

Tierärztliche Hochschule Hannover

**Einfluss von konjugierten Linolsäuren (CLA) auf das bovine
Immunsystem**

**INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Veterinärmedizin
- Doctor medicinae veterinariae-
(Dr. med. vet.)**

**Vorgelegt von
Jamal Hussen
aus Syrien**

Hannover 2012

Wissenschaftliche Betreuung: Apl. Prof. Dr. med. vet. Hans-Joachim Schuberth
Arbeitsgruppe Immunologie
Tierärztliche Hochschule Hannover

1. Gutachter: Apl. Prof. Dr. med. vet. Hans-Joachim Schuberth

2. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. vet. Jürgen Rehage

Tag der mündlichen Prüfung: 23.11.2012

Gefördert im Rahmen des DFG-Projektes (SCHU 1108/4-1, PAK 286/1) sowie durch ein Stipendium von der Veterinärfakultät in Hama/Syrien

Meinen Eltern und meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

1	Einleitung und Zielsetzung.....	13
2	Literaturübersicht	15
2.1	Immunzellen im peripheren Blut des Rindes	15
2.1.1	Neutrophile Granulozyten.....	15
2.1.2	Monozyten	16
2.1.3	B-Zellen	16
2.1.4	$\alpha\beta$ -T-Zellen.....	17
2.1.5	$\gamma\delta$ -T-Zellen.....	18
2.2	Veränderungen des bovinen Immunsystems im peripartalen Zeitraum	18
2.2.1	Veränderungen in der Zellzusammensetzung des Blutes	18
2.2.2	Veränderungen der Phagozytosekapazität neutrophiler Granulozyten.....	19
2.2.3	Serum- und Milch-IgG-Gehalte im peripartalen Zeitraum.....	19
2.3	Immunpolarisierung beim Rind.....	20
2.4	Konjugierte Linolsäuren	20
2.4.1	Nomenklatur	21
2.4.2	Biosynthese und kommerzielle Herstellung	22
2.4.3	Physiologische Wirkung	23
2.5	Immunmodulation durch CLA-Isomere	24
2.5.1	Einfluss von CLA auf die Hämatopoiese.....	24
2.5.2	Einfluss von CLA auf Monozyten und Makrophagen.....	25
2.5.3	Einfluss von CLA auf funktionelle Kapazitäten von neutrophilen Granulozyten.....	26
2.5.4	Beeinflussung von Lymphozyten	27
2.5.5	Zytokinmodulation durch CLA.....	28
2.5.6	Die Rolle von CLA bei immunpathologischen Reaktionen	29
2.6	Wirkungsmechanismen der konjugierten Linolsäuren	30
2.6.1	Veränderungen der Membranzusammensetzung von Immunzellen.....	31
2.6.2	Einfluss von CLA auf das Eicosanoidsystem	33
2.6.3	Der nukleäre Transkriptionsfaktor PPAR γ	34
3	Geräte, Material und Methoden	39
3.1	Geräte	39
3.2	Material.....	40
3.2.1	Klinikbedarf	40
3.2.2	Laborbedarf.....	40
3.2.3	Reagenzien.....	41

3.2.4	Versuchstiere und Versuchsaufbau.....	43
3.2.5	Antikörper.....	46
3.2.6	Kulturmedien, Puffer und Lösungen.....	47
3.3	Methoden.....	52
3.3.1	Gewinnung von venösem Blut.....	52
3.3.2	Gewinnung von Serum und Milchserum.....	52
3.3.3	Zellseparation über Leukozytenseparationsmedium®.....	52
3.3.4	Erythrozytenlyse in Anwesenheit kernhaltiger Zellen.....	52
3.3.5	Gewinnung boviner mononukleärer Zellen aus dem Blut.....	52
3.3.6	Gewinnung boviner polymorphkerniger Granulozyten aus dem Blut.....	53
3.3.7	Durchflusszytometrie.....	53
3.3.8	Quantifizierung der Zahl vitaler Zellen mit Hilfe des Durchflusszytometers (Referenzzellmethode).....	53
3.3.9	Herstellung von Referenzzellen.....	54
3.3.10	Durchflusszytometrische Beurteilung der Zellvitalität.....	55
3.3.11	<i>Ex-vivo</i> -Bestimmung der Phagozytosekapazität neutrophiler Granulozyten des Blutes.....	57
3.3.12	Bestimmung von IgG-Isotypen (IgG1 und IgG2) mittels ELISA.....	59
3.3.13	<i>In-vitro</i> -Proliferationsmessung.....	61
3.3.14	Bestimmung der Apoptose mononukleärer Zellen des Blutes.....	61
3.3.15	Aufbereitung von mRNA aus bovinen Leukozyten für die quantitative PCR.....	64
3.3.16	Synthese von cDNA.....	65
3.3.17	Quantitative <i>real time</i> PCR (qrtPCR).....	66
3.3.18	Statistische Auswertung.....	70
4	Ergebnisse.....	72
4.1	Der Einfluss einer CLA-Supplementation im Futter auf die relative Zellzusammensetzung mononukleärer Zellen des Blutes.....	72
4.1.1	Eine CLA-Supplementierung zeigt keine Wirkung auf die prozentualen Anteile von Monozyten, B-Zellen oder T-Zellen.....	72
4.1.2	Eine CLA-Supplementierung beeinflusst die Subpopulationen unter den T-Zellen.....	73
4.2	Einfluss der CLA-Supplementierung auf die Phagozytosekapazität neutrophiler Granulozyten.....	75
4.3	Einfluss der CLA-Supplementierung auf die IgG-Konzentration im Blut- und Milchserum.....	78
4.3.1	Eine CLA-Supplementierung reduziert den Gehalt beider IgG-Isotypen im Blutserum.....	78
4.3.2	Eine CLA-Supplementierung reduziert die Konzentration an Milch-IgG1, jedoch nicht IgG2.....	80

4.4	Einfluss der CLA-Supplementierung auf die absolute Zellzusammensetzung des peripheren Blutes.....	82
4.5	Peripartale Veränderungen des Immunsystems bei Milchkühen	84
4.6	Einfluss von CLA-Isomeren auf die Stimulierbarkeit mononukleärer Zellen nach <i>In-vitro</i> -Stimulation	86
4.7	Einfluss der CLA-Isomere auf die T-Zellsubpopulationen nach <i>In-vitro</i> -Stimulation	89
4.8	Beeinflussung der CLA- und PGJ2-induzierten Hemmung der Blastogenese von bovinen MNC durch den PPAR γ -Antagonisten GW9662	90
4.9	Beeinflussung der Überlebensrate mononukleärer Zellen durch CLA nach <i>In vitro</i> -Stimulation	91
4.10	Die Wirkung von CLA auf die Genexpression verschiedener Zytokine sowie PPAR γ und PTX3 in Superantigen-stimulierten MNC.....	94
5	Diskussion	97
5.1	Einfluss einer langzeitigen Supplementation pansengeschützter CLA im Futter auf das Immunsystem von Milchkühen	97
5.1.1	Peri- und postpartale Veränderungen der Zellzusammensetzung im Blut der Milchkühen	98
5.1.2	Peri- und postpartale Veränderungen der Phagozytoseleistung neutrophiler Granulozyten.....	99
5.1.3	Peri- und postpartale Veränderungen der IgG-Isotypengehalte im Blut	100
5.1.4	Einfluss von CLA-Supplementierung auf die Zellzusammensetzung leukozytärer Zellen des peripheren Blutes.....	101
5.1.5	Einfluss von CLA-Supplementierung auf die Phagozytosekapazität neutrophiler Granulozyten im Blut.....	102
5.1.6	Einfluss von CLA-Supplementierung auf die IgG-Isotypengehalte in Blut- und Milchserum	103
5.2	CLA hat einen proliferationsmindernden Effekt auf mononukleäre Zellen <i>in vitro</i>	104
5.3	CLA hat einen vitalitätsmindernden Effekt auf Superantigen-stimulierte mononukleäre Zellen.....	106
5.4	CLA führt zur Herabregulation von Th1-, Th2- und Th17-Zytokinen <i>in vitro</i>	107
5.5	Die Rolle von PPAR γ bei CLA-vermittelte Effekte in bovinen Immunzellen	108
5.6	Ausblick.....	110
6	Zusammenfassung.....	112
7	Summary	114
8	Literaturverzeichnis.....	116
	Danksagung.....	144
	Erklärung.....	145

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Abb.	Abbildung
APC	Antigen presenting cell (Antigen-präsentierende Zelle)
<i>Aqua dest.</i>	Aqua destillata (destilliertes Wasser)
<i>Aqua tridest.</i>	Aqua tridestillata (dreifach destilliertes Wasser)
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
C3b	opsonisierendes Fragment der Komplementkomponente C3
CD	Cluster of Differentiation (Gruppenbezeichnung für Differenzierungsantigene)
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
IL	Interleukin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	et al. (lateinisch: und andere)
FACScan [®]	Fluorescence Activated Cell Scanner (Fluoreszenzaktiviertes Zellmessgerät, Becton Dickinson, Heidelberg)
Fc	Fragment cristalline (kristallisierbarer Antikörperteil, Carboxy-terminales Fragment von Immunglobulinen nach Papain-Spaltung)
FCM	Flow Cytometer (Durchflusszytometer)
FCS	Fetal calf serum (Fetales Kälberserum)
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FL-1, -2, -3	Messkanäle des Durchflusszytometers für emittierte Fluoreszenz FL-1 = Grünfluoreszenz, 530 ± 15 nm; FL-2 = Orangefluoreszenz, 585 ± 21 nm; FL-3 = Rotfluoreszenz, >650 nm
FSC	Forward Scatter (Vorwärtsstreulicht), Messparameter des FACScan [®]
g	Gramm
h	hora (lateinisch: Stunde)
I10F ⁺	Iscové-Zellkulturmedium mit L-Glutamin, Antibiotikumzusatz und 10% FCS
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule (interzelluläres Adhäsionsmolekül)
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin

IgG1	Immunglobulin Gamma, Isotyp 1
IgG2	Immunglobulin Gamma, Isotyp 2
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare Stickoxid Synthetase
JC-1	5,5',6,6'-tetra chloro-1,1',3,3'-tetraethyl-benzimidazol carbocyanin jodid
L	Liter
LBP	Lipopolysaccharid-Binding Protein
LFA	Leukocyte Function Antigen (Leukozyten-Funktionsantigen)
LPS	Lipopolysaccharid
LTA	Lipoteichonsäure
LTB ₄	Leukotrien B ₄
m	milli (x10 ⁻³)
mol	Mol
mAk	monoklonale(r) Antikörper
μ	mikro (x10 ⁻⁶)
MHC	Major Histocompatibility Complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
MIF	Membranimmunfluoreszenz
MMP	Mitochondrienmembranpotential
MNC	Mononuclear Cells (mononukleäre Zellen, hier: des Blutes)
mRNA	Messenger RNA
mV	Millivolt
MW	arithmetischer Mittelwert
n=	Anzahl der Einzelbeobachtungen
NaCl	Natriumchlorid
NO	Nitric Oxide (Stickstoffmonoxid)
OD	Optische Dichte
p	Irrtumswahrscheinlichkeit bei der Analyse der Ähnlichkeit zweier Datengruppen
PAMP	Pathogen Associated Molecular Pattern (Molekulare Muster von Erregern)
PBS	Phosphate buffered Saline (phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PGE ₂	Progesteron E ₂
PJ	Propidiumjodid
PMN	Polymorphonuclear Leukocytes (polymorphkernige neutrophile Granulozyten)
p.n.	post natum
p.p.	post partum
PRR	Pattern Recognition Receptor (Muster-Erkennungsrezeptor)

ROS	Reactive Oxygen Species (Reaktive Sauerstoffspezies)
rpm	Rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
s	Standardabweichung
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SEA	<i>Staphylococcus aureus</i> Enterotoxin A
SEM	Standard Error of the Mean (Standardfehler des Mittelwertes)
SSC	Side Scatter (Seitwärtsstreulicht), Messparameter des FACScan®
Tab.	Tabelle
Th1, Th2	Phänotyp einer T-Helfer-Zelle 1 oder 2
TLR	Toll-like-Receptor
TMB	Titramethylbenzidin

1 Einleitung und Zielsetzung

Nach der Entdeckung einzelner Isomere von konjugierten Linolsäuren (CLA) konnten in zahlreichen Studien auf molekularbiologischer Ebene sowie in verschiedenen Tiermodellen positive physiologische Wirkungen von CLA belegt werden. Die förderlichen Effekte, dass CLA eine krebshemmende und anti-oxidative Wirkung besitzt, den Glucose- und Fettstoffwechsel beeinflusst und auch immunmodulierend wirkt, sind in umfassenden Literaturübersichten beschrieben (PARIZA u. HARGRAVES 1985; L.D. WHIGHAM et al. 2000; BELURY 2002a; WAHLE et al. 2004; Y. PARK et al. 2007). Die im Tierversuch ermittelten wirksamen CLA-Konzentrationen liegen deutlich über den mit den Wiederkäuerprodukten aufgenommenen CLA-Mengen (KRAFT 2003). Aufgrund dieser scheinbar vielen positiven Wirkungen auf den menschlichen Organismus, gibt es zurzeit Bemühungen den CLA-Gehalt in Tierprodukten unter anderem in der Kuhmilch durch Futterzusätze zu erhöhen. Dabei zeigte sich in verschiedenen Studien, dass es bei der Zufütterung von CLA zu einer dramatischen Reduktion der Milchfettleistung und der Milchfettprozentage kommt (BAUMAN et al. 2008), was die Nutzungsmöglichkeiten einer CLA-Supplementierung erweitern konnte. Zurzeit wird von verschiedenen Futterherstellern die Zulage von CLA im Mischfutter zur Senkung des Milchfettgehaltes von Milchkühen und damit zur besseren Ausschöpfung der auf dem Milchfettgehalt basierenden Milchquote empfohlen. Zusätzlich wird eine Verringerung des Energiedefizits in der frühen Laktation unterstellt, was Auswirkungen auf den Stoffwechsel und die Gesundheit hochleistender Kühe erwarten lässt (BAUMAN u. GRIINARI 2003).

Eine Vielzahl von Studien konnte die Modulationsfähigkeit konjugierter Linolsäuren für adaptive und angeborene Immunfunktionen bei Mensch und Nagern belegen (MARTINASSO et al. 2009; PETERSON et al. 2009; RAMIREZ-SANTANA et al. 2009; REYNOLDS et al. 2009). Darüber hinaus wurden für CLA viele positive Effekte bei immunpathologischen Erkrankungen, wie z.B. Allergie, Sepsis oder Autoimmunität beschrieben (WHIGHAM et al. 2000; BASSAGANYA-RIERA u. HONTECILLAS 2006; TURPEINEN et al. 2008). Für das Rind fehlen entsprechende Studien, in denen immunmodulierende oder -polarisierende Wirkungen verschiedener CLA-Isomere nachgewiesen werden konnten. Solche Effekte hätten erheblichen Einfluss auf Immunmechanismen nach Erreger-Wirtkontakt, den quantitativen und qualitativen Vakzinierungserfolg und auf Trächtigkeitserhaltende Mechanismen.

Die peripartale Phase bei hochleistenden Milchkühen kennzeichnet sich durch deutliche hormonelle und metabolische Veränderungen, die zur Beeinträchtigung verschiedener Funktionen des angeborenen und adaptiven Immunsystems führen (NONNECKE et al. 2003).

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss konjugierter Linolsäuren auf das bovine Immunsystem zu untersuchen. Dabei wurden die möglichen *In-vivo*-Wirkungen einer langzeitigen Supplementierung mit CLA auf die Zellzusammensetzung leukozytärer Zellen des Blutes *ex vivo* geprüft. Schlüsselfunktionen neutrophiler Granulozyten und mononukleärer Zellen wurden *ex vivo* erfasst und *in vitro* analysiert. Das Spektrum der Stimulations-induzierten Expression pro- und antiinflammatorischer Zytokine, sowie die *in vivo* gebildeten Antikörperisotypen IgG1 und IgG2 sollen Hinweise auf eine Polarisierung adaptiver Immunmechanismen durch CLA Isomere *in vivo* geben.

2 Literaturübersicht

2.1 Immunzellen im peripheren Blut des Rindes

2.1.1 Neutrophile Granulozyten

Neutrophile Granulozyten (PMN, *polymorphonuclear cells*) stellen ein zentrales Element des angeborenen Immunsystems dar. Es sind hoch spezialisierte, kurzlebige Phagozyten. Bovine neutrophile Granulozyten sind denen anderer Spezies sowohl funktionell als auch morphologisch ähnlich, aber nicht identisch. Sie bilden neben den Lymphozyten die zweithäufigste Fraktion (25-45%) des Differentialblutbildes und gelten als Haupteffektorzellen bei bakteriellen Infektionen der Milchdrüse. Bovine Neutrophile besitzen neben den primären und sekundären eine dritte Gruppe von Granula, die den Großteil an antimikrobiellen Proteinen enthalten (Lactoferrin, Bakteriozine, β -Defensine) und den dominierenden Granulatyp beim Rind ausmachen (ROMEO et al. 1988). Neutrophile gehören zu den Immunzellen, die als erste am Entzündungsort erscheinen und deren Hauptaufgabe darin besteht, mikrobielle Erreger zu phagozytieren und abzutöten (LEE et al. 2003b). Sie können durch verschiedene Aktivatoren wie Lipopolysaccharid (LPS), Interleukin (IL) 1 β , IL-2, Tumornekrosefaktor (TNF) α oder (GM-CSF) zur Produktion und Freisetzung von Zytokinen stimuliert werden (LLOYD u. OPPENHEIM 1992) und dementsprechend am Entzündungsort sowohl die für die Phagozytoseleistung nötigen Moleküle, wie zum Beispiel Aktin, Fc γ -Rezeptoren und Komplementrezeptoren synthetisieren, als auch wichtige Mediatoren für die Entzündungsreaktion (Interferon- (IFN) α , *Platelet activating factor* (PAF) und Leukotrien (LT) B₄) bilden und freisetzen. Anhand dieser Fähigkeit aktivierungsabhängig Zytokine und Chemokine zu sezernieren, beeinflussen PMN unmittelbar Mechanismen der adaptiven Immunantwort (CASSATELLA 1999). Bereits vor einiger Zeit wurde auf einen anderen bakteriotoxischen Mechanismus von neutrophilen Granulozyten hingewiesen. Sie können ihre Kern-Nukleinsäuren und Proteine (Chromatin) außerhalb der Zelle mobilisieren und damit netzartige Strukturen (*Neutrophil Extracellular Traps*, NETs) bilden. In diesen werden Bakterien gefangen und abgetötet. NETs sind unter dem Elektronenmikroskop als feine Fasern zu erkennen, die als Gemisch von DNA und Proteinen aus dem Zellkern sowie Proteinen aus den Granula der Neutrophilen bestehen (WARTHA et al. 2007).

