

6. ZUSAMMENFASSUNG

Um den Einfluß von Zink auf die Immunglobulinproduktion beim Rind zu prüfen, wurden Untersuchungen *in vitro* und *in vivo* durchgeführt.

In vitro wurden bovine mononukleäre Blutzellen (boPBMC) als kooperatives Zellsystem durch Mitogene, insbesondere durch Pokeweed Mitogen (PWM) oder durch das Zytokin Interleukin 2 (rIL-2), aktiviert und so zur Proliferation und Immunglobulinproduktion angeregt. Vergleichend wurden als autonome Einzelzellsysteme etablierte Linien unterschiedlicher Zellarten eingesetzt. Geprüft wurden je eine spontan proliferierende T-Zell-, B-Zell-, monozytoide und Hybridomzelllinie. Letztere produzierte unter geeigneten Kulturbedingungen gut nachweisbare Mengen eines monoklonalen Antikörpers.

Als funktionelle Leistungsparameter der Zellen wurden quantitativ erfaßt:

- ihr Aktivierungsgrad anhand ihrer mitochondrialen Dehydrogenasen mittels einer Substratoxidationsmethode (MTT-Test);
- ihr Proliferationsverhalten anhand der DNA-Synthese mittels ^3H -Thymidineinbau (^3H -TdR);
- ihre Immunglobulinproduktion mittels eines isotypspezifischen ELISA-Verfahrens.

Die Wirkung von Zink und anderen divalenten Kationen auf diese Zellen wurde in folgenden Ansätzen geprüft:

- durch Zugabe von Salzen folgender Kationen zu den Zellkulturansätzen: Ca^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} oder Zn^{2+} ;
- durch Depletion des Zellkulturmediums von divalenten Kationen mit Hilfe des löslichen oder Sepharose-gebundenen Chelators EDTA;
- durch kontrollierte Supplementierung der EDTA-behandelten Zellkulturansätze mit Zink und den anderen Kationen sowohl einzeln als auch in Kombinationen.

In vivo wurden Rinder mit erblicher Zinkmalabsorption (homozygote Träger des autosomal rezessiven Letalfaktors A46) durch Reduktion oder Absetzen der täglichen oralen Zinksupplementierung in zwei Phasen von je 20 Tagen in einen kontrollierten Zinkmangel versetzt. In der Phase I wurde eine primäre spezifische Antikörperantwort gegen ein definiertes Hapten (Fluoreszeinisothiozyanat, FITC) induziert und in der Phase II nach einer Wiederholungsimpfung die sekundäre Antikörperantwort gegen dieses Hapten geprüft. Die Untersuchungen zum Einfluß des Zinkmangels *in vivo* wurden sowohl bei den spezifischen Antikörpern (IgG₁, IgG₂, IgM und Ig-L-Ketten) als auch bei dem Gesamtimmunglobulingehalt im Serum auf unterschiedliche Immunglobulinisotypen (IgG₁, IgG₂, IgA und IgM) ausgedehnt.

Es wurden folgende wesentlichen Ergebnisse erzielt:

In vitro erwies sich Zink als das dominierende Element, da es als einziges der hier geprüften Kationen in der Lage war, die untersuchten Immunfunktionen direkt und vollständig zu rekonstituieren. Dazu reichten schon sehr geringe Mengen an bioverfügbarem Zink aus.

Im kooperativen Zellsystem der PWM- oder rIL-2-stimulierten boPBMC wird die Immunglobulinproduktion durch Zinkmangel stärker gehemmt als die Aktivierung der Zellen. Dagegen werden im Einzelzellsystem beide Funktionen etwa gleichermaßen gemindert. Zinkmangel beeinflußt verschiedene Zellen unterschiedlich stark. Dies beruht

möglicherweise auf einer unterschiedlichen Ausstattung der Zellen mit zinkabhängigen Enzymen. In kooperativen Zellsystemen kann Zink wahrscheinlich durch Verstärkung des zweiten Signals (erhöhte Zytokinproduktion) als Kostimulator, jedoch nicht als Mitogen wirken. Dadurch trägt eine optimale Zinkversorgung zur Optimierung oder Verstärkung der Funktion von Immunzellen bei. Bei einer durch Zinkmangel bedingten Hemmung der hier untersuchten Immunfunktionen steht nicht ein IL-2-Mangel sondern andere zinkabhängige Mechanismen im Vordergrund.

