanc, S. J., Duffield, T. F., Leslie, K. E., Bateman, K. G., Keefe, G. P., Walton, J. S., Johnson, W. H.** (2002b). The effect of treatment of clinical endometritis on reproductive performance in dairy cows. *JOURNAL OF DAIRY SCIENCE* **85**, 2237–2249.
- Lefebvre, R. C., Stock, A. E.** (2012). Therapeutic efficiency of antibiotics and prostaglandin F2α in postpartum dairy cows with clinical endometritis: An evidence-based evaluation. *THE VETERINARY CLINICS OF NORTH AMERICA. FOOD ANIMAL PRACTICE* **28**, 79–96.
- Lewis, G. S.** (1997). Uterine health and disorders. *JOURNAL OF DAIRY SCIENCE* **80**, 984–994.

- Li, A., Dubey, S., Varney, M. L., Dave, B. J., Singh, R. K.** (2003). IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis. *JOURNAL OF IMMUNOLOGY (BALTIMORE, MD. 1950)* **170**, 3369–3376.
- Liebich, H.-G.** (2010). Funktionelle Histologie der Haussäugetiere und Vögel: Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis. 5. Aufl. (Schattauer: Stuttgart)
- Lima, F. S., Bisinotto, R. S., Ribeiro, E. S., Greco, L. F., Ayres, H., Favoreto, M. G., Carvalho, M. R., Galvao, K. N., Santos, J. E. P.** (2013). Effects of 1 or 2 treatments with prostaglandin F(2)alpha on subclinical endometritis and fertility in lactating dairy cows inseminated by timed artificial insemination. *JOURNAL OF DAIRY SCIENCE* **96**, 6480–6488.
- Lincke, A.** (2007). Untersuchung zur Behandlung von subklinischen Endometritiden des Milchrindes mit proteolytischen Enzymen oder Prostaglandin F2α. (Mensch & Buch Verlag: Berlin)
- Lincke, A., Drillich, M., Heuwieser, W.** (2007). Die subklinische Endometritis des Rindes und ihr Einfluss auf die Fruchtbarkeit - eine Übersicht neuerer Untersuchungen. *BERLINER UND MÜNCHENER TIERÄRZTLICHE WOCHENSCHRIFT* **120**, 245–250.
- Logan, N. A., De Vos P.** (2009). Genus I. *Bacillus* Cohn 1872. In 'Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 3: The Firmicutes (2. Aufl.)'. (Hrsg. P. Vos de, G. Garrity, D. Jones, N.R. Krieg, W. Ludwig, F.A. Rainey, K.H. Schleifer, and W. Whitman) pp. 21–128. (Springer: New York)
- Lucy, M. C.** (2001). Reproductive loss in high-producing dairy cattle: Where will it end? *JOURNAL OF DAIRY SCIENCE* **84**, 1277–1293.
- Macdonald, K. A., Verkerk, G. A., Thorrold, B. S., Pryce, J. E., Penno, J. W., McNaughton, L. R., Burton, L. J., Lancaster, J. A. S., Williamson, J. H., Holmes, C. W.** (2008). A comparison of three strains of holstein-friesian grazed on pasture and managed under different feed allowances. *JOURNAL OF DAIRY SCIENCE* **91**, 1693–1707.
- Machado, V. S., Oikonomou, G., Bicalho, M. L. S., Knauer, W. A., Gilbert, R., Bicalho, R. C.** (2012). Investigation of postpartum dairy cows' uterine microbial diversity using metagenomic pyrosequencing of the 16S rRNA gene. *VETERINARY MICROBIOLOGY* **159**, 460–469.
- Madoz, L. V., Giuliadori, M. J., Jaureguiberry, M., Plontzke, J., Drillich, M., La Sota, R. L. de** (2013). The relationship between endometrial cytology during estrous cycle and