2.1.2 Monozyten

Monozyten entstehen als Vorläuferzellen der Makrophagen im Knochenmark und zirkulieren im Blut. Wenn es zum Kontakt mit Infektionserregern kommt, sind sie wie die neutrophilen Granulozyten in der Lage verstärkt in das betroffene Gewebe einzuwandern. Dort differenzieren sie sich unter dem Einfluss von Zytokinen und Erregerbestandteilen zu Makrophagen aus. Als Marker für Monozyten gilt das Molekül CD14, das neben LPB (Lipopolysaccharid Bindungsprotein) einen Bestandteil des TLR4-Komplexes, des Rezeptors für LPS, darstellt (YANG et al. 1995). CD14 wird auf Monozyten bzw. Makrophagen sowie schwach auf Granulozyten exprimiert und ist über Glycosylphosphatidylinositol (GPI) in der Zellmembran verankert. Es besitzt jedoch keine Fähigkeit zytoplasmatische Signale zu transduzieren (ULEVITCH u. TOBIAS 1995). Nach der Bindung des LPS-CD14-Komplexes an TLR4 wird eine Enzymkaskade in Gang gesetzt, in deren Folge verschiedene Zytokine und Oberflächenmoleküle verstärkt exprimiert werden (IL-1, IL-6, IL-8, TNF α , (GCSF)) (ADLER et al. 1994; BERTHON u. HOPKINS 1996). Im Gegensatz zum murinen und humanen System scheint die Bindung mit dem sich in Serum befindenden LBP, dem Lipopolysaccharid-Bindungsprotein für die Aktivierung von bovinen Monozyten durch LPS nicht notwendig zu sein (JUNGI et al. 1997). Monozyten exprimieren zudem MHC-II-Moleküle, die für die monoklonale sowie die Superantigen-induzierte polyklonale Aktivierung von T-Zellen notwendig sind. Monozyten können durch die Überbrückung von zwei MHC-II-Molekülen auf ihrer Oberfläche (z.B. durch Superantigene) unabhängig von T-Zellen aktiviert werden (MEHINDATE et al. 1995; HOPKINS et al. 2005).

2.1.3 B-Zellen

B-Lymphozyten sind dadurch gekennzeichnet, dass sie Fremdartigene anhand ihrer Oberflächen-Immunglobuline in nativer Form erkennen können, während T-Zellen Antigene typischerweise in prozessierter Form von Antigen-präsentierenden Zellen gezeigt bekommen. Nach der B-Zell-Aktivierung und einer T-Zell-Kostimulation bilden sich vor allem in lymphatischen Geweben sogenannte Keimzentren aus, in denen die B-Zellen, entsprechende T-Zell-Hilfe vorausgesetzt, zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen und Gedächtniszellen ausdifferenzieren können. Die von Plasmazellen freigesetzten Antikörper können je nach Isotyp verschiedene Funktionen wie Opsonisierung, Neutralisation, Komplementaktivierung oder ADCC (*antibody dependent cellular cytotoxicity*) ausüben (TARGOWSKI 1983; SHAFER-WEAVER u. SORDILLO 1997).

2.1.4 $\alpha\beta$ -T-Zellen

CD4+ $\alpha\beta$ -T-Zellen verlassen den Thymus und befinden sich zunächst als naive T-Zellen im Blut und gelten als wichtiges Maß für die Funktionalität des Immunsystems. Aktivierte CD4+ T-Zellen gelten in der Regel funktionell als Helferzellen und besitzen einen Rezeptor, der Peptid-Antigene im Kontext von MHC-Klasse-II-Molekülen auf speziellen antigenpräsentierenden Zellen (dendritische Zellen, Makrophagen, B-Lymphozyten) erkennt. CD4+ T-Zellen werden aufgrund der von ihnen produzierten Zytokine und der dadurch ausgeübten spezifischen Effektorfunktionen in Th1-, Th2- und Th17-Zellen unterteilt (DELMONTE et al. 2005; HARRINGTON et al. 2005). Th1-Zellen sezernieren IFN- γ und IL-2, wodurch Makrophagen aktiviert werden und die MHC-Klasse-II-Expression gesteigert wird. Diese Zytokine fördern die Bildung zytotoxischer T-Zellen und die Produktion von Antikörper-Isotypen, die besonders gut Komplement fixieren können und hemmen gleichzeitig eine Th2-Antwort. Zur Bildung von Th1-Zellen kommt es im Rahmen der Antigenpräsentation dann, wenn dendritische Zellen bei der Antigenpräsentation IL-12 sezernieren, was bei der Bekämpfung von Infektionen mit intrazellulären Bakterien eine große Rolle spielt. Th2-Zellen sezernieren vorwiegend die Zytokine TNF- β , IL-4 und IL-10, die ihrerseits die Bildung von Th1-Zellen hemmen. Sie fördern besonders den Isotypwechsel bei aktivierten B-Zellen und führen zur Bildung neutralisierender Antikörper (JANEWAY u. TRAVERS 2005). Die Th17-Zellen produzieren das Zytokin IL-17, können allerdings weder das Th1-Zytokin IFN- γ noch das Th2-Zytokin IL-4 produzieren (DELMONTE et al. 2005; HARRINGTON et al. 2005). Diese T-Zell-Population konnte das Verständnis von Autoimmunprozessen, die durch die Th1/Th2-Dichotomie bisher nicht vollständig erklärt werden konnten, deutlich erweitern (SHEIBANIE et al. 2007).

CD8+ T-Zellen zirkulieren ebenfalls als naive T-Zellen im peripheren Blut und fungieren nach ihrer Aktivierung als zytotoxische T-Zellen (CTL), die durch MHC-Klasse-I präsentierte Peptid-Antigene erkennen können. Die Aktivität der zytotoxischen T-Zellen richtet sich im Allgemeinen gegen infizierte Zellen, Tumorzellen und *inkompatible* Transplantate. Werden zytotoxische CD8+ T-Zellen durch Bindung an eine MHC-Klasse-I-exprimierende Zelle, welche ein fremdes Antigen präsentiert, aktiviert, so schütten sie Perforine und Granzyme aus, die ihrerseits in den MHC-Klasse-I-tragenden Zellen Apoptose induzieren. CTL produzieren IFN- γ , welches in vielen anderen Zellen vor allem antiviralen Alarm auslöst und sowohl Makrophagen als auch neutrophile Granulozyten aktiviert (JANEWAY u. TRAVERS 2005).

2.1.5 $\gamma\delta$ -T-Zellen

Bovine $\gamma\delta$ -T-Zellen bilden eine heterogene Gruppe an Lymphozyten, deren funktionelle Bedeutung noch nicht vollständig geklärt ist. Es wird vermutet, dass sie Teil des angeborenen Immunsystems sind und insbesondere im Darmtrakt und in der Milchdrüse eine wichtige Verteidigungslinie gegen Infektionen darstellen (HUGHES u. PINDER 2000). Bovine $\gamma\delta$ -T-Zellen spielen eine große Rolle bei der Immunität gegen *Mycobacterium bovis*, da sie auf eine solche Infektion mit der Freisetzung von IFN- γ reagieren (PRICE u. HOPE 2009). Bei Jungtieren ist ihr Anteil größer als bei adulten Tieren (TIZARD 2008b). $\gamma\delta$ -T-Zellen werden vor allem in Schleimhäuten nachgewiesen und sind besonders häufig in der Milz, der Milchdrüse und dem Darmepithel zu finden. In Wiederkäuern zirkuliert ein Großteil dieser Lymphozytenpopulation zwischen Blut, Gewebe und Lymphe und ist in den peripheren Körperkompartimenten weit verteilt (MACHUGH et al. 1997; DAUBENBERGER et al. 1999; SOLTYS u. QUINN 1999; WILSON et al. 2002; AN et al. 2009; HERZIG u. BALDWIN 2009; PLATTNER et al. 2009). WC1 ist ein Marker für $\gamma\delta$ -T-Zellen, dessen Funktion noch ungeklärt ist. Es wird jedoch spekuliert, dass dieses Molekül, ähnlich wie CD4- und CD8-Moleküle, einen Korezeptor des $\gamma\delta$ -T-Zellrezeptors darstellt. (VAN KAMPEN et al. 1999).

2.2 Veränderungen des bovinen Immunsystems im peripartalen Zeitraum

Die Quantität sowie die Funktion verschiedener Parameter des adaptiven und des angeborenen Immunsystems bei Milchkühen werden durch die Abkalbung beeinflusst.

2.2.1 Veränderungen in der Zellzusammensetzung des Blutes

Im Blut laktierender Kühe besteht die Lymphozytenpopulation aus 23% B-Zellen und 45% T-Zellen (CONCHA et al. 1978). Während ein prozentualer Anteil von 20% für die CD8+ T-Lymphozyten im Blut laktierender Kühe in der Literatur angegeben wird, werden unterschiedliche Angaben für den Anteil der CD4+ Zellen unter den T-Zellen von 35% (VAN KAMPEN et al. 1999) bis 67% (ASAI et al. 2000) gemacht. Zur Abkalbung findet innerhalb der Lymphozytenpopulation ein signifikanter Anstieg des Anteils der IgM-tragenden B-Lymphozyten und der MHC-II+ Zellpopulationen statt, wobei der Anteil von B-Zellen unmittelbar vor der Abkalbung am höchsten und unmittelbar nach der Abkalbung am niedrigsten zu sehen ist (VAN KAMPEN u. MALLARD 1997; VAN KAMPEN et al. 1999; ASAI et al. 2000). Nach der Arbeit von KARCHER et al. (2008) konnte kein Einfluss der Abkalbung auf den

Anteil von B-Zellen im peripheren Blut festgestellt werden. Darüber hinaus war bei Milchkühen zum Zeitpunkt der Abkalbung ein erhöhter Anteil von Monozyten im Blut nachweisbar, während der Anteil aller T-Zell-Subpopulationen (CD3+, CD4+, CD8+, $\gamma\delta$ +) signifikant abfiel (KIMURA et al. 2002). Ein dramatischer Rückgang des Anteils der CD4+ T-Zellen und der $\gamma\delta$ T-Zellen zum Zeitpunkt der Abkalbung konnte in vielen Studien festgestellt werden (VAN KAMPEN u. MALLARD 1997; KIMURA et al. 1999). Im nachfolgenden Laktationsverlauf änderten sich die Anteile von B- und T-Lymphozyten sowie NK-Zellen dagegen kaum (Y. H. PARK et al. 1992). Während es durch die Abkalbung nicht beeinflusst wird, zeigt das Verhältnis von CD4/CD8 vom Laktationsbeginn zum Laktationsende eine kontinuierliche Zunahme (PARK et al. 1992; ASAI et al. 2000; HARP et al. 2004).

2.2.2 Veränderungen der Phagozytosekapazität neutrophiler Granulozyten

In einer Untersuchung von MALLARD et.al. (1998) wurde eine stark verminderte Aktivität polymorphkerniger neutrophiler Granulozyten (PMN) drei Wochen vor der Kalbung bis ca. drei Wochen nach der Kalbung festgestellt. Auf diese reduzierte Funktionsfähigkeit der PMN im peripartalen Zeitraum wurde in einer anderen Arbeit von PAAPE et al (2003) hingewiesen, wonach ein deutlicher Abfall ihrer Migrationsfähigkeit in das Drüsengewebe beobachtet wurde, was auf den Mangel an L-Selectin, einem oberflächlichen Adhäsionsmolekül der Zellmembran, zurückgeführt werden konnte. Weitere peripartale Metaboliten und Hormone wie β -Hydroxybutyrat, Cortison, Wachstumshormone und Glycoproteine könnten für eine zusätzliche Etablierung dieser verminderten Funktionalität der PMN verantwortlich sein (PAAPE et al. 2002). Nach der Studie einer belgischen Arbeitsgruppe, die die Überlebensdauer, den prozentualen Anteil und die Aktivität der PMN in der Milch und im Blut in verschiedener Laktationsstadien untersuchte, wurde eine verminderte Überlebensfähigkeit, ein geringerer Anteil sowie eine reduzierte Funktionsfähigkeit (ROS-Bildung) der PMN während der Frühaktation festgestellt (MEHRZAD et al. 2001).

2.2.3 Serum- und Milch-IgG-Gehalte im peripartalen Zeitraum

Im Rinderblut liegen die beiden IgG-Isotypen IgG1 und IgG2 in Konzentrationen gleicher Größenordnung vor. Ab etwa vier Wochen vor der Abkalbung wird IgG1 unter dem Einfluss von Östrogen und Progesteron über einen selektiven Transportmechanismus, der durch einen spezifischen Fc-Rezeptor, den *newborn Fc Receptor* (FcRn), vermittelt wird (MAYER et al. 2005) aus dem Plasma in die Milchdrüse transportiert und im Kolostrum konzentriert (PORTER

1973; LASCELLES 1979). Diese selektive Übertragung von IgG1 führt bei der Kuh zu einem starken Abfall des IgG1-Blutserumspiegels in den letzten Wochen vor der Abkalbung und zur deutlichen Dominanz von IgG2 (TIZARD 2008a). Nach der Abkalbung wird deutlich weniger IgG1 aus dem Serum in die Milch übertragen, was für eine Steigerung des IgG1-Gehaltes im Serum sorgt. Von BUTLER et al. (1972) wurde eine präpartale IgG1-Konzentration von $31,6 \pm 19,3$ mg/ml im Kolostrum und $10,7 \pm 5,7$ mg/ml im Blutserum angegeben, wobei es nach der Abkalbung zu einem Abfall der Konzentration auf $1,38 \pm 1,9$ mg/ml in der Milch und einem Anstieg auf $12,9 \pm 6,1$ mg/ml im Serum kam. In der Trockenstehperiode konnten DETILLEUX et al. (1995) ebenfalls eine Reduktion des humoralen IgG1-Levels um 62% (auf 2 mg/ml) von der fünften Woche a.p. bis zum Partus feststellen. Auch nach den Resultaten von FRANKLIN et al. (2006) kommt es von der vierten Woche a.p. bis zur Abkalbung hin zu einem kontinuierlichen Abfall der IgG1-Konzentration von $10,2 \pm 0,9$ mg/ml auf $3,3 \pm 0,7$ mg/ml, was einer Reduktion von 67,6% entspricht. Eine andere Kinetik zeigte jedoch, dass der IgG2-Gehalt vier Wochen a.p. von $13,5 \pm 1,3$ mg/ml auf $15,7 \pm 1,8$ mg/ml zur Abkalbung anstieg.

2.3 Immunpolarisierung beim Rind

Rinder verfügen - wie andere Spezies - auch über die Fähigkeit mit angepassten Immunantworttypen (Typ 1, Typ 2) auf Antigene und Erreger zu antworten. Dieses Typ1/Typ2-Paradigma ist anhand unterscheidbarer T-Helferzellklone (Th1, Th2 und Th17) und ihrer charakteristischen Zytokinprofile am klarsten bei Mäusen zu verifizieren, was beim Rind noch nicht möglich ist (ESTES u. BROWN 2002). Deutliche Hinweise für eine Polarisierung der Immunantwort beim Rind geben jedoch die gebildeten Antikörperisotypen. So gelten bovines IgG1 und IgE als Marker einer Typ-2-Antwort (*in vitro* induzierbar durch Interleukin-4 und -13) (TRIGONA et al. 1999; ESTES u. BROWN 2002), während bovines IgG2 präferentiell dann gebildet wird, wenn inflammatorische Zytokine (besonders Interferon- γ und Typ-1-Interferone) von T-Zellen gebildet werden (ESTES et al. 1998). Diese Immunantworttypen decken sich beim Rind mit den erwarteten nach Infektionen mit intrazellularen Erregern (Typ-1-Antwort, IgG2>IgG1), mit Helminthen (IgG1>IgG2) oder im Uterus, einem Th2-Zytokin-polarisierten Organ. Welche anderen löslichen Faktoren neben den klassischen Zytokinen an der Regulation des Isotypwechsels teilnehmen, ist für das Rind nicht bekannt.

2.4 Konjugierte Linolsäuren

2.4.1 Nomenklatur

Der Überbegriff „konjugierte Linolsäuren“ (englisch: *conjugated linoleic acids*, CLA) beschreibt eine Gruppe von geometrischen und Positions-Isomeren der klassischen Linolsäure (C18:2), deren Doppelbindungen in konjugierter Form vorliegen (HA et al. 1987). Die Gruppe der CLA beinhaltet eine Vielzahl verschiedener Isomere mit *trans-trans*-, *cis-trans*-, *trans-cis* und *cis-cis*-Konfiguration, von denen bis heute 8 Positionsisomeren mit Doppelbindungen an den Kohlenstoffatomen 6/8, 7/9, 8/10, 9/11, 10/12, 11/13, 12/14 oder 13/15 identifiziert worden sind (DELMONTE et al. 2005). Innerhalb der vielen CLA-Isomere sind heute zwei Isomere von besonderer Bedeutung, nämlich die *cis*-9, *trans*-11-CLA und die *trans*-10, *cis*-12-CLA (RINGSEIS et al. 2006) (**Abb. 1**). In Abbildung 1 sind neben der Linolsäure die CLA-Isomere *c*-9, *t*-11-CLA und *t*-10, *c*-12-CLA dargestellt.