In vivo läßt sich auch bei Rindern mit deutlich erniedrigtem Zinkserumspiegel eine vollwertige spezifische Immunantwort gegen ein definiertes Hapten induzieren (Primärantwort) und wiederholen (Sekundärantwort). Weder der Gesamtgehalt an Serumimmunglobulinen noch das individuelle Verhältnis der Immunglobulinisotypen zueinander wird durch diese Form des Zinkmangels verändert. Selbst bei dreiwöchigem Zinkmangel mit deutlich erniedrigtem Zinkserumspiegel bleibt der intrazelluläre Zinkgehalt von Erythrozyten und Leukozyten im physiologischen Bereich. Demnach läßt sich in vivo nur sehr schwer ein so niedriger Zinkgehalt im Serum und in den Zellen erreichen, daß es zu einer nachweisbaren Minderung der Immunglobulinproduktion in vivo kommt.

7. SUMMARY

In vitro and in vivo studies were performed in order to evaluate the influence of zinc on immunoglobulin production in cattle:

In vitro bovine peripheral blood mononuclear cells (boPBMC) provided a cooperative cell system. Activation by mitogens, in particular by pokeweed mitogen (PWM) or by the cytokine interleukin 2 (rIL-2), resulted in proliferation and immunoglobulin production of the cells. For comparison established lines were studied as autonomously proliferating single cell systems. These included a T-, a B-, a monocytic and a hybridoma cell line. The latter produced monoclonal antibodies.

Quantitation of cellular parameters comprised:

- The activation by means of their mitochondrial dehydrogenases employing a coloring substrate oxidation method (MTT-Test);
- The proliferation by means of their DNA-synthesis as monitored by incorporation of ^3H -thymidine (^3H -TdR);
- The immunoglobulin production. It was monitored in cell culture supernates or sera by an isotype specific enzyme linked immunosorbent assay (ELISA).

The influence of zinc and other divalent cations on cellular functions were tested by different setups:

- By the addition of various cations to cellular systems. These included Ca^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} or Zn^{2+} ;
- By the depletion of divalent cations from cell culture medium using the chelator EDTA in soluble or Sepharose coupled form;
- By controlled supplementation of EDTA-treated cell culture with zinc or the other cations singly or in combination.

In vivo influence of zinc deficiency was studied in cattle with inherited zinc malabsorption carrying the autosomal recessive lethal factor A46 homozygously. They were exposed to 2 periods of controlled zinc deficiency for 20 days, each, by reducing or stopping their daily oral zinc supplementation. During the first phase of zinc deficiency a primary antibody response was induced against a defined hapten (Fluoresceinisothiocyanat, FITC). During the second phase, the haptenspecific booster reaction was tested. The in vivo monitoring included quantitation of different immunoglobulin isotypes (IgG_1 , IgG_2 , IgM and L-chains) of the specific antibodies as well as of those (IgG_1 , IgG_2 , IgA and IgM) of the total immunoglobulin content in the serum.

The following major results were achieved:

In vitro zinc proved to be the dominating cation. None of the other cations tested had a comparable capacity of reconstituting the investigated immune function directly and as completely as zinc had. Minute amounts of bioavailable zinc were sufficient for full reconstitution of EDTA-abolished immune functions. In a cooperative cell system such as boPBMC PWM- or rIL-2 induced immunoglobulin production was stronger reduced by zinc deficiency than cell activation. In contrast both functional parameters were suppressed to similar extent in single cell systems by lack of zinc. Studying different cell lines revealed remarkable differences in susceptibility to zinc deficiency. This might be due to different equipments of cells with zinc dependent enzymes. In cooperative cell systems zinc exerted a strong capacity as costimulator, probably by enhancing the second

signal by means of increased cytokine production. However, no mitogen activity of zinc was seen. Thus, an optimal zinc supply may improve the functional activity of cells of the immune system. Reduced immune functions of cells during zinc deficiency are caused by other zinc dependent mechanisms than by a lack of IL-2.

In vivo cattle with reduced zincserumlevels are perfectly able to mount a normal specific antibody response to a defined hapten in primary as well as in booster reactions. Neither the immunoglobulin content nor the individual isotype ratios in the serum were altered by the zinc deficiencies studied.

Zinc deficiency for three weeks resulting in subphysiological reduced zincserumlevels was unable to reduce the intracellular zinc content in red cells or leukocytes below normal levels. Thus, it will be very difficult to lower the zinc concentration in serum and cells to an extent which will reduce the immunoglobulin production in vivo.