- cutoff points for the diagnosis of subclinical endometritis in grazing dairy cows. *JOURNAL OF DAIRY SCIENCE* **96**, 4333–4339.
- Markusfeld, O.** (1987). Periparturient traits in seven high dairy herds. Incidence rates, association with parity, and interrelationships among traits. *JOURNAL OF DAIRY SCIENCE* **70**, 158–166.
- Mayr, A. (Hrsg.)** (2006). Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. 8. Aufl. (Enke: Stuttgart)
- McCracken, J. A., Custer, E. E., Lamsa, J. C.** (1999). Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event. *PHYSIOLOGICAL REVIEWS* **79**, 263–323.
- Medzhitov, R.** (2001). Toll-like receptors and innate immunity. *NATURE REVIEWS. IMMUNOLOGY* **1**, 135–145.
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., Janeway, C. A. Jr.** (1997). A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *NATURE* **388**, 394–397.
- Menendez, A., Brett Finlay, B.** (2007). Defensins in the immunology of bacterial infections. *CURRENT OPINION IN IMMUNOLOGY* **19**, 385–391.
- Messier, S., Higgins, R., Couture, Y., Morin, M.** (1984). Comparison of swabbing and biopsy for studying the flora of the bovine uterus. *THE CANADIAN VETERINARY JOURNAL* **25**, 283–288.
- Mogensen, T. H.** (2009). Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS* **22**, 240-73.
- Morita, I.** (2002). Distinct functions of COX-1 and COX-2. *PROSTAGLANDINS & OTHER LIPID MEDIATORS* **68-69**, 165–175.
- Morita, I., Schindler, M., Regier, M. K., Otto, J. C., Hori, T., DeWitt, D. L., Smith, W. L.** (1995). Different intracellular locations for prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and -2. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* **270**, 10902–10908.
- Mortier, A., van Damme, J., Proost, P.** (2008). Regulation of chemokine activity by posttranslational modification. *PHARMACOLOGY & THERAPEUTICS* **120**, 197–217.
- Murphy, K. M; Travers, P; Walport, M. (Hrsg.)** (2009). Janeway Immunologie. (Springer: Berlin, Heidelberg)
- Narumiya, S., Sugimoto, Y., Ushikubi, F.** (1999). Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *PHYSIOLOGICAL REVIEWS* **79**, 1193–1226.

- Nasu, K., Fujisawa, K., Arima, K., Kai, K., Sugano, T., Miyakawa, I.** (2001). Expression and regulation of growth-regulated oncogene alpha in human endometrial stromal cells. *MOLECULAR HUMAN REPRODUCTION* **7**, 741–746.
- Naugler, W. E., Karin, M.** (2008). The wolf in sheep's clothing: the role of interleukin-6 in immunity, inflammation and cancer. *TRENDS IN MOLECULAR MEDICINE* **14**, 109–119.
- Nieminen, T., Rintaluoma, N., Andersson, M., Taimisto, A.-M., Ali-Vehmas, T., Seppälä, A., Priha, O., Salkinoja-Salonen, M.** (2007). Toxinogenic *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* from mastitic milk. *VETERINARY MICROBIOLOGY* **124**, 329–339.
- Niiron, H., Otsuka, T., Izuhara, K., Yamaoka, K., Ohshima, K., Tanabe, T., Hara, S., Nemoto, Y., Tanaka, Y., Nakashima, H., Niho, Y.** (1997). Regulation by interleukin-10 and interleukin-4 of cyclooxygenase-2 expression in human neutrophils. *BLOOD* **89**, 1621–1628.
- Noakes, D. E., Till, D., Smith, G. R.** (1989). Bovine uterine flora post partum: a comparison of swabbing and biopsy. *THE VETERINARY RECORD* **124**, 563–564.
- Noakes, D. E., Wallace, L., Smith, G. R.** (1991). Bacterial flora of the uterus of cows after calving on two hygienically contrasting farms. *THE VETERINARY RECORD* **128**, 440–442.
- Ogata, H., Sekikawa, A., Yamagishi, H., Ichikawa, K., Tomita, S., Imura, J., Ito, Y., Fujita, M., Tsubaki, M., Kato, H., Fujimori, T., Fukui, H.** (2010). GROalpha promotes invasion of colorectal cancer cells. *ONCOLOGY REPORTS* **24**, 1479–1486.
- Oliveira-Nascimento, L., Massari, P., Wetzler, L. M.** (2012). The Role of TLR2 in Infection and Immunity. *FRONTIERS IN IMMUNOLOGY* **3**, 79.
- Olson, J. D., Ball, L., Mortimer, R. G., Farin, P. W., Adney, W. S., Huffman, E. M.** (1984). Aspects of bacteriology and endocrinology of cows with pyometra and retained fetal membranes. *AMERICAN JOURNAL OF VETERINARY RESEARCH* **45**, 2251–2255.
- Opitz, B., Schröder, N. W., Spreitzer, I., Michelsen, K. S., Kirschning, C. J., Hallatschek, W., Zähringer, U., Hartung, T., Göbel, U. B., Schumann, R. R.** (2001). Toll-like receptor-2 mediates *Treponema glycolipid* and lipoteichoic acid-induced NF-kappaB translocation. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* **276**, 22041–22047.
- Osteen, K. G., Sierra-Rivera, E., Keller, N. R., Fox, D. B.** (1997). Interleukin-1 alpha opposes progesterone-mediated suppression of MMP-7. A possible role of this cytokine during human implantation. *ANNALS OF THE NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES* **828**, 137–145.