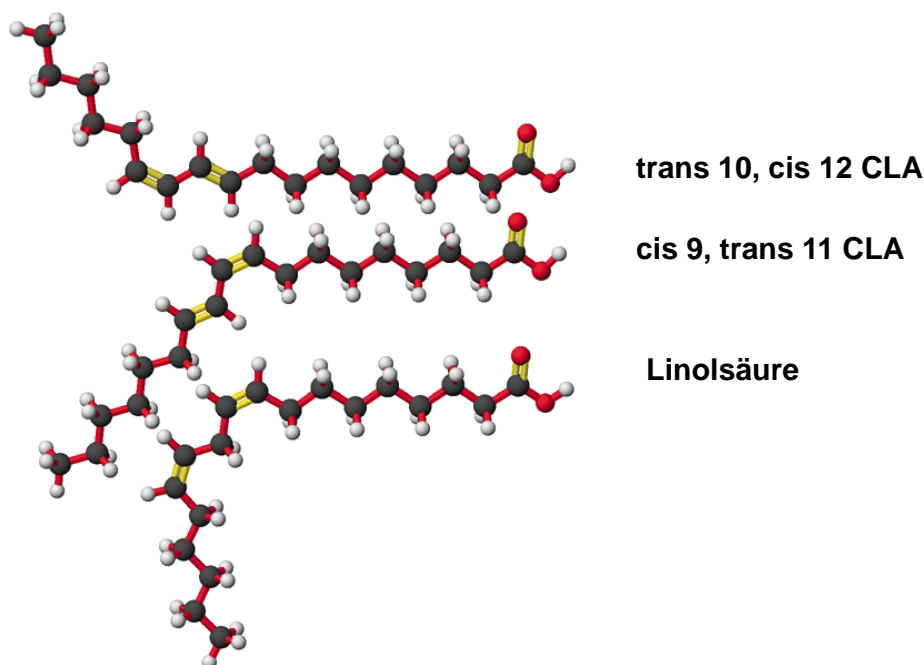


Abb. 1 Strukturvergleich von trans-10,cis-12 CLA, cis-9,trans-11 CLA und Linolsäure (STEINHART 1996).

Im Unterschied zur klassischen Linolsäure liegen die Doppelbindungen bei CLA in konjugierter Form vor. Dies kennzeichnet sich dadurch, dass sie direkt an benachbarten Kohlenstoffatomen einer Fettsäure sitzen, während bei isolierter Doppelbindung eine Methylen-Gruppe (CH_2) zwischen den beiden beteiligten Kohlenstoffatomen lokalisiert ist.

2.4.2 Biosynthese und kommerzielle Herstellung

Fettsäuren sind Carbonsäuren, die in gesättigter oder ungesättigter Form vorkommen. Ungesättigte Fettsäuren sind solche, die eine oder mehrere Doppelbindungen aufweisen. Im Unterschied zu den vom Säugetierorganismus oder von Pflanzen gebildeten ungesättigten Fettsäuren, die Doppelbindungen in isolierter Stellung und in *cis*-Konfiguration aufweisen (ENGELKING 2004), sind Mikroorganismen in der Lage, Fettsäuren zu bilden, die Doppelbindungen in konjugierter Form und in *trans*-Konfiguration enthalten (OGAWA et al. 2005). Doppelbindungen in konjugierter Form sind dadurch gekennzeichnet, dass sie direkt an benachbarten Kohlenstoffatomen einer Fettsäure sitzen, während bei isolierter Doppelbindung

eine Methylen-Gruppe (CH₂) zwischen den beiden beteiligten Kohlenstoffatomen lokalisiert ist (ENGELKING 2004). Im Pansen von Wiederkäuern werden CLA bei der Biohydrierung von Linolsäure unter dem enzymatischen Einfluss der Linolsäure-Isomerase des gram-negativen Pansenbakteriums (*Butyrivibrio fibrisolvens*) gebildet (KEPLER et al. 1966). Durch stereochemische Verschiebung der Doppelbindung von der *cis*-Stellung am C12 zur *trans*-Stellung am C11 entsteht hierbei zunächst das Isomer *c*9, *t*11-CLA (KEPLER et al. 1971), das im Pansen zur *t*11-Octadecensäure (Vaccensäure, C18:1t11) reduziert werden kann (KATZ u. KEENEY 1966). Weitere Isomere können von verschiedenen anderen Pansenbakterien in sehr geringeren Mengen synthetisiert werden (WALLACE et al. 2007). Neue Studien (DEWHURST et al. 2001; KIM et al. 2002) konnten zeigen, dass das Pansenbakterium *Megasphaera elsdenii* in der Lage ist, *trans*-10, *cis*-12-CLA aus LA bevorzugt zu produzieren. Nach ihrer Produktion im Pansen werden die Vaccensäure und CLA-Isomere im Darm absorbiert und ins Gewebe sowie in die Milchdrüse transportiert. In der Milchdrüse laktierender Kühe ist die erneute Bildung von *c*9,*t*11-CLA aus *trans*-Vaccensäure via Desaturierung durch die Δ 9-Desaturase (Stearoyl-CoA-Desaturase) möglich (GRIINARI et al. 2000). *C*9, *t*11-CLA kommt natürlicherweise zu einem Anteil von 80 bis 90 % der Gesamtisomere in Milchfett, Milchprodukten und Fleisch von Wiederkäuern vor, während andere CLA-Isomere Minor-Komponenten darstellen (FRITSCHKE u. STEINHART 1998). CLA-Gehalt in Tierprodukten aus Wiederkäuern reichen je nach Fütterungs- und Haltungsbedingungen bzw. saisonalen Einflüssen von 0,2 bis 2,4 g/100 g Fett (DHIMAN et al. 1999; COLLOMB et al. 2004). Milch aus Hochland-Weidehaltung weist im Vergleich zu der aus Silagefütterung einen bis zu 10-fach höheren Gehalt an CLA auf (COLLOMB et al. 2001; KRAFT et al. 2003). Die kommerzielle Herstellung der CLA-Isomere kann bakteriell auf Grund ihrer Isomerasen durch eine Reihe von Mikroorganismen erfolgen (COLLOMB et al. 2004). Heute werden die zu Forschungszwecken eingesetzten CLA-Isomere häufig chemisch hergestellt, was auf einer katalytischen Hydrierung von Ölen basiert (BERDEAUX et al. 1998; FRITSCHKE u. STEINHART 1998).

2.4.3 Physiologische Wirkung

Innerhalb der Gruppe der konjugierten Fettsäuren haben in den letzten Jahren die konjugierten Linolsäuren besondere Beachtung erfahren. Konjugierte Linolsäuren wurden Ende der 80er Jahre von der Arbeitsgruppe PARIZA und HARGRAVIS entdeckt, die Substanzen aus einem Extrakt von gegrilltem Rindfleisch isolieren wollten, um deren krebserregende Wirkungen nach zu weisen. Dabei entdeckten sie CLA, die allerdings krebshemmende Effekte zeigten (PARIZA u.

HARGRAVES 1985). Seit ihrer Entdeckung ist die Zahl der wissenschaftlichen Berichte über die Wirkungen von CLA exponentiell gestiegen. In der Literatur werden unterschiedliche Effekte von CLA in Abhängigkeit von der im Experiment verwendeten Tierart, den eingesetzten Dosen und dem verwendeten CLA-Isomer beschrieben. Im Mittelpunkt der Forschung stehen zurzeit die anti-kanzerogenen (HA et al. 1990; LIEW et al. 1995; BELURY et al. 1996; BELURY 2002b; KELLEY et al. 2007), anti-atherogenen (PICH et al. 1993; LEE et al. 1994; LEE et al. 2003a; TOOMEY et al. 2003), anti-diabetogenen (BROWN u. MCINTOSH 2003; WAHLE et al. 2004), anti-adipogenen (BELURY u. KEMPA-STEJCZKO 1997; J.M. BROWN u. MCINTOSH 2003) und anti-inflammatorischen (CHENG et al. 2004) Wirkungen der CLA-Isomere.

2.5 Immunmodulation durch CLA-Isomere

Zahlreiche an Zelllinien und Tiermodellen durchgeführte Untersuchungen weisen darauf hin, dass CLA-Isomere einen Einfluss auf das Immunsystem ausüben. Die meisten Studien über die Wirkungen von CLA auf Immunzellfunktionen wurden mit einer Mischung von Isomeren durchgeführt und führten zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen, die je nach Modell und Tierart von Stimulation zur Hemmung variierten und diese Varianz sich sogar für die gleiche Funktion in verschiedenen Studien zeigt. Im Gegensatz zu ihren unterschiedlichen Effekten auf den Lipidstoffwechsel, scheinen die beiden Hauptisomere von CLA, *c9,t11* und *t10,c12*-CLA, einen einander ähnlichen Effekt auf das Immunsystem zu haben (WAHLE et al. 2004). MILLER et al. (1994) untersuchten die Fähigkeit der konjugierten Linolsäuren, die LPS-induzierte Wachstumunterdrückung bei Mäusen zu reduzieren und fanden, dass die Kontrollmäuse, die mit einer Diät mit 0,5% Fischöl gefüttert wurden, doppelt so viel Körpergewicht nach LPS-Injektion verloren als die mit CLA gefütterten Mäuse.

2.5.1 Einfluss von CLA auf die Hämatopoiese

Der Einfluss einer CLA-Supplementation auf die Hämatopoiese und die zelluläre Zusammensetzung des peripheren Blutes wurde in nur wenigen systematischen Studien untersucht. Bei Mäusen, denen für 6 Wochen CLA über die Nahrung supplementiert wurde, zeigte sich im Knochenmark ein verstärkter Umsatz der erythroiden Zellen, was mit einem relativen Anstieg von Proerythroblasten im peripheren Blut einherging. Gleichzeitig entwickelte sich im Beobachtungszeitraum eine Lymphopenie (DI FELICE et al. 2007). Ob dies bestimmte Subpopulationen präferentiell betrifft, wurde nicht untersucht. In einem Fütterungsversuch beim Schwein untersuchten OSTROWSKA et al. (2004) die Wirkung von CLA, einer

Isomermischung, auf die Zellzusammensetzung der Leukozyten im Blut sowie auf einige Immunfunktionen und Immunparameter. Nach 8 Wochen Supplementierung mit CLA wurde zwischen den verschiedenen Gruppen kein Unterschied in der Gesamtzahl der Leukozyten oder in der Anzahl von neutrophilen Granulozyten, Monozyten oder Lymphozyten im Blut gesehen. Die Phänotypisierung von T-Zellen zeigte, dass die Anzahl von CD4⁺ T-Zellen linear mit zunehmender Aufnahme von CLA in der Nahrung reduziert wurde (OSTROWSKA et al. 2004). Ein Anstieg an CD8⁺ T-Zellen sowie an natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) wurde auch im peripheren Blut von CLA-gefütterten Schweinen im Vergleich zu denen, die mit einer Diät von Sojaöl gefüttert wurden, beobachtet (BASSAGANYA-RIERA et al. 2001). Laut einer Studie von KELLEY et al. (2002), in der weibliche Mäuse entweder eine Kontroll-, *c9*, *t11*-CLA- oder *t10*, *c12*-CLA-Ernährung für 56 Tage bekamen, unterschied sich die Zahl der Immunzellen in der Milz, im Knochenmark oder im peripheren Blut der drei Gruppen nicht. Auf der anderen Seite zeigte eine Studie von HE et al. (2007), die die Wirkung einer Supplementierung mit konjugierten Linolsäuren auf das Immunsystem bei Küken untersuchte, dass eine Erhöhung des relativen Anteils des Thymus und der Bursa im Alter von 21 Tagen bei CLA-Küken im Vergleich zu Kontrollküken nachweisbar war.

2.5.2 Einfluss von CLA auf Monozyten und Makrophagen

Modulierende Effekte von CLA auf Monozyten/Makrophagen konnten in verschiedenen *In-vitro*- und *In-vivo*-Systemen gezeigt werden, nach denen CLA überwiegend anti-inflammatorische Wirkungen ausübten. Die ersten Hinweise auf eine mögliche immunmodulierende Wirkung durch CLA-Isomere kamen aus CLA-Fütterungsversuchen an Hühnern und Ratten, denen das bakterielle Endotoxin Lipopolysaccharid injiziert wurde (COOK et al. 1993). Die mit CLA gefütterten Hühner wiesen einen signifikant geringeren Gewichtsverlust auf als die Kontrollgruppe. Auch bei Ratten war der Gewichtsverlust der CLA-Tiere nur halb so hoch wie der der Kontrolltiere. COOK et al. erklärten das durch eine hemmende Wirkung von CLA-Isomeren auf den katabolen Effekt der Immunantwort. Während einer normalen Immunantwort setzen die stimulierten Immunzellen Zytokine frei, die einerseits die Entwicklung der Immunantwort vermitteln, andererseits aber einen katabolen Effekt auf nicht lymphoides Gewebe haben. Das von Monozyten gebildete IL-1 β führt zur Unterdrückung der Nahrungsaufnahme und der Magenentleerung und begünstigt somit eine Anorexie (DAUN et al. 1993). In vielen Studien konnten CLA die Freisetzung der von Monozyten/Makrophagen produzierten inflammatorischen Zytokine, insbesondere TNF- α und IL-1 β , reduzieren. In einer Studie von AKAHOSHI et al. (2004) verringerte eine Mischung von CLA-Isomeren im Vergleich zur klassischen Linolsäure

den Serumgehalt an TNF- α auf etwa 50%. In Übereinstimmung mit diesen Beobachtungen zeigten YANG und COOK (2003), dass die Fütterung mit cis-9, trans-11-CLA im Vergleich zu einer Öl-Mais-Gabe die Produktion von TNF- α *in vivo* nach der Injektion von LPS unterdrückt. Dieses Isomer war auch in der Lage, die Produktion von TNF- α direkt nach der Inkubation mit Makrophagen zu unterdrücken. Darüber hinaus zeigten beide CLA-Isomere eine hemmende Wirkung auf die Migrationsfähigkeit von Monozyten (MCCLELLAND et al. 2010). Obwohl die meisten Studien in der Literatur von einer anti-inflammatorischen Wirkung von CLA auf die Monozyten/Makrophagen-Ebene ausgehen, zeigen wenige Versuche, dass die Inkubation von Makrophagen mit CLA-Isomeren die Expression von TNF- α über einen PPAR γ -abhängigen Weg verstärkt, was zur Verbesserung der Phagozytoseleistung dieser Zellen führt (KANG et al. 2007; SONG et al. 2007).

2.5.3 Einfluss von CLA auf funktionelle Kapazitäten von neutrophilen Granulozyten

KANG et al. (2007) untersuchten die Wirkung von *t*10,*c*12-CLA auf die Phagozytosekapazität porziner PMN *in vitro* und kamen dabei zu dem Schluss, dass *t*10,*c*12-CLA eine indirekte stimulierende Wirkung auf jene hat, die durch Verstärkung der TNF- α Produktion von MNC über einen Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ -vermittelten Weg reguliert wird. Diese Wirkung von *t*10,*c*12-CLA auf die Phagozytosekapazität der PMN konnte auch beim Hund bestätigt werden (KANG u. YANG 2008). In einer anderen Studie, bei der Hunde mit einer Diät oder einem CLA-Supplement für neun Monate gefüttert wurden, konnten keine Unterschiede im Hinblick auf die *Ex-vivo*-Phagozytosekapazität oder ROS-Bildung der PMN zwischen den Gruppen gesehen werden (NUNES et al. 2008). Darüber hinaus konnte die Inkubation porziner PMN mit dem Kulturüberstand von mit *t*10,*c*12-CLA behandelten MNC die chemotaktische Kapazität der PMN verstärken, ein Effekt, der durch IL-8 vermittelt ist (J.H. KIM et al. 2003; BODLES et al. 2006). Zur Untersuchung der Wirkung von CLA beim Schwein *in vivo* haben HAN et al. (2003) Schweine mit 0,5% *t*10,*c*12-CLA oder einem 0,5% CLA-Gemisch (*c*9,*t*11- und *t*10,*c*12-CLA) für 4 Wochen supplementiert. Die CLA-gefütterten Tiere zeigten im Vergleich zu den Kontrolltieren eine erhöhte Anzahl der neutrophilen Granulozyten im Blut. Die *Ex-vivo*-Analyse der Phagozytoseleistung von PMN zeigte in den Wochen 2, 4 und 5 nach Beginn der Fütterung bessere Phagozytoseraten bei den CLA-Tieren im Vergleich zur Kontrolle. In einem anderen Versuch führte eine CLA-Supplementierung bei Sauen zu einer deutlichen Verbesserung der Phagozytoseleistung neutrophiler Granulozyten (OSTROWSKA et al. 2004).

2.5.4 Beeinflussung von Lymphozyten

Es gibt einige Hinweise darauf, dass CLA-Isomere die Funktionen von T-Lymphozyten direkt sowie indirekt beeinflussen können. CLA konnten die Aktivierbarkeit von T-Zellen indirekt über ihre hemmende Wirkung auf die Reifung von dendritischen Zellen und die reduzierte Produktion von IL-12 verringern (BERGAMO et al. 2008). In einer Studie von LOSCHER et al. (2005), die die Wirkungen des Isomers *cis*-9, *trans*-11-CLA auf murine dendritische Zelle untersuchte, führte die Behandlung von dendritischen Zellen (DC) mit *c*9, *t*11-CLA zu Unterdrückung der LPS-induzierten IL-12-Produktion, während die Expression von IL-10R in diesen Zellen sowie deren Produktion von IL-10 verstärkt wurden. Auf direktem Weg wurde CLA auch ein hemmender Effekt auf die Mitogen-induzierte Aktivierung von T-Zellen zugeschrieben. Die Mitogen-induzierte Aktivierung humaner T-Lymphozyten wurde durch *cis*-9,*trans*-11- und *trans*-10,*cis*-12-CLA dosisabhängig reduziert, wobei ein gleichzeitiger Anstieg beider Isomere in den Lipiden der peripheren mononukleären Zellen gemessen werden konnte. Eine negative Korrelation zwischen der Mitogen-induzierten T-Lymphozyten-Aktivierung und der Inhalte der einzelnen CLA-Isomere in mononukleären Zellen war ebenfalls nachzuweisen (TRICON et al. 2004). Über die Wirkung von CLA auf die B-Zellfunktionen gibt es in der Literatur unterschiedliche Angaben: Während eine modulierende Wirkung von CLA auf einige Immunglobulinisotypen in wenigen Versuchen beobachtet wurde, zeigen die meisten Studien, dass alle Isotypen durch CLA negativ beeinflusst werden. Laut einer Studie von SUGANO et al. (1998), welche die Wirkungen der CLA-Isomere auf Lymphozyten-Funktionen bei der Ratte untersuchte, führte eine ergänzende Ernährung mit 0,5 oder 1,0% CLA für 3 Wochen bei männlichen, 4 Wochen alten, Ratten zur signifikant geringeren Sekretion von IgE *ex vivo*, während diejenige von IgG, IgA, und IgM gesteigert wurden. Die Supplementierung mit CLA über 8 Wochen führte beim Schwein zur Halbierung des Serum-IgG-Gehaltes (OSTROWSKA et al. 2004). Bei Mäusen, denen eine C9, t11-CLA-reiche Diät angeboten wurde, zeigte CLA einen negativen Effekt auf die Konzentration von IgE, IgG1 sowie IgG2a im Serum (JAUDSZUS et al. 2008).

