

mRNA Nachweis immunrelevanter Faktoren im Eutergewebe von Milchkühen während einer *E. Coli* Endotoxin induzierten Mastitis

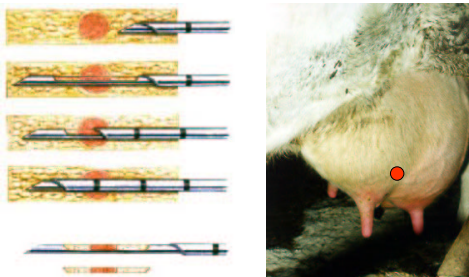
Michael W. Pfaffl, Susanne Schmitz & Rupert M. Bruckmaier

Ziel der Arbeit

E. Coli Endotoxin simuliert eine infektiöse Euterentzündung. Es kommt zu einer Immunreaktion. Immunrelevante Faktoren wurden in der akuten Phase nach Endotoxin-Gabe auf mRNA-Ebene quantifiziert.

Tiermodell und Gewebeentnahme mittels Biopsie

Ein Euterviertel wurde mit *E. coli* Endotoxin (**rote Linie**) und das kontra-laterale Viertel mit NaCl (Kontrolle, **grüne Linie**) behandelt. In der akuten Phase wurden alle 3 Stunden Biopsieproben entnommen. Die geringen Probenmenge (ca. 20 mg) erfordern hoch sensitive mRNA Messmethoden.



Biopsien aus dem Euter

Methode der mRNA-Analyse

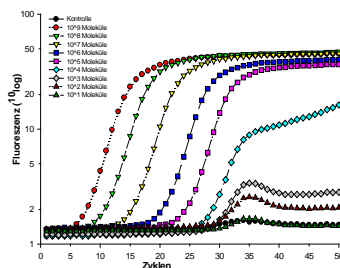
DNA (Genom) -> mRNA (Transkriptom) -> Protein (Proteom)

mRNA-Konzentration erlaubt Rückschlüsse auf Syntheseort und -intensität eines bestimmten Proteins.

Real-time RT-PCR (Reverse Transkription - Polymerase-Kettenreaktion)

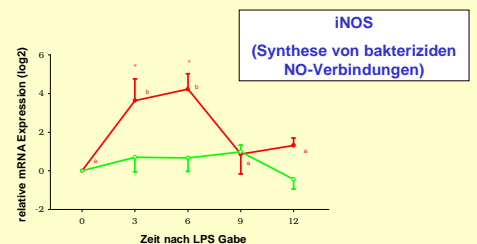
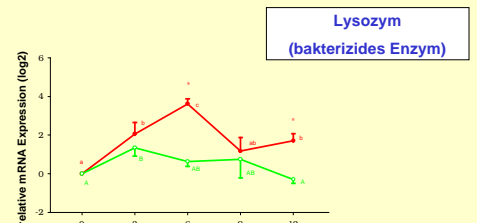
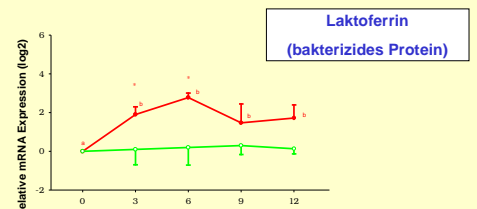
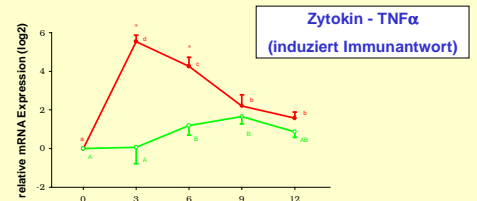
Durch RT-PCR wird ein bestimmter mRNA-Abschnitt vielfach amplifiziert.

Durch spezielle real-time RT-PCR (LightCycler, Roche Diagnostics) ist dies besonders sensitiv und vor allem quantitativ möglich. Schon kleinste Probenmengen, wie z.B. aus Biopsiematerial, sind ausreichend für den Nachweis mehrerer Faktoren auf mRNA Ebene.



Real-time RT-PCR im LightCycler

mRNA Expression im Eutergewebe



Ergebnisse

Als einer der ersten Faktoren reagiert bereits innerhalb 3 Stunden das Zytokin TNFα auf das Endotoxin und bewirkt unter anderem einen massiven Influx von somatische Zellen (SSC) vom Blut in die Milch.

Nach 3 bis 6 Stunden wurden auch erhöhte Konzentrationen von Laktoferrin, Lysozym und iNOS nachgewiesen, die alle bakterizide Wirkungen im Euter besitzen.