-
- Otero, C., Saavedra, L., Silva de Ruiz, C., Wilde, O., Holgado, A. R., Nader-Macias, M. E.** (2000). Vaginal bacterial microflora modifications during the growth of healthy cows. *LETTERS IN APPLIED MICROBIOLOGY* **31**, 251–254.
- Otero, C., Silva de Ruiz, C., Ibañez, R., Wilde, O. R., Ruiz Holgado, A. A. P. de, Nader-Macias, M. E.** (1999). Lactobacilli and enterococci isolated from the bovine vagina during the estrous cycle. *ANAEROBE* **5**, 305–307.
- Otero, M. C., Morelli, L., Nader-Macías, M. E.** (2006). Probiotic properties of vaginal lactic acid bacteria to prevent metritis in cattle. *LETTERS IN APPLIED MICROBIOLOGY* **43**, 91–97.
- Otero, M. C., Nader-Macias, M. E.** (2006). Inhibition of *Staphylococcus aureus* by H₂O₂-producing *Lactobacillus gasseri* isolated from the vaginal tract of cattle. *ANIMAL REPRODUCTION SCIENCE* **96**, 35–46.
- Ozinsky, A., Underhill, D. M., Fontenot, J. D., Hajjar, A. M., Smith, K. D., Wilson, C. B., Schroeder, L., Aderem, A.** (2000). The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA* **97**, 13766–13771.
- Parent, J., Villeneuve, C., Fortier, M. A.** (2003). Evaluation of the contribution of cyclooxygenase 1 and cyclooxygenase 2 to the production of PGE₂ and PGF₂ alpha in epithelial cells from bovine endometrium. *REPRODUCTION (CAMBRIDGE, ENGLAND)* **126**, 539–547.
- Peter, S., Gärtner, M. A., Michel, G., Ibrahim, M., Klopffleisch, R., Lübke-Becker, A., Jung, M., Einspanier, R., Gabler, C.** (2018). Influence of intrauterine administration of *Lactobacillus buchneri* on reproductive performance and pro-inflammatory endometrial mRNA expression of cows with subclinical endometritis. *SCIENTIFIC REPORTS* **8**, 5473.
- Peter, S., Michel, G., Hahn, A., Ibrahim, M., Lubke-Becker, A., Jung, M., Einspanier, R., Gabler, C.** (2015). Puerperal influence of bovine uterine health status on the mRNA expression of pro-inflammatory factors. *JOURNAL OF PHYSIOLOGY AND PHARMACOLOGY AN OFFICIAL JOURNAL OF THE POLISH PHYSIOLOGICAL SOCIETY* **66**, 449–462.
- Petit, T., Spergser, J., Rosengarten, R., Aurich, J.** (2009). Prevalence of potentially pathogenic bacteria as genital pathogens in dairy cattle. *REPRODUCTION IN DOMESTIC ANIMALS* **44**, 88–91.
- Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M. Y., van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., Freudenberg, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Layton, B.,**
-