Studien über die Beeinflussung der Stimulierbarkeit von Lymphozyten mit T-Zell- oder B-Zell-Mitogenen zeigten nach der Stimulation unterschiedliche Effekte von CLA auf die Blastogenese. WONG et al. (1997) untersuchten die Wirkung von CLA auf die Proliferation von Lymphozyten in Abhängigkeit der Zeit und fanden dabei, dass bei über drei Wochen mit CLA gefütterten Mäusen eine Verbesserung der Phytohemagglutinin (PHA) induzierten Proliferation von Splenozyten, während eine Supplementierung für 6 Wochen keinen Einfluss auf die Proliferation zeigte. Diese Befunde decken sich nicht mit den Ergebnissen von BASSAGANYA-RIERA et al. (2003), die weder nach 3 noch nach 6 Wochen CLA-Supplementierung eine Veränderung der

Splenozyten-Proliferation feststellen konnten. Darüber hinaus konnte in den Studien von KELLEY et al. (2002) und ALBERS et al. (2003) kein Einfluss von CLA auf die Mitogen-induzierte Proliferationsfähigkeit von Lymphozyten festgestellt werden.

Ferner wird vermutet, dass CLA die Schutzfunktion des Immunsystems, wie u.a. die Beseitigung von intrazellulären Krankheitserregern, fördern, während andere Antworten, wie bspw. die IgE-Produktion, durch CLA unterdrückt werden. So konnte CLA die Proliferation von CD8 + T-Zellen von Circovirus-infizierten Schweinen verbessern (BASSAGANYA-RIERA et al. 2003). Ein Anstieg der CD8+ T-Zellen und der natürlichen Killerzellen wurde auch im peripheren Blut der gegen Circovirus geimpften CLA-Schweine im Vergleich zu denen, die mit einer Diät von Sojaöl gefüttert wurden, gemessen (BASSAGANYA-RIERA et al. 2001).

2.5.5 Zytokinmodulation durch CLA

In vielen *In-vitro*- und *In-vivo*-Systemen konnte gezeigt werden, dass CLA modulierende Wirkungen auf die Zytokinregulation haben, und überwiegend gezielt die Expression inflammatorischer Zytokine unterdrücken können. In einer Studie mit 28 gesunden Erwachsenen, die für 12 Wochen entweder Sonnenblumenöl (Placebo) oder 3,0 g/Tag CLA (*c9,t11*- und *t10,c12*-CLA 50:50) bekamen, zeigte die CLA-Gruppe deutlich reduzierte Mengen an den inflammatorischen Zytokinen TNF- α und IL1- β und eine erhöhte Produktion des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 (SONG et al. 2005). In einem porzinen LPS-Modell konnten beide CLA-Isomere (*c9-t11* und *t10-c12*) die Genexpression der Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF- α in MNC (*ex vivo* und *in vitro*) im Thymus und in der Milz sowie deren Gehalt im Serum deutlich unterdrücken, während die Genexpression von IL-10 und PPAR γ parallel gesteigert werden konnte (CHANGHUA et al. 2005). In einer Fütterungsstudie bei der Maus konnte LPS-induziertes TNF- α im Serum durch CLA (Gemisch) reduziert werden (BUTZ et al. 2007). In zahlreichen Supplementierungsstudien konnte hingegen kein Einfluss von CLA auf die von Immunzellen freigesetzten Zytokine festgestellt werden. Nach den Untersuchungen von ALBERS et al. (2003) konnte die *Ex-vivo*-Produktion von Zytokinen (TNF- α , IL1- β , IL-6, IFN- γ , IL-2, IL-4) von LPS-stimulierten menschlichen MNC durch CLA nicht beeinflusst werden. In einem anderen diätischen Versuch beim Menschen konnte gezeigt werden, dass die Supplementierung mit CLA für 93 Tagen die Konzentration der CLA-Isomere in den Lipiden der mononukleären Zellen des Blutes steigerte. Diese konnte allerdings weder die *Ex-vivo*-Produktion von durch LPS-induziertem IL-1 β oder TNF- α noch die mittels PHA induzierte IL-2-Produktion bei MNC beeinflussen (KELLEY et al. 2001). In einer weiteren Studie (MULLEN et

al. 2007) konnte die Supplementierung mit einer CLA-Mischung aus *c9*, *t11*- und *t10*, *c12*-CLA (50:50) über 8 Wochen für männliche Probanden keine Wirkung auf die Konzentrationen von IL-10 oder TNF- α in den Überständen von kultivierten unstimulierten sowie ConA-stimulierten MNC zeigen. Obwohl die meisten Studien von einer anti-inflammatorischen Wirkung durch CLA ausgehen, wurden in einigen Versuchen ebenfalls inflammatorische Wirkungen für beide CLA-Isomere beschrieben. Laut der Studie von KELLEY et al. (2002) zeigten beide CLA-Isomere ähnliche Wirkungen auf das Immunsystem, nach denen die *In-vitro*-Produktion von TNF- α und IL-6 bei Monozyten verstärkt wurden, was in zwei anderen Studien bestätigt werden konnte (YAMASAKI et al. 2003).

2.5.6 Die Rolle von CLA bei immunpathologischen Reaktionen

Die Rolle von CLA bei Allergien, Sepsis oder autoimmunen Prozessen wurde in einigen Studien untersucht, in denen meistens ein positiver Effekt von CLA nachgewiesen werden konnte. Ein positiver Einfluss von CLA bei klinischen Erkrankungen, die auf eine allergische Reaktion vom Typ-I beruhen, wurde von WHIGHAM et al. (2000) durch die Supplementierung einer CLA-haltigen Nahrung bei einem Meerschweinchen-Allergiemodell festgestellt. Die für zwei Wochen mit CLA gefütterten Meerschweinchen reagierten mit einer geringeren Tracheenkontraktion auf den Kontakt mit den Allergenen. TURPEINEN et al. (2008) untersuchten die Wirkungen einer 12-wöchigen CLA-Supplementierung (65,3% *cis*-9, *trans*-11-CLA und 8,5% *trans*-10, *cis*-12-CLA) auf allergische Symptome und immunologische Parameter bei Patienten mit diagnostizierter Pollenallergie und konnten zeigen, dass die Allergiesymptome viel leichter bei der CLA-Gruppe im Vergleich zu der Placebo-Gruppe waren. Allerdings unterschieden sich die Allergie-Marker wie die Konzentration von IgE (Gesamt-IgE-oder Pollen-spezifisches IgE) oder IL-4 nicht zwischen den Gruppen. CLA zeigte dabei sowohl eine hemmende Wirkung auf Th1- als auch Th2-Antworten, sodass die Supplementierung zur Senkung der *Ex-vivo*-Produktion von TNF- α , Interferon- γ und IL-5 von MNC führte. Positive Wirkungen von CLA konnten des Weiteren auf Autoimmunerkrankungen beobachtet werden. So führte eine CLA-Supplementierung in einem Modell für *Lupus erythematoses* zu einem deutlich geringeren Gewichtsverlust und zu einer Verzögerung der Symptome dieser Autoimmunkrankheit (YANG et al. 2000). Anti-inflammatorische Effekte von CLA wurden auch in einem experimentellen Kolitis-Modell beobachtet (BASSAGANYA-RIERA u. HONTECILLAS 2006). In einem Mausmodell für Sepsis konnte gezeigt werden, dass eine CLA-Supplementierung für 6 Wochen den LPS-Effekt stark reduzieren konnte, was auf die Hemmung der Expression von TLR4 und CD14 auf DC zurückgeführt werden konnte. (REYNOLDS et al. 2009).

Immunmodulation durch CLA

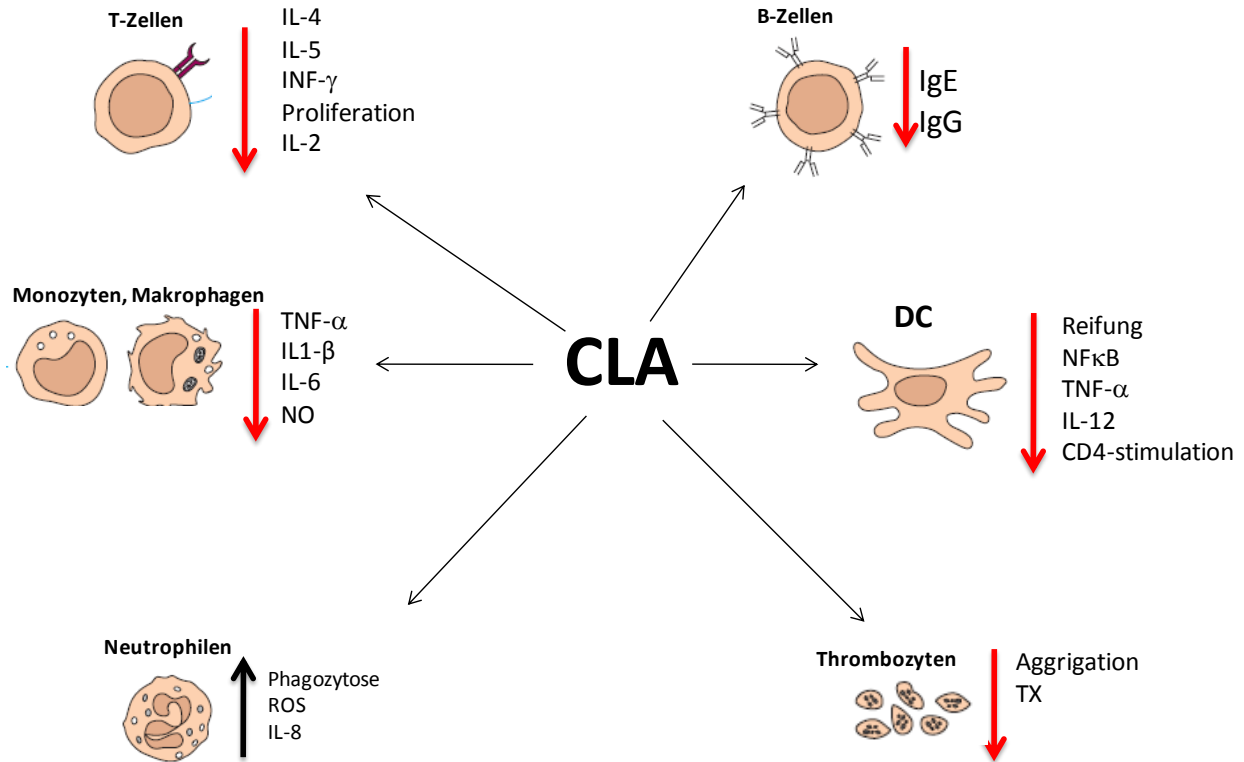


Abb. 2: Die Wirkungen von CLA auf Immunfunktionen (GOLDSBY. et al. 2004).

Dargestellt sind die in der Literatur beschriebenen aktivierenden (schwarze Pfeile) und hemmenden (rote Pfeile) Wirkungen der konjugierten Linolsäuren auf die Funktionalität verschiedener Zelltypen des Immunsystems. Die Funktionen der meisten Immunzellen (Antikörperproduktion, T-Zellproliferation und Zytokinfreisetzung), die Reifung von DC, die NO- (Stickstoffmonoxid) Produktion von Monozyten und Makrophagen sowie die Aggregation und die Freisetzung von TX (Thromboxan) von Thrombozyten werden durch CLA gehemmt. Die Phagozytose, die Bildung von ROS (reaktive Sauerstoffspezies) und von IL-8 durch neutrophile Granulozyten werden durch CLA gefördert.

2.6 Wirkungsmechanismen der konjugierten Linolsäuren

Zahlreiche Studien sowohl aus dem Tier als auch aus dem Humanbereich zeigen, dass die CLA-Isomere massiv in die Orchestrierung der Immunmechanismen eingreifen können (PARIZA et al. 2000; O'SHEA et al. 2004). Die molekularen Wirkmechanismen, die den immunmodulierenden Effekten von CLA zugrunde liegen, sind bislang nur unzureichend bekannt. Es wurden

verschiedene Hypothesen entwickelt, einschließlich der Änderungen in Struktur und Zusammensetzung der Zellmembranen (Membranfluidität), Veränderungen in der Membranvermittelten Funktionen und Signale, wie z.B. die Wirkung auf Proteine oder Eicosanoide, Veränderungen in der Genexpression und der Beeinflussung der Hämatopoiese (FIELD u. SCHLEY 2004).

2.6.1 Veränderungen der Membranzusammensetzung von Immunzellen

Veränderungen der Zellmembranzusammensetzung durch Fettsäuren und damit möglicherweise verbundenen Modifikationen der Membraneigenschaften wurden erstmals von HOY und HOLMER (1979) sowie von LAWSON et al. (1983) beschrieben. *Lipid rafts* sind dynamische Strukturen in der Phospholipid-Doppelschicht der Plasmamembran in denen mehrere Proteine gefunden wurden, die an der Signaltransduktion beteiligt sind. Die Aktivierung dieser Proteine durch extrazelluläre Liganden führt zur einer raschen Zusammengruppierung (*clustering*) dieser transmembranen Proteine nach ihrer Funktion (BROWN u. LONDON 1998; SIMONS u. TOOMRE 2000), was für die Signaltransduktion in beiden T- und B-Lymphozyten sehr entscheidend ist (PIERCE 2002; RAZZAQ et al. 2004) (Abb. 3). Bei einem Kontakt mit antigenpräsentierenden Zellen werden die T-Zellrezeptorproteine in den *Lipid rafts* zusammen gruppiert, wodurch eine "immunologische Synapse" gebildet wird, mittels derer intrazelluläre Signalwege eingeleitet werden (YAQOOB u. CALDER 2007). Auch bei der B-Zell-Aktivierung und Signaltransduktion spielen *Lipid rafts* eine große Rolle (SCHMIDT et al. 2009). Erst nach dem Kontakt mit dem Antigen kommt es zu Translokation von B-Zellrezeptoren in die *Lipid rafts* und nach ihrer Gruppierung zur Aktivierung der Zellen (PIERCE 2002). Die Aktivierung von Immunzellen wie bei der Proliferation oder Phagozytose führt zu einer erhöhten Synthese und Umsetzung von Membranphospholipiden (RESCH et al. 1972). Diese Prozesse erfordern eine ständige Zufuhr von Fettsäuren, die hauptsächlich aus der Nahrung kommen. Es wurde nachgewiesen, dass sowohl die Menge als auch die Art des Nahrungsfettes die Lipidzusammensetzung der Zellmembranen von Immunzellen beeinflussen können (PETERSON et al. 1998). In einer Humanstudie führte eine *c9-t11-CLA* angereicherte Diät zu einer Erhöhung des CLA-Anteils im Plasma und in den Membranphospholipiden von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (BURDGE et al. 2005). In einem Fütterungsversuch bei Ratten konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die CLA-Supplementierung für den Anstieg des CLA-Gehalts in den Membranphospholipiden der Splenozyten verantwortlich war (HOEK et al. 2009). Durch diese Änderungen in der Membranzusammensetzung können die Interaktionen mit anderen Zellen des Immunsystems sowie die Funktion von Proteinen und anderen Membrankomponenten

moduliert werden. Die Funktion des Immunsystems hängt von den Interaktionen zwischen den verschiedenen Zelltypen ab. Durch die Wirkungen auf die Membranzusammensetzung können die Nahrungsfettsäuren die Funktionen des Immunsystems beeinflussen (YAQOUB u. CALDER 2007). Die Ergebnisse neuer Studien deuten darauf hin, dass CLA-Isomere die essentiellen Fettsäuren, Linolsäure und Arachidonsäure, in den Membranphospholipiden ersetzen können (YAQOUB u. CALDER 2007). Änderungen der strukturellen Eigenschaften der Plasmamembranen von Immunzellen können die Aktivität von Proteinen, die als Ionenkanäle, Transporter, Rezeptoren, kostimulatorische Moleküle oder Enzyme dienen, beeinflussen (STUBBS u. SMITH 1984; HUGHES u. PINDER 2000; FIELD u. SCHLEY 2004). Eine Studie von STULNIG et al. (1998) zeigte, dass PUFAs (*polyunsaturated fatty acids*) die Proteinzusammensetzung in der inneren Lipidschicht der T-Zellmembran ändern können, was mit einer Beeinträchtigung des Calcium-Signalings verbunden war. Es konnte auch auf die funktionelle Auswirkungen dieser Veränderungen wie die Hemmung der T-Zellproliferation und der IL-2-Freisetzung hingewiesen werden (CHAPKIN et al. 2008). Auf der Ebene der antigenpräsentierenden Zelle konnte man nachweisen, dass PUFAs die Antigenpräsentation durch MHC-II- (geringere Expression auf DC) sowie durch MHC-I-Moleküle (weniger Transport an die Oberfläche von B-Zellen) reduzieren können (SANDERSON et al. 1997; SHAIKH u. EDIDIN 2007).