- Beutler, B.** (1998). Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *SCIENCE (NEW YORK, N.Y.)* **282**, 2085–2088.
- Potter, T. J., Guitian, J., Fishwick, J., Gordon, P. J., Sheldon, I. M.** (2010). Risk factors for clinical endometritis in postpartum dairy cattle. *THERIOGENOLOGY* **74**, 127–134.
- Pretto, C. M., Gaide Chevronnay, H. P., Cornet, P. B., Galant, C., Delvaux, D., Courtoy, P. J., Marbaix, E., Henriet, P.** (2008). Production of interleukin-1alpha by human endometrial stromal cells is triggered during menses and dysfunctional bleeding and is induced in culture by epithelial interleukin-1alpha released upon ovarian steroids withdrawal. *THE JOURNAL OF CLINICAL ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM* **93**, 4126–4134.
- Prunner, I., Wagener, K., Pothmann, H., Ehling-Schulz, M., Drillich, M.** (2014). Risk factors for uterine diseases on small- and medium-sized dairy farms determined by clinical, bacteriological, and cytological examinations. *THERIOGENOLOGY* **82**, 857–865.
- Rafii, F., Williams, A. J., Park, M., Sims, L. M., Heinze, T. M., Cerniglia, C. E., Sutherland, J. B.** (2009). Isolation of bacterial strains from bovine fecal microflora capable of degradation of ceftiofur. *VETERINARY MICROBIOLOGY* **139**, 89–96.
- Rath, T., Billmeier, U., Waldner, M. J., Atreya, R., Neurath, M. F.** (2015). From physiology to disease and targeted therapy: interleukin-6 in inflammation and inflammation-associated carcinogenesis. *ARCHIVES OF TOXICOLOGY* **89**, 541–554.
- Rot, A., Andrian, U. H. von** (2004). Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokines grammar for immune cells. *ANNUAL REVIEW OF IMMUNOLOGY* **22**, 891–928.
- Ruder, C. A., Sasser, R. G., Williams, R. J., Ely, J. K., Bull, R. C., Butler, J. E.** (1981). Uterine infections in the postpartum cow: II. Possible synergistic effect of *Fusobacterium necrophorum* and *Corynebacterium pyogenes*. *THERIOGENOLOGY* **15**, 573–580.
- Salveti, E., Torriani, S., Felis, G. E.** (2012). The Genus *Lactobacillus*: A Taxonomic Update. *PROBIOTICS AND ANTIMICROBIAL PROTEINS* **4**, 217–226.
- Santos, T. M., Caixeta, L. S., Machado, V. S., Rauf, A. K., Gilbert, R. O., Bicalho, R. C.** (2010). Antimicrobial resistance and presence of virulence factor genes in *Arcanobacterium pyogenes* isolated from the uterus of postpartum dairy cows. *VETERINARY MICROBIOLOGY* **145**, 84–89.
- Santos, T. M., Gilbert, R. O., Bicalho, R. C.** (2011). Metagenomic analysis of the uterine bacterial microbiota in healthy and metritic postpartum dairy cows. *JOURNAL OF DAIRY SCIENCE* **94**, 291–302.

- Schnorr, B; Kressin, M.** (2011). Embryologie der Haustiere. 6. Aufl. (Enke: Stuttgart)
- Schwandner, R., Dziarski, R., Wesche, H., Rothe, M., Kirschning, C. J.** (1999). Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* **274**, 17406–17409.
- Sens, A., Heuwieser, W.** (2013). Presence of *Escherichia coli*, *Trueperella pyogenes*, α -hemolytic streptococci, and coagulase-negative staphylococci and prevalence of subclinical endometritis. *JOURNAL OF DAIRY SCIENCE* **96**, 6347–6354.
- Sheldon, I. M.** (2004). The postpartum uterus. *THE VETERINARY CLINICS OF NORTH AMERICA* **20**, 569–591.
- Sheldon, I. M., Cronin, J., Goetze, L., Donofrio, G., Schuberth, H.-J.** (2009a). Defining postpartum uterine disease and the mechanisms of infection and immunity in the female reproductive tract in cattle. *BIOLOGY OF REPRODUCTION* **81**, 1025–1032.
- Sheldon, I. M., Cronin, J. G., Healey, G. D., Gabler, C., Heuwieser, W., Streyll, D., Bromfield, J., Miyamoto, A., Fergani, C., Dobson, H.** (2014). Innate immunity and inflammation of the bovine female reproductive tract in health and disease. *REPRODUCTION (CAMBRIDGE, ENGLAND)* **148**, R41–R51.
- Sheldon, I. M., Dobson, H.** (2004). Postpartum uterine health in cattle. *ANIMAL REPRODUCTION SCIENCE* **82-83**, 295–306.
- Sheldon, I. M., Lewis, G. S., LeBlanc, S., Gilbert, R. O.** (2006). Defining postpartum uterine disease in cattle. *THERIOGENOLOGY* **65**, 1516–1530.
- Sheldon, I. M., Noakes, D. E., Rycroft, A. N., Pfeiffer, D. U., Dobson, H.** (2002). Influence of uterine bacterial contamination after parturition on ovarian dominant follicle selection and follicle growth and function in cattle. *REPRODUCTION (CAMBRIDGE, ENGLAND)* **123**, 837–845.
- Sheldon, I. M., Owens, S.-E., Turner, M. L.** (2017). Innate immunity and the sensing of infection, damage and danger in the female genital tract. *JOURNAL OF REPRODUCTIVE IMMUNOLOGY* **119**, 67–73.
- Sheldon, I. M., Price, S. B., Cronin, J., Gilbert, R. O., Gadsby, J. E.** (2009b). Mechanisms of infertility associated with clinical and subclinical endometritis in high producing dairy cattle. *REPRODUCTION IN DOMESTIC ANIMALS = ZUCHTHYGIENE* **44 Suppl 3**, 1–9.
- Sheldon, I. M., Roberts, M. H.** (2010). Toll-like receptor 4 mediates the response of epithelial and stromal cells to lipopolysaccharide in the endometrium. *PLOS ONE* **5**, e12906.