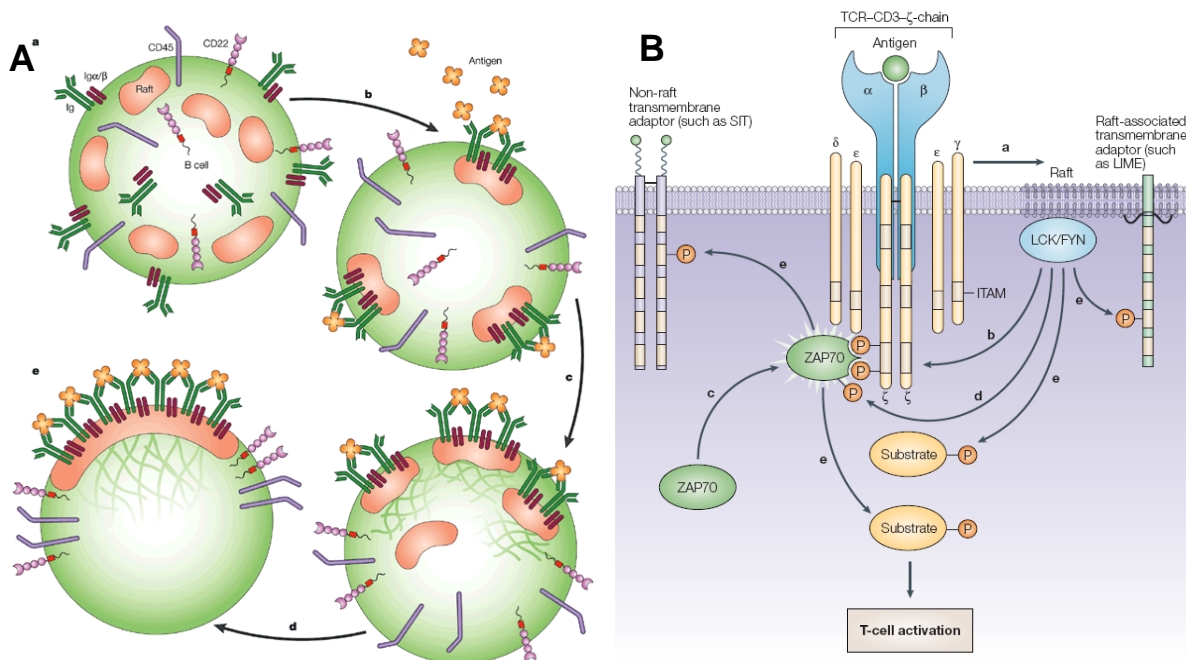


Abb. 3: Die Rolle von Lipid Rafts bei der Aktivierung von B- und T-Lymphozyten.

A) In ruhenden B-Zellen sind die B-Zellrezeptoren (*surface Ig*) außerhalb der *Lipid Rafts* lokalisiert. Erst nach dem Kontakt mit dem Antigen kommt es zur Translokalisierung und Zusammengruppierung dieser Rezeptoren, wodurch die Zellen aktiviert werden (PIERCE 2002). **B)** Nach dem Kontakt mit dem Antigen wird der TCR in *Lipid Rafts* mobilisiert, wo sich Transmembranproteine befinden, die für die Signaltransduktion notwendig sind (HOREJSI et al. 2004).

2.6.2 Einfluss von CLA auf das Eicosanoidsystem

Die in vielen Studien gezeigten anti-inflammatorischen Wirkungen von CLA-Isomeren wurden meistens auf den Ersatz von Linolsäure als Substrat für Arachidonsäure durch CLA zurückgeführt (NAKAMURA et al. 2008). Erkenntnisse aus zahlreichen Untersuchungen deuten auf die Möglichkeit hin, dass CLA physiologische Funktionen beeinflussen, indem sie den Arachidonsäuregehalt in den Membranphospholipiden verringern und somit auch die Synthese von Arachidonsäuremetaboliten, den Eicosanoiden, beeinflussen (BRETILLON et al. 1999). Nach CLA-Supplementierung im Pansen geschützter Form werden CLA-Isomere absorbiert und in Membranphospholipiden der Zellen eingebaut (KELLEY et al. 2001; KUHNNT et al. 2007). Sie konkurrieren möglicherweise mit der Linolsäure als Substrat für die Entstehung von Arachidonsäure durch das Enzym Phospholipase. Aus verschiedenen Studien geht hervor, dass die Konzentration an Arachidonsäure in den Gewebelipiden von Tieren nach Fütterung mit CLA verringert war (SIMON et al. 2000; STANGL 2000). Die Verfügbarkeit von Arachidonsäure ist von der Desaturierung der Linolsäure und α -Linolensäure durch die $\Delta 6$ -Desaturase abhängig (SPRECHER 1981). Desaturierungsprodukte dieser beiden Fettsäuren sind wichtige Bestandteile biologischer Membranlipide und nehmen Einfluss auf Membraneigenschaften (STUBBS u. SMITH 1984). Arachidonsäure stellt einen Vorläufer der Eicosanoide dar. Sie wird als Bestandteil von Membranphospholipiden durch Phospholipase A2 freigesetzt und steht dann als Substrat für Cyclooxygenasen und Lipoxygenasen zur Verfügung. Eicosanoide werden nicht wie andere Hormone in Zellen gespeichert, sondern bei Bedarf jeweils neu gebildet. Diese sogenannten Gewebshormone entwickeln schon in sehr kleinen Mengen große biologische Wirksamkeit. So spielen sie eine große Rolle im Laufe eines Immungeschehens. Studien an Zellkulturen und Tiermodellen zeigten, dass nach CLA-Behandlung die Freisetzung von Prostaglandin E2 vermindert wurde (SUGANO et al. 1998; WHIGHAM et al. 2001). In Thrombozyten hemmte CLA die Bildung von Thromboxan (TX) A2 mit anschließender Hemmung der Thrombozytenaggregation (TRUITT et al. 1999). Neue Untersuchungen zeigen, dass CLA-Isomere in diesem Zusammenhang auch das COX-Enzymsystem auf Transkriptions- und/oder Proteinebene beeinflussen (YU et al. 2002). In einer Studie bei der Maus zeigten LI et

al. (2006), dass die Supplementierung mit *t10-c12*-CLA, die Proteinmenge sowie die mRNA-Expression vom COX-2-Enzym in der Lunge stark reduzierte. Bei den CLA-Mäusen wurde die PGE₂-Freisetzung in der Lunge ebenfalls stark reduziert. Diese hemmende Wirkung von CLA konnte mit der Hemmung der NFκB-Aktivität erklärt werden. Eine Mischung von CLA-Isomeren (50:50) konnte die Expression von beiden COX-2-Synthasen und der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) in LPS-aktivierten murinen Makrophagen herab regulieren, was zur Verringerung der Produktion von Prostaglandin E₂-und NO führte (IWAKIRI et al. 2002).

2.6.3 Der nukleäre Transkriptionsfaktor PPAR γ

Aufgrund der anti-inflammatorischen Wirkung von PPAR γ -Agonisten lässt sich vermuten, dass CLA, als natürliche PPAR γ -Liganden (BOCCA et al. 2007), ihre immunmodulierenden Wirkungen, zumindest partiell, über die Aktivierung von PPAR γ entfalten. PPAR γ wird von CLA in Konzentrationen im μ -molaren-Bereich aktiviert (BELURY 2002a) und in den Zellkern translokalisiert (BOCCA et al. 2007). Die Milzzellen aus CLA-gefütterten Hühnern zeigten eine erhöhte PPAR γ -mRNA Expression im Vergleich zu den Kontrolltieren (ZHANG et al. 2006). Die Behandlung von menschlichen Endothelzellen der Nabelvene mit verschiedenen Konzentrationen beider CLA-Isomere (*c9*, *t11* oder *t10*, *c12*-CLA) führte zur Steigerung der DNA-Bindungsaktivität des Transkriptionsfaktors PPAR γ (NAKAMURA u. OMAYE 2009). In Makrophagen inhibieren CLA via PPAR γ -Aktivierung die Expression der COX-2 und iNOS (induzierbare Stickstoffoxid-Synthase) sowie die Sekretion der Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF- α (YU et al. 2002). Die anti-inflammatorischen Effekte von CLA in einem experimentellen Kolitis-Modell involvierten ebenfalls PPAR γ (BASSAGANYA-RIERA u. HONTECILLAS 2006). Im Hinblick auf den Lipidstoffwechsel und die Insulinfälligkeit zeigten CLA und Rosiglitazone, ein PPAR γ -Agonist, einen additiven Effekt (LIU et al. 2007).

PPAR γ ist ein Mitglied der Familie der *Peroxisome Proliferator-Activated Receptors* (PPARs), die aus den bisher identifizierten Isoformen PPAR α , PPAR β/δ und PPAR γ besteht und deren Aktivierung Ligand-abhängig ist (ZHANG u. YOUNG 2002; LAZAR 2005). Der Aufbau aller drei PPARs-Isoformen ist gleich (Abb. 4). Jeder Rezeptor besteht aus vier Domänen: einer Aktivierungsdomäne, einer Liganden-Bindungsdomäne, einer Hinge-Domäne und einer DNA-Bindungsdomäne (DIRADOURIAN et al. 2005). Der DNA-Bindungsdomäne folgt die Hinge-Domäne (HD), welche dem Protein eine Flexibilität hinsichtlich der Fähigkeit zur Liganden- und

DNA-Bindung ermöglicht. Weiterhin ist diese Domäne auch in der Lage mit anderen Proteinen eine direkte Protein-Interaktion einzugehen (NOLTE et al. 1998).

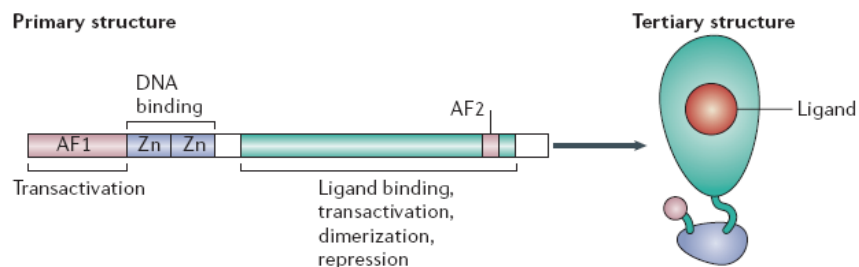


Abb. 4: Schematische Darstellung der primären und tertiären Struktur von PPAR γ ; aus GLASS und OGAWA (2006).

Jeder Rezeptor besteht aus vier Domänen: einer Aktivierungsdomäne, einer Liganden-Bindungsdomäne, einer Hinge-Domäne und einer DNA-Bindungsdomäne.

PPARs können durch unterschiedliche exogene sowie endogene Liganden aktiviert werden. Zu den wirksamsten endogenen Aktivatoren gehören Fettsäuren, Arachidonsäuremetaboliten (9-HODE, 13-HODE, 8(S)-HETE) und Eicosanoide, insbesondere das Prostaglandin-Derivat 15-Deoxy-12,14-PGJ₂ (FORMAN et al. 1997; KLIEWER et al. 1997; BISHOP-BAILEY 2000). Arzneimittel, die bei einer Erkrankung an Diabetes mellitus eingesetzt werden, die Glitazone (Thiazolidinedione), besonders Troglitazone, Pioglitazone und Rosiglitazone, gehören zu den stärksten exogenen Aktivatoren von PPAR γ (BISHOP-BAILEY 2000). Nach der Bindung an spezifische Liganden kommt es zu einer PPAR γ Konformationsänderung, sodass eine Bindung an den Retinoid-X-Rezeptor (RXR) und die Bildung eines Heterodimers möglich wird (ESCHER u. WAHLI 2000). Dieser Komplex bindet dann spezifisch an eine genau definierte DNA-Sequenz von Gen-Promotoren, welche als *Peroxisome-Proliferator-Response-Elemente* (PPRE) bezeichnet werden. Hierdurch kommt es zur Transkription von bestimmten Genen mit vermehrter Bildung der entsprechenden Proteine (SCHOONJANS et al. 1996; AUWERX 1999). Ein sehr wichtiges Zielgen von PPAR γ ist der auf Makrophagen exprimierte Rezeptor (CD36), welcher eine wichtige Rolle bei der Aufnahme von oxLDL (*oxidized low density lipoprotein*) in die Zelle und damit bei der Pathogenese der Atherosklerose spielt (NICHOLSON et al. 2001).

Neben seiner Funktion als Transkriptionsfaktor ist PPAR γ als Protein in der Lage, mit anderen nukleären Proteinen direkt zu interagieren und dadurch in verschiedene Signalwege einzugreifen (GLASS u. OGAWA 2006). Diese Funktion wird als *Transcriptional repression* bezeichnet, über die PPAR γ die Aktivität anderer Transkriptionsfaktoren blockieren kann (Abb. 5). Bisher wurden verschiedene Transrepressionsmechanismen identifiziert. Dazu gehört die Fähigkeit von PPAR γ ,

direkt an andere Transkriptionsfaktoren zu binden, wodurch ihre Translokation im Promotorbereich sowie die Genexpression regulierter Zielgene blockiert wird. Ein bekanntes Beispiel für diesen Mechanismus, der als *cross coupling* bezeichnet wird, ist die Hemmung der NF κ B, NFAT (*nuclear factor of activated T cell*), AP-1 (*activated protein-1*) und STAT (*signal transducers and activator of transcription*) vermittelten Genexpression (LEHRKE u. LAZAR 2005; VON KNETHEN et al. 2007). Für seine Funktion als Transkriptionsfaktor muss PPAR γ Koaktivatoren (Nukleärproteine) binden, welche auch essentiell für die Aktivierung weiterer Transkriptionsfaktoren sind. Nach der Aktivierung von PPAR γ stehen diese Koaktivatoren anderen Transkriptionsfaktoren wie NF κ B oder AP1 nicht mehr zur Verfügung, wodurch dessen Fähigkeit zur Induktion der entsprechenden Gene vermindert wird (KODERA et al. 2000; LI et al. 2000).

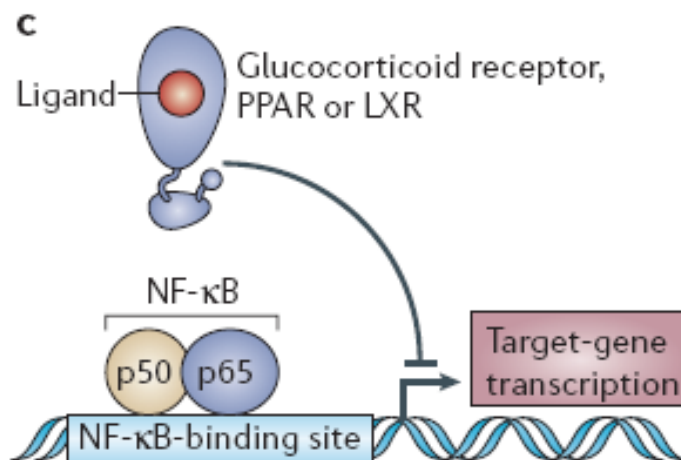


Abb. 5: Schematische Darstellung des Transrepressionmechanismus von PPAR γ ; aus GLASS u. OGAWA (2006).

PPAR γ ist in der Lage andere Transkriptionsfaktoren wie NF κ B über verschiedene Mechanismen zu blockieren.

Die Rolle von PPAR γ in Immunzellen

Die Expression von PPAR γ konnte in Monozyten (JIANG et al. 1998), Makrophagen (LEE et al. 2003a; BARISH et al. 2005), T-Zellen (CLARK et al. 2000), B-Zellen (SETOGUCHI et al. 2001), dendritischen Zellen (GOSSET et al. 2001) und neutrophilen Granulozyten (GREENE et al. 1995) nachgewiesen werden. Die Wirkungen von PPAR γ -Liganden auf den Phänotyp und die Funktion verschiedener Immunzellen wurden in vielen Studien untersucht. In Monozyten konnte

die Aktivierung von PPAR γ die IFN- γ -induzierte Produktion inflammatorischer Zytokine wie TNF- α , IL-6 und IL-1 β reduzieren (JIANG et al. 1998) und führte außerdem zur Blockierung der induzierbaren NO-Synthase, Gelatinase B (einer Matrix-Metalloproteinase) und des Scavenger Rezeptor-A (RICOTE et al. 1998). Darüber hinaus wurde die Produktion chemotaktisch wirksamer Proteine wie MCP-1 (*monocyte chemotactic protein*), VCAM (*vascular cell adhesion molecule*) oder ICAM (*intracellular adhesion molecule*) durch eine PPAR γ -Aktivierung stark gehemmt (HOUSEKNECHT et al. 2002). Neue Untersuchungen weisen darauf hin, dass PPAR γ -Rezeptoren wichtige Funktionen in der Biologie dendritischer Zellen (DC) beeinflussen können (SZATMARI u. NAGY 2008). Die aus Monozyten differenzierten DC weisen eine erhöhte Expression von PPAR γ auf (LE NAOUR et al. 2001). Die mit PPAR γ -Aktivatoren behandelten DC konnten stärker phagozytieren, jedoch weniger migrieren (APPEL et al. 2005). Es wurde gezeigt, dass PPAR γ -Liganden die Fähigkeit der DC, T-Zellen zu aktivieren, reduzieren, während die Abwesenheit von PPAR γ die DC zu potenteren Antigen-präsentierenden und T-Zell-aktivierenden Zellen macht (SZATMARI et al. 2006). Die mit PPAR γ -Agonisten behandelten humanen DC produzierten weniger IL-12 und TNF- α und exprimierten weniger CD80, jedoch mehr CD86 auf ihrer Oberfläche (NENCIONI et al. 2002). Eine Studie konnte zeigen, dass die PPAR γ -Aktivierung in murinen DC ihre Fähigkeit reduzierte, naive T-Zellen zu primen, und hingegen eine T-Zell-Anergie mit reduzierter Freisetzung von Th1 als auch Th2 Zytokinen induzierte (KLOTZ et al. 2007). Eine aktuelle Genexpression-Studie hat gezeigt, dass nach der Behandlung von DC mit PPAR γ -Liganden mehr als 100 Gene induziert werden. Während die meisten der früh aktivierten Gene im Lipidstoffwechsel beteiligt sind, wurden immunrelevante Gene erst nach 24 Stunden oder später (5 Tage) induziert. Dies deutet darauf hin, dass die PPAR γ -Aktivierung den Lipidstoffwechsel direkt, die Immunmechanismen jedoch indirekt beeinflusst (SZATMARI et al. 2007). Die Expression von PPAR γ konnte sowohl in CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen nachgewiesen werden (CUNARD et al. 2004). Die ruhenden T-Zellen zeigen eine moderate Expression von PPAR γ , welche jedoch nach Mitogen-Aktivierung der T-Zellen deutlich gesteigert werden konnte (TAUTENHAHN et al. 2003). Die Aktivierung von PPAR γ durch ihre Liganden kann in T-Zellen zur Hemmung der Proliferation als auch der T-Zell-Aktivierung führen, was auf die PPAR γ -vermittelten Transrepression der Transkriptionsfaktoren NF κ B, NFAT und AP-1 zurückgeführt werden konnte (WANG et al. 2001; MARX et al. 2002; MARX et al. 2004). So wird z. B. die Produktion von IL-4 in CD4⁺ T-Zellen durch die Aktivierung von PPAR γ und ihre Bindung an NFAT gehemmt (CHUNG et al. 2003). Eine Liganden-induzierte PPAR γ -Aktivierung führte in murinen T-Zellen durch