- Sheldon, I. M., Williams, E. J., Miller, A. N. A., Nash, D. M., Herath, S.** (2008). Uterine diseases in cattle after parturition. *VETERINARY JOURNAL (LONDON, ENGLAND 1997)* **176**, 115–121.
- Siegenthaler, W; Blum, H. E.** (2013). *Klinische Pathophysiologie*. (Thieme: Stuttgart)
- Skarin, A., Sylwan, J.** (1986). Vaginal lactobacilli inhibiting growth of *Gardnerella vaginalis*, *Mobiluncus* and other bacterial species cultured from vaginal content of women with bacterial vaginosis. *ACTA PATHOLOGICA, MICROBIOLOGICA, ET IMMUNOLOGICA SCANDINAVICA. SECTION B, MICROBIOLOGY* **94**, 399–403.
- Smith, B. I., Donovan, G. A., Risco, C., Littell, R., Young, C., Stanker, L. H., Elliott, J.** (1998). Comparison of various antibiotic treatments for cows diagnosed with toxic puerperal metritis. *JOURNAL OF DAIRY SCIENCE* **81**, 1555–1562.
- Snick van, J.** (1990). Interleukin-6: An Overview. *ANNUAL REVIEW OF IMMUNOLOGY* **8**, 253–278.
- Streyll, D., Kenngott, R., Herbach, N., Wanke, R., Blum, H., Sinowatz, F., Wolf, E., Zerbe, H., Bauersachs, S.** (2012). Gene expression profiling of bovine peripartal placentomes: detection of molecular pathways potentially involved in the release of foetal membranes. *REPRODUCTION (CAMBRIDGE, ENGLAND)* **143**, 85–105.
- Strieter, R. M., Polverini, P. J., Arenberg, D. A., Walz, A., Opdenakker, G., van Damme, J., Kunkel, S. L.** (1995). Role of C-X-C chemokines as regulators of angiogenesis in lung cancer. *JOURNAL OF LEUKOCYTE BIOLOGY* **57**, 752–762.
- Sugimoto, Y., Inazumi, T., Tsuchiya, S.** (2015). Roles of prostaglandin receptors in female reproduction. *JOURNAL OF BIOCHEMISTRY* **157**, 73–80.
- Szóstek, A. Z., Lukasik, K., Galvão, A. M., Ferreira-Dias, G. M., Skarzynski, D. J.** (2013). Impairment of the interleukin system in equine endometrium during the course of endometrosis. *BIOLOGY OF REPRODUCTION* **89**, 79.
- Takatsu, K., Acosta, T. J.** (2015). Expression of heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) in bovine endometrium: Effects of HB-EGF and interferon-tau on prostaglandin production. *REPRODUCTION IN DOMESTIC ANIMALS = ZUCHTHYGIENE* **50**, 458–464.
- Takeuchi, O., Kawai, T., Muhlradt, P. F., Morr, M., Radolf, J. D., Zychlinsky, A., Takeda, K., Akira, S.** (2001). Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *INTERNATIONAL IMMUNOLOGY* **13**, 933–940.
- Tanikawa, M., Acosta, T. J., Fukui, T., Murakami, S., Korzekwa, A., Skarzynski, D. J., Piotrowska, K. K., Park, C. K., Okuda, K.** (2005). Regulation of prostaglandin synthesis

- by interleukin-1alpha in bovine endometrium during the estrous cycle. *PROSTAGLANDINS & OTHER LIPID MEDIATORS* **78**, 279–290.
- Tarner, I. H., Muller-Ladner, U., Gay, S.** (2007). Emerging targets of biologic therapies for rheumatoid arthritis. *NATURE CLINICAL PRACTICE. RHEUMATOLOGY* **3**, 336–345.
- Tsuboi, K., Sugimoto, Y., Ichikawa, A.** (2002). Prostanoid receptor subtypes. *PROSTAGLANDINS & OTHER LIPID MEDIATORS* **68-69**, 535–556.
- Turner, M. L., Cronin, J. G., Healey, G. D., Sheldon, I. M.** (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.
- Vandercappellen, J., van Damme, J., Struyf, S.** (2008). The role of CXC chemokines and their receptors in cancer. *CANCER LETTERS* **267**, 226–244.
- Vieira-Neto, A., Gilbert, R. O., Butler, W. R., Santos, J. E. P., Ribeiro, E. S., Vercouteren, M. M., Bruno, R. G., Bittar, J. H. J., Galvão, K. N.** (2014). Individual and combined effects of anovulation and cytological endometritis on the reproductive performance of dairy cows. *JOURNAL OF DAIRY SCIENCE* **97**, 5415–5425.
- Wagener, K., Gabler, C., Drillich, M.** (2017). A review of the ongoing discussion about definition, diagnosis and pathomechanism of subclinical endometritis in dairy cows. *THERIOGENOLOGY* **94**, 21–30.
- Wagener, K., Prunner, I., Pothmann, H., Drillich, M., Ehling-Schulz, M.** (2015). Diversity and health status specific fluctuations of intrauterine microbial communities in postpartum dairy cows. *VETERINARY MICROBIOLOGY* **175**, 286–293.
- Wagner, R. D., Johnson, S. J.** (2012). Probiotic *Lactobacillus* and estrogen effects on vaginal epithelial gene expression responses to *Candida albicans*. *JOURNAL OF BIOMEDICAL SCIENCE* **19**, 58.
- Walsh, S. W., Williams, E. J., Evans, A. C. O.** (2011). A review of the causes of poor fertility in high milk producing dairy cows. *ANIMAL REPRODUCTION SCIENCE* **123**, 127–138.
- Walz, A., Meloni, F., Clark-Lewis, I., Tschärner, V. von, Baggiolini, M.** (1991). [Ca²⁺]_i changes and respiratory burst in human neutrophils and monocytes induced by NAP-1/interleukin-8, NAP-2, and gro/MGSA. *JOURNAL OF LEUKOCYTE BIOLOGY* **50**, 279–286.
- Werner, A., Suthar, V., Plontzke, J., Heuwieser, W.** (2012). Relationship between bacteriological findings in the second and fourth week postpartum and uterine infection in

- dairy cows considering bacteriological results. *JOURNAL OF DAIRY SCIENCE* **95**, 7105–7114.
- Williams, B. L., Senger, P. L., Stephens, L. R., Ward, A. C.** (1988). Relationships between days post partum, observed estrus and uterine microflora in commercial dairy cows. *THERIOGENOLOGY* **30**, 555–561.
- Williams, C. S., Dubois, R. N.** (1996). Prostaglandin endoperoxide synthase: why two isoforms? *THE AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY* **270**, 400.
- Williams, E. J., Fischer, D. P., Noakes, D. E., England, G. C. W., Rycroft, A., Dobson, H., Sheldon, I. M.** (2007). The relationship between uterine pathogen growth density and ovarian function in the postpartum dairy cow. *THERIOGENOLOGY* **68**, 549–559.
- Williams, E. J., Fischer, D. P., Pfeiffer, D. U., England, G. C. W., Noakes, D. E., Dobson, H., Sheldon, I. M.** (2005). Clinical evaluation of postpartum vaginal mucus reflects uterine bacterial infection and the immune response in cattle. *THERIOGENOLOGY* **63**, 102–117.
- Zarembek, K. A., Godowski, P. J.** (2002). Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. *JOURNAL OF IMMUNOLOGY (BALTIMORE, MD. 1950)* **168**, 554–561.
- Zerbe, H., Ossadnik, C., Leibold, W., Schuberth, H. J.** (2001). Influence of *Escherichia coli* and *Arcanobacterium pyogenes* isolated from bovine puerperal uteri on phenotypic and functional properties of neutrophils. *VETERINARY MICROBIOLOGY* **79**, 351–365.
- Zerbe, H., Schuberth, H.-J., Engelke, F., Frank, J., Klug, E., Leibold, W.** (2003). Development and comparison of in vivo and in vitro models for endometritis in cows and mares. *THERIOGENOLOGY* **60**, 209–223.
- Zlotnik, A., Yoshie, O.** (2000). Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *IMMUNITY* **12**, 121–127.