Interferenz mit dem Transkriptionsfaktor AP1 zur reduzierten IFN- γ -Expression, was durch PPAR γ -Antagonisten wieder gesteigert werden konnte (CUNARD et al. 2004). In einer Studie von KLOTZ et al. (2009) wurde auf eine selektive Hemmung von Th17-Zellen durch PPAR γ -Aktivierung hingewiesen. So führte die Aktivierung von T-Zellen mit Anti-CD3/CD28 Antikörpern in einer Kokultur mit APC in Anwesenheit des PPAR γ -Aktivators Pioglitazon zu einer Suppression von Th-17-Zytokinen (IL-17, IL-22, IL-21), während die TGF- β -vermittelte Induktion von Foxp3⁺ regulatorischen T-Zellen, die IL-4-vermittelte Ausdifferenzierung von Th2-Zellen oder die IL-12-induzierte Entwicklung von Th1-Zellen nicht beeinflusst wurden (KLOTZ et al. 2009). Eine physiologische Rolle für PPAR γ in der B-Zell-Physiologie ist durch eine erhöhte proliferative Antwort nach der Stimulation mit LPS oder nach der Überbrückung des B-Zellrezeptors sowie eine verbesserte antigenspezifische Immunantwort von B-Zellen aus PPAR γ -haplo-insufficient Mäusen (PPAR $\gamma^{+/-}$) vermutet worden (SETOGUCHI et al. 2001). Untersuchungen an murinen B-Zellen und in Zellkulturen ergaben eine pro-apoptotische und anti-proliferative Wirkung von PPAR γ -Liganden (PADILLA et al. 2002). Neben der anti-inflammatorischen bzw. anti-proliferativen Funktion von PPAR γ wurde auch die Induktion der Apoptose in Lymphozyten generell und speziell in T-Zellen gezeigt (HARRIS u. PHIPPS 2001; NENCIONI et al. 2003; TAUTENHAHN et al. 2003). Dabei ist es entscheidend, ob die PPAR γ -Aktivierung während oder nach der T-Zell-Aktivierung erfolgt. So konnte nach einer gleichzeitigen Inkubation von T-Zellen mit PPAR γ -Liganden und T-Zell-aktivierenden Substanzen wie PHA eine Hemmung der Proliferation, aber keine Apoptose-Induktion gezeigt werden (NENCIONI et al. 2003; TAUTENHAHN et al. 2003). Diese pro-apoptotische Funktion von PPAR γ in Lymphozyten konnte auch unter Verwendung von PPAR γ -Antagonisten wie z. B. GW9662 bestätigt werden (BODLES et al. 2006).

3 Geräte, Material und Methoden

3.1 Geräte

Aquadest. Aufbereitungsanlage Umkehr-Osmose Anlage, „Typ RO 50/14SMB Typ I“	(Wasser und Regenerierstation, Barsbüttel)
Aqua tridest. Aufbereitungsanlage „SG Reinstwasser System Typ SG-RS90-4 UF“	(Wasser- und Regenerierstation, Barsbüttel)
Autoklav Typ GE406	(Getinge AB, Getinge/Schweden)
Brutschrank mit CO ₂ -Begasung, Baureihe 5060	(Heraeus, Hanau)
Bunsenbrenner mit automatischer Zündung	(Wartewig (6.001.000), Göttingen)
Centricon® – Filtrationssystem	(Amicon, Beverly/MA, USA)
CO ₂ -Flasche zur Sterilfiltration	(Kohlensäurewerke Hannover, Hannover)
Druckbehälter zur Sterilfiltration „stainless steel pressure vessel“	(Alloy Products (XX670053) Wisconsin, USA)
Eismaschine Typ UBE 30-10	(Ziegra, Isernhagen)
ELISA-Platten Wascherät	(Dynatech, Denkendorf)
Fluoreszenz-Durchflusszytometer, Modell FACScan®, mit angeschlossener Computereinheit	(Becton Dickinson, Heidelberg)
Fluoreszenzmikroskop mit Ploemilluminator und Phasenkontrasteinrichtung	(Zeiss (476250-9901), Oberkochen)
LKB Wallac 1273 Clinigamma (Gamma-Counter)	Ehem. Wallac Oy, Turku, Finnland, Perkin Instruments, Rodgau
Heißluftsterilisator „Typ ST5050“	(Heraeus, Hanau)
Invertmikroskop	(Zeiss, Oberkochen)
Kühlschrank mit Gefrierfach (-20°C)	(Einzelhandel)
Kühlzentrifuge Varifuge K mit Tragwinkelrotor, Hochgeschwindigkeitsaufsatz und Mikrotiterplattenrotor	(Heraeus Instruments, Osterode)
Laborfeinwaage „B6“	(Mettler, Zürich/Schweiz)
Labor-pH-Meter „766 Calimatic“	(Knick, Berlin)
Laborwaage „BL310“	(Sartorius GmbH, Göttingen)
LightCycler®	(Roche Diagnostics, Mannheim)
Magnetrührer mit Heizplatte	(Janke und Kunkel, Staufen)
Mikrotiterplatten-Filterphotometer ELISA-Reader Dynatech MR 5000	(Dynatech, Denkendorf, Kontakt: Dynex Technologies, USA)
NanoDrop®, ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer	(Thermo Fisher Scientific, Bremen)

Photometer	(Eppendorf, Hamburg)
Pinzette, gebogen, anatomisch	(Eickemeyer (170710), Tuttlingen)
Pipette, einstellbar „Transferpette [®] “ (2-20 µL)	(Brand (09U2539), Wertheim)
Pipetten, einstellbar „pipetman“ (1-20 µL, 10-100 µL, 20-200 µL, 100-1000 µL)	(Gilson, Villers Le Bel/Frankreich)
Pipettierhilfe „accu-jet [®] “	(Brand (26404), Wertheim)
Plastikbox mit Gittereinsatz	(Einzelhandel)
Plattenzentrifuge mit Plattenrotor (UJ II KS)	(Heraeus-Christ, Osterode)
Reinwerkbank Laminair HL2448	(Heraeus-Christ, Hanau)
Rüttler für Mikrotiterplatten „AM69 Microshaker“	(Dynatec, Zug/Schweiz)
Schlauchpumpe zum Absaugen von Flüssigkeiten „Rumo100“	(Heidolph (52100), Schwabach)
Schüttelinkubator RS 90-4 UF	(SG Barsbüttel)
Tiefkühltruhe -80°C	(Kendro, Hanau)
Tischzentrifuge „Chemico“ mit Winkelmotor	(Wifug (10209), Bradford/England)
Tischzentrifuge „Hermle Z230M“	(Hermle, Gosheim)
Wasserbad mit Temperaturregelung „Typ 1003“	(GFL, Hannover)
Zählkammer nach Bürker	(Brand, Wertheim)
Zentrifuge „Megafuge 1.0R“	(Heraeus Instruments, Osterode)

3.2 Material

3.2.1 Klinikbedarf

Kanülen 1,80 x 40 mm, steril „TSK STERIJECT“	(TSK-Supra, Tochigi/Japan)
Staukette nach Witte	(Eickemeyer (442015), Tuttlingen)
Vacutainer Brand Luer Adapters	(Becton Dickinson (367300), Heidelberg)
Vacutainererröhrchen, 10 ml, EDTA-K2 (18 mg)	(Becton Dickinson (367525), Heidelberg)
Vacutainererröhrchen, 10 ml, Heparin (170 IU)	(Becton Dickinson (368480), Heidelberg)
Vacutainererröhrchen, 10 ml, ohne Zusatz	(Becton Dickinson (368430), Heidelberg)

3.2.2 Laborbedarf

Abdeckung für PCR-Platten optical adhesive covers	(Applied Biosystems, Darmstadt)
Combitips, 1,25 ml	(Eppendorf (0030069.420), Hamburg)
Combitips, 2,5 ml	(Eppendorf (0030069.447), Hamburg)
Einmal-Filter, Celluloseacetate Membrane, 0,2 µm, steril	(Renner (26146040), Dannstadt)

Einmal-Küvetten 2,5 ml makro PMMA	(Brand, Wertheim)
Einmal-Pasteurpipetten aus Pe-Ld	(Merck (612F1767), Darmstadt)
Eppendorf-Reaktionsgefäß, 0,5 ml	(Sarstedt (72699), Nürnbergrecht)
Eppendorf-Reaktionsgefäß, 1,5 ml	(Greiner (616201), Frickenhausen)
Flachboden-Mikrotiterplatten mit Abdeckung, 96 Vertiefungen	(Biochrom (P92960), Berlin)
Flachboden-Mikrotiterplatten, Nunc Immuno Plate, ELISA	(Nunc (363-401), Wiesbaden)
Laborflaschen mit Gewinde, 500 ml	(VWR International (215L1516), Hannover)
MACS Pre-Separation Filters	(Miltenyi Biotec (130-041-407), Bergisch Gladbach)
MACS Säulen LS Columns	(Miltenyi Biotec (130-042-401), Bergisch Gladbach)
Neutralit [®] - pH 5-10, pH-Indikatorstäbchen nicht blutend	(Merck (1.09533), Darmstadt)
Pasteurpipetten, 22,5 mm aus Glas	(Brand (747720), Wertheim)
PCR-Platten Micro Amp TM Fast 96-well plate	(Applied Biosystems, Darmstadt)
PCR-Reaktionsgefäß, 0,2 ml	(Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf)
Petrischalen 94 mm Durchmesser	(Greiner(616222), Frickenhausen)
Pipettenspitzen, gelb und blau	(Sarstedt (70/762002) (70/760002), Frickenhausen)
Polycarbonat-Membran 25 x 80 mm, 3 µm Porengröße, PVP Membranen	(Cytogen (155812), Ober-Mörlen)
Polystyrolröhrchen	(Nerbe Plus (62 161 0000) Winsen/Luhe)
Röhrchen für die Durchflusszytometrie, 5 ml	(Becton Dickinson (352008), Heidelberg)
Rundboden-Mikrotiterplatten mit Abdeckung; steril, 96 Vertiefungen	(Gechno Plastic Products TPP [®] , Trasadingen/Schweiz)
Saugpipetten, 10 ml	(Sarstedt (86.1254.01), Nürnbergrecht)
Tesafilm-Klebeband	(Einzelhandel)
Zentrifugenröhrchen, 50 ml aus Polypropylen (Falcons, steril)	(Corning (430829), Wiesbaden)
Zentrifugenröhrchen, 15 ml aus Polypropylen (steril)	(Sarstedt (62.554.502), Nürnbergrecht)

3.2.3 Reagenzien

Acridin-Orange	(Sigma-Aldrich (A-6014), Steinheim)
Bovines Serumalbumin	(Sigma-Aldrich, (A-7906), Steinheim)

Concavalin A (ConA)	(Amersham Bioscience (17-0450-01), Freiburg)
Deoxynucleotide Triphosphates (dNTPs)	(Promega (41221), Mannheim)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	(Sigma-Aldrich (D-5879), Steinheim)
Di-Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	(Sigma-Aldrich (S-0876), Steinheim)
EDTA(Ethylendiamine-Tetraacetic Acid)	(Sigma, (27270), Seelze)
Ethanol 641, absolut, vergällt	(CG Chemikalien, Laatzten)
Ethidiumbromid	(Sigma-Aldrich (E87A51), Steinheim)
FCCP (Carbonylcyanide-4-(trifluoromethoxy)-phenylhydrazone)	(Sigma-Aldrich (C-2920), Steinheim)
Fetales Kälberserum (FCS), Virus-und Mykoplasmen-getestet	(Biochrom (S0 113/431B), Berlin)
Fluoreszein Isothiocyanate (FITC)	(Sigma-Aldrich (F7250), Steinheim)
Formaldehyd 37%, p.a., ACS, Rotiuran [®]	(Roth (49794.1), Karlsruhe)
Iscove [®] DMEM mit L-Glutamin	(PAA Laboratories (E15-819), Linz/Österreich)
JC-1 (5'5'6'6' Tetrachloro-1'1'3'3' Tetraethylbenzimidazol-Carbocyanin Jodid)	(Invitrogen (T-3168), Karlsruhe)
Kaliumchlorid (KCl), kristallin	(Biochrom (T046-10), Berlin)
Kupfer(II)-sulfat-5-hydrat	(Roth (8174.1), Karlsruhe)
L-Arginin	(Sigma-Aldrich (A5131), Steinheim)
L-Glutamin	(Biochrom (K0283), Berlin)
L-Histidin	(Sigma-Aldrich (8776), Steinheim)
Lymphozytenseparationsmedium	(PAA Laboratories (J15-004), Linz/Österreich)
Natriumacetat (Na-Acetat)	(Sigma-Aldrich (S-2889), Steinheim)
Natriumazid (NaN_3), 10%ig	(Sigma-Aldrich (S-2002), Steinheim)
Natriumcarbonat (Na_2CO_3)	(Sigma-Aldrich (S-2127), Steinheim)
Natriumchlorid (NaCl)	(Roth (9265.2), Karlsruhe)
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_2)	(Sigma-Aldrich (S-63295), Steinheim)
Natriumhydroxyd-Pellets (NaOH), wasserfrei	(Sigma-Aldrich (S-5881), Steinheim)
Oligo (dt) 12-18 Primer	(Invitrogen (18418-012), Karlsruhe)
Penicillin-Streptomycin-Glutamine-Lösung liquid100fach konzentriert	(Invitrogen (10378-016), Karlsruhe)
PPAR γ -Antagonist GW9662	(Axxora (CAS 22978-25-2) Grünberg)
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) Dulbecco, ohne $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$	(Pharmacia (17089101), Freiburg)

Propidiumjodid (PI)	(Calbiochem (537059), Bad Soden)
Prostaglandin J2	(Sigma-Aldrich (P-6999), Steinheim)
RPMI liquid mit HEPES und L-Glutamin	(Calbiochem (537059), Bad Soden)
RNeasy Mini Kit	(QIAGEN GmbH (74106), Hilden)
RNaseOUT™ Ribonuclease Inhibitor	(Invitrogen (10777-019), Karlsruhe)
RNase/DNase-freies Wasser	(Sigma Aldrich (W4502), Steinheim)
RNase-Free DNase Set	(QIAGEN GmbH (79254), Hilden)
SuperScript™ II Reverse Transkriptase	(Invitrogen (18064-014), Karlsruhe)
SYBR Green® PCR Master Mix	(Applied Biosystems (4309155), Darmstadt)
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	(Baker (6081), Deventer/Holland)
Staphylokokken-Enterotoxin A (SEA), lyophilisiert	(Roth (9316), Karlsruhe)
Staphylokokken-Lösung, Pansorbin®	Calbiochem (507858), Bad Soden
Titramethylbenzidin (TMB)	(Biochrom (A331-27), Berlin)
Tri-Natriumcitrat (2xH ₂ O)	(Serotec (PBP 005), Oxford, UK)
Tween 20	(Invitrogen (15596-026), Karlsruhe)
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	(Sigma-Aldrich (P 1379), Steinheim)
<i>Cis</i> 9, <i>trans</i> 11-CLA	(Matreya LLC (1245) Pleasant Gap, USA)
<i>Trans</i> 12, <i>cis</i> 10-CLA	(Matreya LLC (1249) Pleasant Gap, USA)

3.2.4 Versuchstiere und Versuchsaufbau

Die vorliegende Arbeit untersucht Auswirkungen der konjugierten Linolsäure auf das bovine Immunsystem, wozu zwei Fütterungsversuche über 252 (Versuch I) und 105 Versuchstage (Versuch II) sowie weitere *In-vitro*-Versuche durchgeführt wurden.

Versuch I (Basisversuch)

Für diesen Versuch standen in der Versuchsstation Braunschweig der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL) 49 Tiere (33 Kühe und 16 Färsen) der Rasse Deutsche Holstein zur Verfügung. Die Tiere wurden in einem Boxenlaufstall gehalten und zweimal täglich gemolken. Die Untersuchungen begannen jeweils 21 Tage vor dem erwarteten Abkalbungstermin und umfassten den gesamten Zeitraum einer Laktation. Für alle Tiere erfolgte eine einheitliche Vorbereitungsfütterung. Die Tiere erhielten eine Mischration, die aus 37% Konzentrat (Mischung aus überwiegend Getreide, Soja- und/oder Rapsschrot) und 63% Silage (60% Mais- und 40% Grassilage auf Trockenmasse (T)-Basis) bestand. Die Mischration wurde *ad libitum* angeboten. Zusätzlich bekamen die Kühe über automatische Abrufstationen 4 kg/Tag Konzentrat zugeteilt,

welches das CLA-Gemisch enthielt. Weitere Fremdfette wurden nicht eingesetzt. Das Kraftfutter wurde pelletiert. Für die Gesamtration wurde ein Grundfutter-Kraftfutter-Verhältnis von 50:50 auf T-Basis angestrebt. Trinkwasser stand den Tieren zur freien Aufnahme zur Verfügung. Die Zusammensetzung des Kraftfutters bzw. der Konzentrate, die den Tieren in diesem Versuch angeboten wurden, sind in Tab. 1 aufgeführt.

Tab. 1: Zusammensetzung der verwendeten Konzentrate.

	Konzentrat für CLA-Gruppen (%)	Konzentrat für Kontrollgruppe (%)
Weizen	38,5	38,5
Trockenschnitzel	29,0	29,0
Rapsextraktionsschrot	20,0	20,0
Sojaextraktionsschrot	6,50	6,5
Sojaöl	1,0	1,0
Calciumkarbonat	0,5	0,5
Mineral- und Vitaminprämix	2,0	2,0
Pansenstabiles CLA-Gemisch	2,5	-
Hüllsubstanz der CLA-Ergänzung	-	2,5

Die Tiere wurden zu Versuchsbeginn unter Berücksichtigung der Leistung in der Vorlaktation, der Lebendmasse und der Laktationsnummer in drei Gruppen eingeteilt. Das CLA-Gemisch wurde den Tieren ab dem Abkalbungstag (d0) in nachfolgenden Mengen gegeben (siehe Tab. 2).