8 Publikationsverzeichnis

Zeitschriftenartikel

- Peter S., **Gärtner M. A.**, Michel G., Ibrahim M., Klopffleisch R., Lübke-Becker A., Jung M., Einspanier R., Gabler C. Influence of intrauterine administration of *Lactobacillus buchneri* on reproductive performance and pro-inflammatory endometrial mRNA expression of cows with subclinical endometritis. *Sci Rep.* 2018 Apr 3;8(1):5473. doi: 10.1038/s41598-018-22856-y
- Danesh Mesgaran S., **Gärtner M. A.**, Wagener K., Drillich M., Ehling-Schulz M., Einspanier R., Gabler C. Different inflammatory responses of bovine oviductal epithelial cells *in vitro* to bacterial species with distinct pathogenicity characteristics and passage number. *Theriogenology* 2018 Jan 15;106:237-246. doi: 10.1016/j.theriogenology.2017.10.005. Epub 2017 Oct 5.
- Ibrahim M., Peter S., **Gärtner M. A.**, Michel G., Jung M., Einspanier R., Gabler C. Increased mRNA expression of selected antimicrobial peptides around ovulation and during inflammatory processes in the bovine endometrium postpartum. *Theriogenology* 2016 Nov;86(8):2040-53. doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.06.022. Epub 2016 Jul 5.
- **Gärtner M. A.**, Peter S., Jung M., Drillich M., Einspanier R., Gabler C. Increased mRNA expression of selected pro-inflammatory factors in inflamed bovine endometrium *in vivo* as well as in endometrial epithelial cells exposed to *Bacillus pumilus in vitro*. *Reprod Fertil Dev* 2016 Jun;28(7):982-994. doi: 10.1071/RD14219
- **Gärtner M. A.**, Bondzio A., Braun N., Jung M., Einspanier R., Gabler C. Detection and characterisation of *Lactobacillus* spp. in the bovine uterus and their influence on bovine endometrial epithelial cells *in vitro*. *PLoS One* 2015 Mar 24;10(3):e0119793. doi:10.1371/journal.pone.0119793

Tagungsvorträge und -poster

- **Bittel M.**, Wagener K., Drillich M., Ehling-Schulz M., Einspanier R., Gabler C. *T. pyogenes* influences the expression patterns of pro-inflammatory factors in bovine endometrial epithelial cells *in vitro*. 46. Jahrestagung Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung, Danzig 2013
- **Bittel M.**, Scheibe N., Drillich M., Heuwieser W., Jung M., Einspanier R., Gabler C. Pathogenic bacteria influence mRNA expression patterns of pro-inflammatory factors in the bovine endometrium. 16th Annual Conference of the European Society for Domestic Animal Reproduction (ESDAR), Dublin 2012
- **Bittel, M.**; Scheibe, N.; Jung, M.; Einspanier, R.; Gabler, C. mRNA expression pattern of selected interleukins in bovine endometrial cells in the presence of Lactobacilli spp. 7. Doktorandensymposium & DRS Präsentationsseminar Biomedical Sciences am FB Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin, Berlin 2012
- **Bittel, M.**; Scheibe, N.; Reppel, C.; Jung, M.; Einspanier, R.; Gabler, C. Lactobacilli influence the expression patterns of pro-inflammatory factors in bovine endometrial epithelial cells. 45. Jahrestagung Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung, Berlin 2012
- **Bittel M.**, Haase K., Scheibe N., Reppel C., Jung M., Einspanier R., Gabler C. Detection and evaluation of lactobacillus spp. in the bovine uterus. 15th Annual Conference of the European Society for Domestic Animal Reproduction (ESDAR), Antalya 2011
- **Bittel M.**, Scheibe N., Reppel C., Jung M., Einspanier R., Gabler C. Isolation of culturable commensal bacteria from the bovine uterus to examine their influence on endometrial cells. 44. Jahrestagung Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung, Hannover 2011
- **Bittel, M.**; Scheibe, N.; Reppel, C.; Jung, M.; Einspanier, R.; Gabler, C. Untersuchung des Einflusses von isolierten, kommensalen Bakterien aus dem bovinen Uterus auf Endometriumszellen *in vitro*. 6. Doktorandensymposium und DRS Präsentationsseminar Biomedical Sciences am FB Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin, Berlin 2011

9 Danksagung

Meinen tiefsten Dank möchte ich PD Dr. Christoph Gabler für die gute Betreuung, die wissenschaftlichen Anregungen, die konstruktiven Diskussionen und Ideen sowie für die Geduld während der gesamten Zeit aussprechen.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei Univ.-Prof. Dr. Dr. Ralf Einspanier für die Ermöglichung meiner Projekte im Institut für Veterinär-Biochemie.

Meinen herzlichen Dank an Dr. Markus Jung und an das Team des Instituts für Fortpflanzung landwirtschaftlicher Nutztiere Schönow e.V. für die gute und konstruktive Kooperation.

Des Weiteren möchte ich mich für die großartige technische Unterstützung und für die große Hilfe bei den vielen Schlachthoffahrten bei Christoph Holder bedanken.

Bei Hannah, Anne, Nicole, Katrin, Katja, Sarah, Anke, Mohammad und allen übrigen MitarbeiterInnen des Instituts für Veterinär-Biochemie bedanke ich mich ganz besonders für die schöne Zeit, die tolle Atmosphäre im Labor, die Hilfsbereitschaft sowie für die fachliche und moralische Unterstützung, die sie mir jederzeit zukommen ließen.

Vielen Dank an die Schlachtbetrieb GmbH Perleberg für die Zusammenarbeit.

Bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft möchte ich mich für die finanzielle Unterstützung des Projekts bedanken.

Ganz besonders bedanke ich mich bei meinen Eltern, meinem Bruder und meinem Ehemann für Rückhalt, Kraft und Ermutigung.

10 Finanzierungsquellen

Die Arbeiten wurden finanziell unterstützt durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG; GA 1077/5-1).

11 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe.

Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

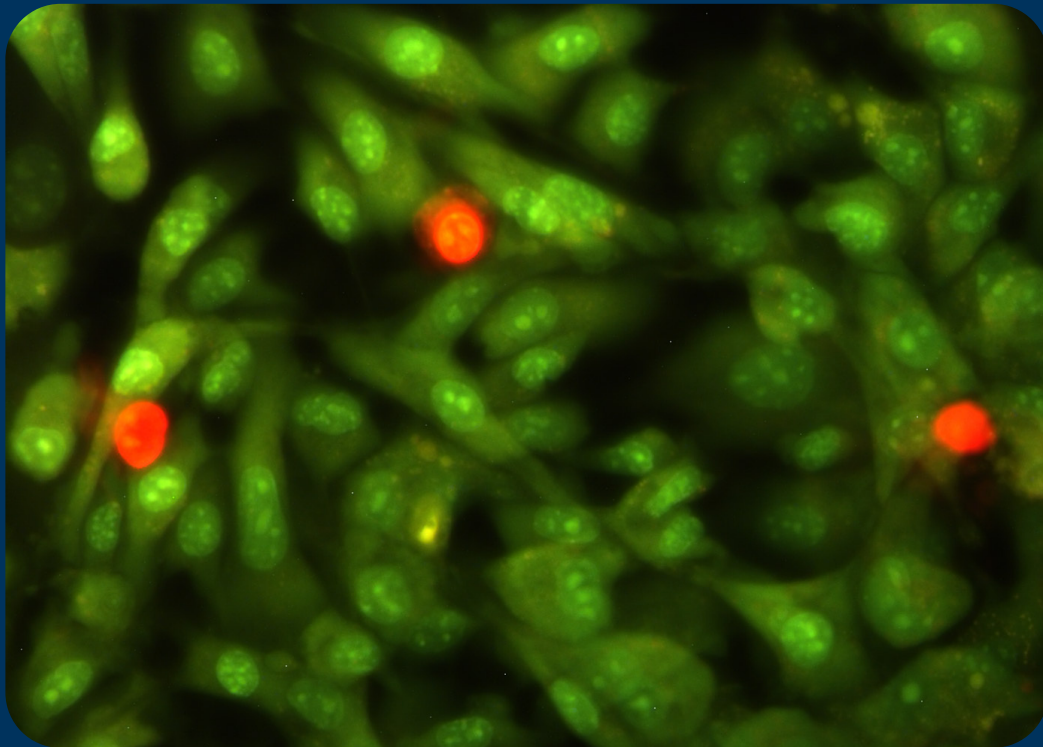
Berlin, 19.12.2019

Martina Gärtner

Darstellung des Anteils der Doktorandin an den dargelegten Publikationen

Anteil	Publikation Nr. 1	Publikation Nr. 2
Studiendesign	> 60 %	> 70 %
Datensammlung	> 90 %	> 90 %
Datenanalyse	> 90 %	> 90 %
Schreiben des Manuskripts	> 85 %	> 85 %
Überarbeiten des Manuskripts	> 70 %	> 70 %

ISBN: 978-3-86345-550-7



Verlag der DVG Service GmbH
Friedrichstraße 17 • 35392 Gießen
Tel.: 0641 / 24466 • Fax: 0641 / 25375
E-Mail: info@dvg.de • Web: www.dvg.de