Tab. 2: Gruppen des Basisversuches und supplementierte CLA-Mengen.

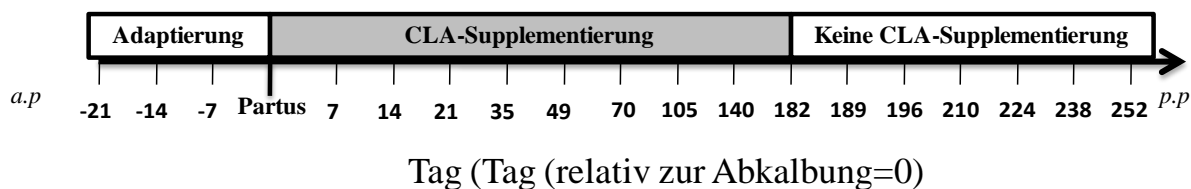
Gruppe	CLA-Gemisch	C9,t11 im Gemisch	T10,c12 im Gemisch	Färsen	Kühe
Kontrollgruppe	ohne	ohne	ohne	6	11
CLA-50 Gruppe	50g/Tier u Tag	5g/Tier u Tag	5g/Tier u Tag	5	11
CLA-100 Gruppe	100g/Tier u Tag	10g/Tier u Tag	10g/Tier u Tag	5	11

Das in den Versuchen verwendete Fett-Gemisch hatte die in Tab. 3 gezeigte Fettsäurezusammensetzung.

Tab. 3: Fettsäuremuster des verwendeten Fett-Gemisches (Anteil in %).

Fettsäure	Kontrollgruppe	CLA-Gruppe
C-16:0	10,89	10,89
C-18:0	87,30	50,31
C-18:1c9	< 0,01	10,66
CLA- c9, t11	0,06	11,99
CLA-t10, c12	0,02	11,88
Andere CLA-Isomere	0,15	0,95
Andere Fettsäuren	1,58	3,32

Das CLA-Gemisch wurde ab Tag 182 p.p. abgesetzt (Absetzungstermin). Die Entnahme von Blutproben erfolgte an den Tagen 21, 14 und 7 vor der Abkalbung, unmittelbar nach der Abkalbung sowie an folgenden Tagen nach der Abkalbung: 7, 14, 21, 35, 49, 70, 105, 140 und 182 p.p. Nach Absetzen des CLA-Gemisches wurden alle Tiere während der Depletionsphase über mindestens 60 Tage, evtl. bis zum Trockenstellen, weiter geprobt (14, 28, 56 d nach CLA-Absetzen). Milchproben wurden ab dem Tag 14 p.p. und bis zum Tag 252 p.p. parallel zu Blutproben gewonnen.

**Abb. 6: Aufbau des ersten CLA-Fütterungsversuchs (Basisversuch).**

Die Supplementierung mit dem CLA-Gemisch erfolgte ab dem Abkalbungstag und dauerte bis zum Tag 182 nach der Abkalbung.

Versuch II (Schlachtversuch)

Für die ergänzende Gewinnung von Proben wurden in der Versuchsstation Braunschweig der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft 27 Tiere der Rasse Deutsche Holstein aufgestellt. Die Tiere wurden in einem Boxenlaufstall gehalten und zweimal täglich gemolken. Die Untersuchungen begannen 21 Tage vor dem erwarteten Abkalbetermin. Die Tiere erhielten wie im Versuch I eine Mischration, die aus 37 % Konzentrat und 63 % Silage (60 % Mais- und 40% Grassilage auf Trockenmasse (T)-Basis) bestand. Die Mischration wurde *ad libitum* angeboten.

Zusätzlich bekamen die Kühe über automatische Abrufstationen 4 kg/Tag Konzentrat zugeteilt, welches das CLA-Gemisch enthielt. Das Kraftfutter wurde pelletiert verfüttert. Für die Gesamtration wurde ein Grundfutter-Kraftfutter-Verhältnis von 50:50 auf T-Basis angestrebt. Trinkwasser stand zur freien Aufnahme zur Verfügung. Die Tiere wurden zu Versuchsbeginn in zwei Gruppen eingeteilt. Eine Gruppe wurde ohne Zusatz gefüttert. Die andere bekam zusätzlich das CLA-Gemisch. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse des Versuchs I wurde eine Menge von 100 g CLA (10 g c9,t11 und 10 g t10,c12) pro Tier und Tag für den zweiten Versuch festgelegt. Die Supplementierung begann ab dem Tag der Abkalbung und endete mit der Schlachtung des Tieres. Blutproben für die *Ex-vivo*-Untersuchung wurden an den Tagen 21, 14, 7 und 3 vor der Abkalbung sowie an den Tagen 1, 7, 14, 21 nach der Abkalbung gewonnen.

3.2.4.1 Spendertiere zur Blutgewinnung für die *In-vitro*-Versuche

Bei den Tieren, deren Blut zur Zellgewinnung entnommen wurde, handelte es sich um ausschließlich weibliche Tiere der Rasse „Deutsche Schwarzbunte“, Typ Holstein-Friesian. Das Alter lag zwischen 5 und 7 Jahren. Alle verwendeten Tiere waren klinisch gesund und stammten entweder aus der Klinik für Rinder der Tierärztlichen Hochschule Hannover oder aus dem Lehr- und Forschungsgut (Ruthe) der Tierärztlichen Hochschule Hannover.

3.2.5 Antikörper

Für die Bestimmung von IgG-Isotypen im Serum und Milchserum beim Rind wurden die im Tab. 4 dargestellten Antikörper und Referenzseren aus der Firma Bethyl (Montgomery, USA) verwendet.

Tab. 4: Antikörper für die Bestimmung von Ig-Isotypen im ELISA.

Name	Isotyp	Katalog.Nr	Konzentration
<i>Coating</i> -Antikörper			
Sheep-anti-bovine IgG1	IgG	A10-116A	1 µg/ml
Sheep-anti-bovine IgG2	IgG	A10-117A	1 µg/ml
Nachweis-Antikörper			Verdünnung
Sheep-anti-bovine IgG1 (HRP)	IgG	A10-116A	1:20.000
Sheep-anti-bovine IgG2 (HRP)	IgG	A10-117P	1:20.000
Reference Serum			
Bovine Reference Serum		RS10-103	

Für die Immunphänotypisierung boviner Leukozyten wurden monoklonale Antikörper der Firma AbD Serotec verwendet. Für die Herstellung von Referenzzellen wurde der Antikörper Bo 1 verwendet und mit dem Sekundäntikörper, einem FITC gekoppelten Ziege-anti-Maus-IgG und IgM in einer 1:40-Verdünnung nachgewiesen. Eine Übersicht der verwendeten Antikörper und deren Spezifitäten ist in Tab. 5 dargestellt.

Tab. 5: Antikörper für die Membranimmunfluoreszenz.

Name (Laborcode)	Spezifität	Donor/Isotyp	Kopplung	Verdünnung ¹	Referenz
MCA1653F	bovines CD4	Maus/IgG _{2a}	FITC	1:50	(BENSAID u. HADAM 1991)
MCA837PE	bovines CD8	Maus/IgG _{2a}	RPE	1:6	(GUTIERREZ et al. 1999)
MCA1568PE	humanes ² CD14	Maus/IgG _{2a}	RPE	1:50	(YOSHINO et al. 2000)
MCA2226F	ovines ² MHCII	Maus/IgG _{2a}	FITC	1:40	(BALLINGALL et al. 1995)
MCA838F	bovines WC1	Maus/IgG _{2a}	FITC	1:100	(GUTIERREZ et al. 1999)
Bo 1	anti-MHC-I	Maus/IgG ₁	Keine	1:1	Schuberth (1991)

1) Die Verdünnung erfolgte in MIF-Puffer (3.2.6.3). 2) kreuzreaktiv mit dem homologen bovinen Molekül. Der Hersteller und die angegebene Referenz beschreiben eine Kreuzreaktivität für Rinder.

3.2.6 Kulturmedien, Puffer und Lösungen

Alle Kulturmedien, Puffer und Lösungen wurden, wenn nicht anders angegeben, in *Aqua tridest.* angesetzt.

3.2.6.1 Zellkulturmedien und Zusätze

Für die Kultivierung von Leukozyten wurden die Medien RPMI und Iscove´ (3.2.3) verwendet. Um Komplementaktivität auszuschließen und eventuell vorhandene Mykoplasmen abzutöten, wurde das eingesetzte fetale Kälberserum (FCS, 3.2.3) bei 56°C für eine Stunde inkubiert. Ein mit Penicillin/Streptomycin versetztes Medium (3.2.3) wurde mit einem hochgestellten ‚+‘-Zeichen gekennzeichnet.

Iscove[®]-Medium mit 10%(v/v) fetalem Kälberserum (I10F⁺) (3.2.3):

Iscove [®] DMEM mit L-Glutamin	500	ml
Fetales Kälberserum (hitzeinaktiviert)	10	% (v/v)
Amphotericin, Penicillin, Streptomycin	10	mg

RPMI-Medium mit 10% (v/v) fetales Kälberserum (R10F⁺) (3.2.3):

RPMI [®] liquid mit Hepes u. L-Glutamine	500	ml
Fetales Kälberserum (hitzeinaktiviert)	10	% (v/v)
Amphotericin, Penicillin, Streptomycin	10	mg

Isomere der Konjugierten Linolsäure- (CLA-Isomere) Stammlösungen

Die Stammlösung jedes CLA-Isomers (3.2.3) wurde nach Angaben des Herstellers in Dimethylsulfoxid (DMSO) in einer Verdünnung von 50 mmol/l angelegt. Die Stammlösung wurde in Aliquoten bei -20°C aufbewahrt.

Superantigen-Stammlösung

Das Superantigen, *Staphylococcus aureus* Enterotoxin A (SEA), wurde in einer Konzentration von 10 µg/ml in I10F bei -20°C aufbewahrt.

3.2.6.2 Material für die Separation von Zellen

Lymphozytenseparationsmedium[®]

Bei Lymphozytenseparationsmedium[®] (3.2.3) handelt es sich um eine isotone, wässrige Lösung aus Natriumdiatrizoat und einen hochmolekularen Zucker mit Zusatz des Röntgenkontrastmittels Isopaque. Bei 10°C besitzt das Separationsmedium eine Dichte von 1,077 g/ml. In dieser Arbeit wurde das Lymphozytenseparationsmedium[®] unverdünnt verwendet.

Natriumchloridlösung, 0,9%

NaCl	8,77	g
<i>Aqua tridest. ad</i>	1000	ml

Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) ohne EDTA

Die PBS-Trockensubstanz (3.2.3) wurde in *Aqua tridest.* gelöst. Es wurden folgende Bestandteile eingewogen:

NaCl	8,0	g
KCl	1,24	g
Na ₂ HPO ₄	0,2	g
KH ₂ PO ₄	0,2	g
<i>Aqua tridest.</i> ad	1000	ml

Der Puffer hatte einen pH-Wert von 7,4 und wurde bei 4°C gelagert.

Phosphatpuffer, doppelt konzentriert (2 x PBS)

Zur Herstellung wurde die doppelte Menge an PBS-Trockensubstanz eingesetzt (3.2.3) und mit *Aqua tridest.* auf 1000 ml ergänzt.

3.2.6.3 Lösungen für die Durchflusszytometrie

Zur Reinigung des Gerätes wurde das Messkanalsystem nach den Messungen mit steril filtriertem *Aqua tridest.* (0,2 µm) und 1%iger Natriumhypochlorit-Lösung (3.2.3) gespült.

Trägerflüssigkeit

Als Trägerflüssigkeit für die durchflusszytometrische Messung wurde steril filtriertes (0,2 µm) PBS mit 0,1 mg/ml NaN₃ (Natriumazid) verwendet (3.2.3).

Propidiumjodid-Stammlösung

Die Stammlösung von 100 µg/ml Propidiumjodid (3.2.3) gelöst in Trägerflüssigkeit wurde in Aliquoten bei -20°C gelagert. Zum Anfärben toter Zellen wurden der Trägerflüssigkeit entsprechende Teile der Stammlösung zugesetzt, um eine Endkonzentration von 4 µg/ml zu erreichen.

JC-1-Stammlösung

Der für die Apoptosebestimmung verwendete Farbstoff 5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3'-Tetraethylbenzimidazol-Carbocyanin Jodid (JC-1) wurde in einer Stockkonzentration von 2 mol/L in DMSO aufgenommen und in Aliquoten von 20 µl bei -20°C eingefroren. JC-1 wurde mit PBS verdünnt und in einer Konzentration von 7 µmol/L eingesetzt

Wasch- und Verdünnungspuffer für die Membranimmunfluoreszenz (MIF-Puffer)

Bovines Serumalbumin	5,0	g
Natriumazid (NaN ₃)	0,1	g
PBS ad	1000,0	ml

Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

3.2.6.4 Puffer und Lösungen für den ELISA

Beschichtungspuffer (A-Puffer), pH 9,6

Na ₂ CO ₃	5	mmol/L
NaHCO ₃	35	mmol/L

Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

Wasch- und Verdünnungspuffer (B-Puffer), pH 7,2

NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	2,5	mmol/L
Na ₂ HPO ₄	7,5	mmol/L
NaCl	145,0	mmol/L
Tween 20	0,1	% (v/v)

Der Puffer wurde als 10-fach konzentrierte Stocklösung angesetzt und vor der Verwendung auf die Gebrauchskonzentration eingestellt. Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

Substratpuffer (C-Puffer), pH 5,0

Citrat	33,3	mmol/L
Na ₂ HPO ₄	66,7	mmol/L

Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

Alle Puffer wurden mit 1N HCL bzw. 3N NaOH (3.2.3) auf den jeweiligen pH-Wert eingestellt.

Substratlösung

TMB in DMSO	15	mmol/L
H ₂ O ₂	5	mmol/L

Die Lagerung von TMB erfolgte bei einer Temperatur von -20°C. Die Substanzen wurden unmittelbar vor der Verwendung in C-Puffer gelöst.

3.2.6.5 Puffer und Lösungen für die RT-PCR

TE-Puffer, pH 7,5

Tris	10,0 mmol/L
EDTA	1,0 mmol/L

Der Puffer wurde 20 Min. bei 123°C und 2,8 bar autoklaviert, aliquotiert und bei RT gelagert.

3.2.6.6 Primer

Die Oligonukleotid-Primer wurden aufgrund von bereits veröffentlichten Sequenzen ausgewählt. Bezogen wurden alle Primer von der Firma MGW aus Ebersberg. Die optimale Konzentration der Primer im StepOnePlus-PCR System (3.1) wurde durch eine vom Hersteller beschriebene Primer-Optimierung ermittelt. Die Sequenzen der verwendeten Primer, die eingesetzte Konzentration sowie die Länge des Amplikons und die Referenzen sind in Tab. 6 dargestellt.

Tab. 6: Primer-Sequenzen.

Gen	Primer und verwendete Konzentrationen (nm/L)	Länge des Amplikons (bp)	Referenz
IL-4	for GCC ACA CGT GCT TGA ACA AA (900) rev TGC TTG CCA AGC TGT TGA GA (50)	63	(ALMEIDA et al. 2007)
IFN- γ	for TTC AGA GCC AAA TTG TCT CCT TC (300) rev AGT TCA TTT ATG GCT TTG CGC TG (50)	205	(NEUVIANS et al. 2004)
IL-17	for TGA GTC TGG TGG CTC TTG TG (300) rev GTG GAG CGC TTG TGA TAA TCG (50)	163	(Acc. Nr. NM-001008412)
IL-12	for TGG TCG TTT CCT GGT TTT CC (300) rev GTT TTG CCA GAG CCC AAG AC (300)	205	1)
IL-10	for CCT TGT CGG AAA TGA TCC AGT TTT (300) rev TCA GGC CCG TGG TTC TCA (300)	67	(ALMEIDA et al. 2007)
PTX3	for GGATTCAAAGAAAGGGCACATG (300) rev GTTCTTTTCTTGCCCAATCTGC (300)	124	(Acc. Nr. NM-00107625)
PPAR γ	for AAGAATATCCCCGGCTTTGT (300) rev TTGGGCTCCATAAAGTCACC (300)	200	(Acc. Nr. NM-181024)

For (Vorwärts-) und rev (Rückwärts-) Primer; Acc. Nr.: Access Nummer für neu entwickelte Primer. 1) die Primersequenzen wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Hans-Martin Seyfert, FBN Dummerstorf, zur Verfügung gestellt.

3.3 Methoden

3.3.1 Gewinnung von venösem Blut

Das Blut wurde durch Punktion der *Vena jugularis* unter sterilen Kautelen nach Stauung des Gefäßes mit einer Staukette nach Witte gewonnen. Zur Blutentnahme wurde das Vacutainersystem mit heparinisierten (Natrium-Heparinat) Vacutainern für die Gewinnung von Blutleukozyten eingesetzt.

3.3.2 Gewinnung von Serum und Milchserum

Für die Bestimmung von IgG-Isotypen im Blut und in der Milch, wurde Blut- und Milchserum gesammelt. Zur Gewinnung von Serum aus dem Blut wurden Blutproben 10 min bei 1200 x g zentrifugiert. Anschließend wurde das Serum vierfach aliquotiert, in beschriftete Eppendorf-Cups pipettiert und bei -20°C eingefroren. Die Milchproben wurden 10 min bei 4600 x g (4°C) zentrifugiert, der Rahm mit einem Spatel vollständig abgenommen, die mittlere Fraktion anschließend sorgfältig in Cups pipettiert und bei -20°C eingefroren.

3.3.3 Zellseparation über Leukozytenseparationsmedium®

3.3.4 Erythrozytenlyse in Anwesenheit kernhaltiger Zellen

Um eine Behinderung der durchflußzytometrischen Messungen durch die hohe Erythrozytenzahl in den Proben zu vermeiden, wurde vor der jeweiligen Analyse eine Elimination der roten Blutkörperchen durchgeführt.

Zu dem Erythrozyten-haltigen Zellgemisch wurden 20 ml Aquadest zugegeben. Nach 20 sekundigem Schwenken wurden 20 ml doppelt konzentriertes PBS hinzugefügt und das Zentrifugenröhrchen erneut geschwenkt. Waren nach anschließender Zentrifugation (500 x g, 10 Min., 4°C) noch Erythrozyten vorhanden, wurde die Lyse einmal wiederholt.

3.3.5 Gewinnung boviner mononukleärer Zellen aus dem Blut

Dem frisch gewonnenen heparinisierten Blut (20 ml pro Tier) wurden 15 ml PBS in 50 ml Röhrchen zugegeben. Das so verdünnte Blut wurde auf Lymphozytenseparationsmedium® (Ficoll 1.077g/ml) vorsichtig überschichtet und bei 1000 x g ohne Bremse (30 Min., 4°C) zentrifugiert.

Die mononukleären Zellen befanden sich nach der Zentrifugation in der Interphase zwischen Plasma und Ficoll-Schicht. Die Interphase wurde mit einer Pipette abgesaugt und in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen mit vorgelegtem PBS (5 ml) überführt. Nach Auffüllen mit PBS auf 45 ml folgten drei Waschschrirte (je 10 Min) bei 600 x g, 300 x g und 200 x g, um die Thrombozyten weitestgehend zu entfernen. Wenn Erythrozyten zwischen den MNC vorhanden waren, wurde eine hypotone Lyse (3.3.4) durchgeführt. Zwischen den einzelnen Zentrifugationsschritten wurden die Zellen durch Aufschütteln aus dem Pellet gelöst und in 40 ml PBS suspendiert. Mit dieser Methode konnten zwischen 2 bis 3 x 10⁶ MNC/ml Vollblut gewonnen werden.

3.3.6 Gewinnung boviner polymorphkerniger Granulozyten aus dem Blut

Die Dichtegradientenseparation wurde wie unter (3.3.5) durchgeführt. Nachdem die MNC geerntet wurden (durch Absaugen der Interphase), wurden das Plasma und das Separationsmedium mit einer Pipette abgesaugt und verworfen. Aus dem verbleibenden Gemisch aus Granulozyten und Erythrozyten wurden die Erythrozyten durch zweimalige hypotone Lyse entfernt (3.3.4). Die Zellsuspension wurde für 10 Min. bei 600 x g, 4°C mit Bremse zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, das Zellpellet durch Rütteln der Röhrchen suspendiert. Eine wiederholte Lyse wurde wie oben beschrieben bei einer bestehenden Erythrozytenkontamination durchgeführt und die Zellsuspension für 10 Min. (300 x g, 4°C) mit Bremse zentrifugiert. Nach beiden Lyseschrirten folgte ein Waschschrirte mit 20 ml PBS (180 x g, 4°C, 10 Min). Das Zellpellet wurde in Kulturmedium (I10F) aufgenommen, die Zellen wurden gezählt und auf die gewünschte Konzentration eingestellt. Durch dieses Verfahren konnten Populationen neutrophiler Granulozyten mit 80 bis 95 %iger Reinheit gewonnen werden.

3.3.7 Durchflusszytometrie

3.3.8 Quantifizierung der Zahl vitaler Zellen mit Hilfe des Durchflusszytometers (Referenzzellmethode)

Aufgrund von Kulturbedingungen und stimulierenden Substanzen wird im Laufe der Inkubation ein Teil der *in vitro* eingesetzten Zellen nekrotisch. Daraus resultiert eine unbekannte Anzahl von vitalen Zellen, die durch die Referenzzellmethode erfasst werden kann. Das Prinzip besteht darin, eine definierte Anzahl Partikel (Referenzzellen, siehe 3.3.9), die sich bei gleichen Geräteeinstellungen von den zu untersuchenden vitalen Zellen unterscheiden, den Proben

zuzugeben. Werden die gemessenen Referenzzellen und die vitalen Zellen ins Verhältnis gesetzt, kann die absolute Zahl vitaler Zellen pro Ansatz ermittelt werden.

Üblicherweise wurden kultivierte Zellen aus den Vertiefungen einer Mikrotiterplatte vollständig entnommen und in Durchflusszytometerröhrchen überführt, in dem 100 µL Trägerflüssigkeit mit PJ (2 µg/ml) vorgelegt waren. Dazu wurden 50 µl einer Suspension mit 5×10^4 Referenzzellen pipettiert. Angestrebt wurde ein Verhältnis von Referenzzellen zu Kulturzellen von ca. 1:1. Waren höhere oder niedrigere Zahlen der Kulturzellen zu erwarten, wurde die Zahl eingesetzter Referenzzellen entsprechend angepasst. Nach durchflusszytometrischer Erfassung errechneten sich die Zahlen vitaler Kulturzellen nach der Formel:

$$\text{Anzahl Kulturzellen} = \frac{\text{gemessene Ereignisse Kulturzellen} \times \text{eingesetzte Zahl Referenzzellen}}{\text{gemessene Ereignisse Referenzzellen}}$$

Als Referenzzellen dienten bovine mononukleäre Zellen des Blutes, die mit einem monoklonalen Antikörper gegen bovine MHC-Klasse-I-Moleküle (mAk Bo1.,3.2.5) markiert und indirekt mit einem Fluorochrom-gekoppelten Ziege-Anti-Maus-Antikörper (siehe Tab. 5: Antikörper für die Membranimmunfluoreszenz) gefärbt wurden, so dass sie im Durchflusszytometer von unmarkierten Zellen zu unterscheiden waren.

3.3.9 Herstellung von Referenzzellen

Zur Färbung wurden jeweils 2×10^7 frisch separierte bovine mononukleäre Zellen des Blutes in ein 15 ml Röhrchen gegeben und bei 80 x g für 5 Min. sowie 4°C zentrifugiert. Nach dem Abgießen des Überstandes wurde das Zellpellet in 100 µl PBS suspendiert und mit demselben Volumen des unverdünnten monoklonalen Antikörpers Bo1 (siehe Tab. 5) für 15 Min. bei 4°C inkubiert. Anschließend erfolgte ein Waschschriff mit 5 ml MIF-Puffer (siehe 3.2.6.3) und ein Zentrifugationsschritt (80 x g, 7 Min., 4°C). Der Überstand wurde verworfen und das suspendierte Zellpellet wurde mit 100 µl des 1:40 verdünnten FITC-konjugierten Ziege-Anti-Maus Antikörpers (siehe Tab. 5) versetzt und 20 Min. unter Lichtabschluss bei 4°C inkubiert.

Nach einem weiteren Waschschriff wurden die Zellen in 50 ml PBS suspendiert und erneut zentrifugiert. Zur Fixierung wurden die Zellen in 30 ml einer 4%igen Paraformaldehyd-Lösung (siehe 3.2.3) suspendiert. Nach einer Inkubation für 24 h bei 4°C unter Lichtabschluss wurden sie für 15 Min. bei Raumtemperatur zentrifugiert, dekantiert und ein zweites Mal in PBS gewaschen. Dieses nun gewonnene Zellpellet wurde in der PI-haltigen Trägerflüssigkeit aufgenommen (2 µg/ml PI) und auf 4×10^5 Zellen/ml eingestellt. Referenzzellen wurden durch

ihre Morphologie (mononukleäre Zellen), ihre Rotfluoreszenz und ihre Grünfluoreszenz charakterisiert.

3.3.10 Durchflusszytometrische Beurteilung der Zellvitalität

Geschädigte und/oder abgestorbene Zellen weisen Defekte in der Zellmembran auf und zeigen im Vergleich zu gesunden Zellen Veränderungen in Größe und Komplexität. Zur Färbung solcher Zellen sind Fluorochrome wie Propidiumjodid (PJ) geeignet. Dieser Farbstoff kann nur durch defekte Zellmembranen ins Zellinnere gelangen und dort mit DNA interkalieren. Die PJ-positiven Zellen werden im Detektor FL3 gemessen, während Zellen mit intakter Membran in diesen Detektoren nicht registriert werden. Ist der Zelluntergang so weit fortgeschritten, dass keine DNA-Reste in den Zellen oder gar nur noch Zellbruchstücke vorhanden sind, können diese mit derartigen Fluorochromen nicht markiert werden. Es können mit dieser Methode also nur tote kernhaltige Zellen mit Membrandefekten erkannt und von der Analyse ausgeschlossen werden, nicht aber kernlose Zellen und Zellbruchstücke. Die Bestimmung der Zellvitalität wurde als Teil der Auswertung der Messungen der MIF (3.3.10.1) und Phagozytose (3.3.11) durchgeführt. Die Messung der Zellvitalität erfolgte so erst nach Inkubation und mehrmaligem Waschen der Zellen. Im Proliferationsassay (3.3.13) wurde die Zellvitalität ebenfalls gemessen. Dazu wurden 100 µl der auf die Arbeitskonzentration eingestellten Zellsuspension mit 100 µl PJ (4µg/ml) in ein FCM-Röhrchen (FR) pipettiert. Anschließend wurden 10.000 zelluläre Ereignisse je Probe im FCM gemessen. Die toten Zellen wurden in SCC-FL3-Fenster definiert.

3.3.10.1 Immunphänotypisierung anhand Membranimmunfluoreszenz (MIF)

In dieser Arbeit und um die mononukleären Zellen des peripheren Blutes zu phänotypisieren, wurde eine Doppelfluoreszenz mit direkt markierten Antikörpern (3.2.5) durchgeführt (direkte Zweifachfluoreszenz).

Durchführung der Membranimmunfluoreszenz

Von einer MNC-Suspension (2×10^6 in PBS) wurden 100 µl pro Vertiefung einer 96-Well-Rundbodenmikrotiterplatte pipettiert. Die Zellen wurden zentrifugiert (300 x g; 3 min, 4°C), die Überstände dekantiert und dann das Pellet resuspendiert. Es wurden pro Tier vier Ansätze mit verschiedenen Kombinationen der spezifischen Antikörper erstellt (CD4-CD14, MHCII-CD14, MHCII-CD8, WC1-CD14). Nach Zugabe von 10 µl des verdünnten spezifischen Antikörpers (Tab. 5) in der jeweiligen Vertiefung wurde die Platte kurz geschüttelt und für 30 Min auf Eis

inkubiert. Danach wurden die Zellen zwei Mal mit 150 µl MIF-Puffer (3.2.6.3) gewaschen und suspendiert. Anschließend wurden jeder Vertiefung 150 µl MIF-Puffer zugegeben und die Zellen in 150 µl Trägerflüssigkeit (4 µg/ml Propidiumjodid) in Röhrchen überführt und durchflusszytometrisch erfasst.

Auswertung

Tote Zellen wurden anhand ihrer Fluoreszenzintensität im FL-3- Kanal (durch deren Aufnahme von PJ) mittels eines Fensters von der Auswertung ausgeschlossen. Es wurden 10.000 Ereignisse (vitale MNC) pro Ansatz gemessen. Phycoerythrin (PE) war bei einer Emmissionswellenlänge von 564-606 nm im FL-2-Kanal und Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) bei 515-545 nm Emmissionswellenlänge im FL-1-Kanal erfassbar. Zur Auswertung einfacher Fluoreszenzen wurden immer korrelierte Darstellungen mit den Parametern FL-1 (oder FL-2) gegen SSC, in denen eine Quadrantenanalyse durchgeführt wurde, verwendet. Für die Auswertung der Doppelfluoreszenz wurden korrelierte Darstellungen der beiden Fluoreszenzen gewählt. Bestimmt wurde der prozentuale Anteil fluoreszenzpositiver Zellen an der jeweils untersuchten Zellpopulation oder deren mittlere Fluoreszenzintensität (Abb. 7).

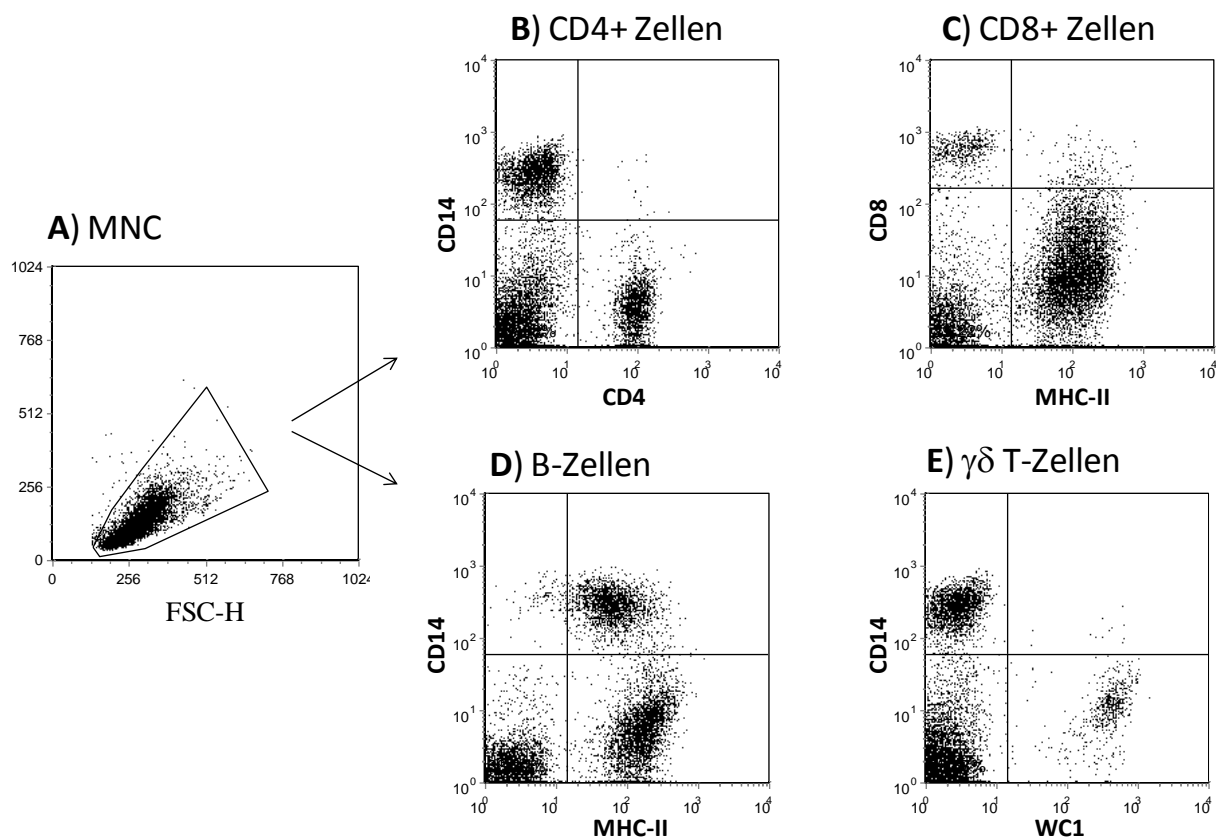


Abb. 7: Immunphänotypisierung mononukleärer Zellen des Blutes.

Punktediagramme nach durchflusszytometrischer Erfassung von 10.000 Ereignissen. A) Identifizierung der mononukleären Zellen unter den vitalen, Propidiumjodid-negativen Zellen im (FSC/SSC-Dotplot). Von dieser Population wird der Anteil an CD4+ Zellen (B), CD8+ Zellen (C), B-Zellen (CD14⁻; MHC-II⁺) (D), Monozyten (CD14⁺; MHC-II⁺) (Mittelwert von B, D und E) und $\gamma\delta$ -T-Zellen (WC1⁺) (E) durch Doppel-Markierung mit spezifischen Antikörpern bestimmt. Die Identifizierung von Zellpopulationen erfolgte durch Darstellung (FL1 gegen FL2) und durch Setzen eines Quadranten.

3.3.11 *Ex-vivo*-Bestimmung der Phagozytosekapazität neutrophiler Granulozyten des Blutes

Zur Bestimmung der Phagozytosekapazität wurde eine durchflusszytometrische Testmethode durchgeführt, die Aussagen über den Anteil der phagozytierenden Neutrophilen einer Zellsuspension ermöglicht. Als Phagozytosepartikel wurden FITC-markierte Staphylokokken mittels eines bovinen Poolserums opsonisiert und den Granulozyten zur Phagozytose angeboten. Phagozytose-positive Granulozyten waren aufgrund ihrer erhöhten Grünfluoreszenz von Phagozytose-negativen zu unterscheiden.

Durchführung der Phagozytose

Die FITC-markierten Staphylokokken (2×10^8 Bakterien/ml PBS) (3.2.3) in den Vorratsröhrchen wurden nach dem Auftauen für 3 Minuten bei $9500 \times g$ und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, ohne das kaum sichtbare Bakterienpellet mit der Pipettenspitze zu berühren. Zur Opsonisierung der Bakterien wurden diese dann mit 1 ml Rinderpoolserum (1:10 in PBS) für 30 Minuten im Brutschrank (37°C , 5% CO_2) inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Cups noch einmal bei $9500 \times g$ für 3 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand danach vorsichtig abgenommen und das Pellet suspendiert. Es wurden drei verschiedene Konzentrationen von der Bakterienlösung hergestellt, sodass drei PMN:Bakterien-Verhältnisse (1:200, 1:100, 1:50) erreicht werden konnten. Die Vertiefungen einer 96-Rundbodenmikrotiterplatte wurden mit je $100 \mu\text{l}$ der jeweiligen Bakteriensuspension beschickt. Diesen Ansätzen wurden $100 \mu\text{l}$ einer Suspension (2×10^6 Zellen/ml) separierter boviner Granulozyten zugegeben. In den Kontrollansätzen wurde ausschließlich Medium vorgelegt. Die Probensuspensionen wurden 30 Sekunden auf dem Mikrotiterplattenrüttler durchmischt und dann für 60 Minuten im Brutschrank bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Die Proben wurden letztlich in $100 \mu\text{l}$ Trägerflüssigkeit in Röhrchen für die Durchflusszytometrie überführt.

Auswertung

Pro Ansatz wurden 5.000 Ereignisse (vitale PMN) gemessen und im FL1-FL2 Dotplot dargestellt. Bei der Auswertung mit dem Programm *FCS Express* wurden die eosinophilen Granulozyten aufgrund ihrer erhöhten Fluoreszenz im FL2-Kanal im FL1-FL2 Fenster ausgeklammert. Der Prozentsatz der Phagozytose-positiven PMN, wurde aufgrund ihrer erhöhten Grünfluoreszenz im FL1-Kanal ermittelt (Abb. 8).

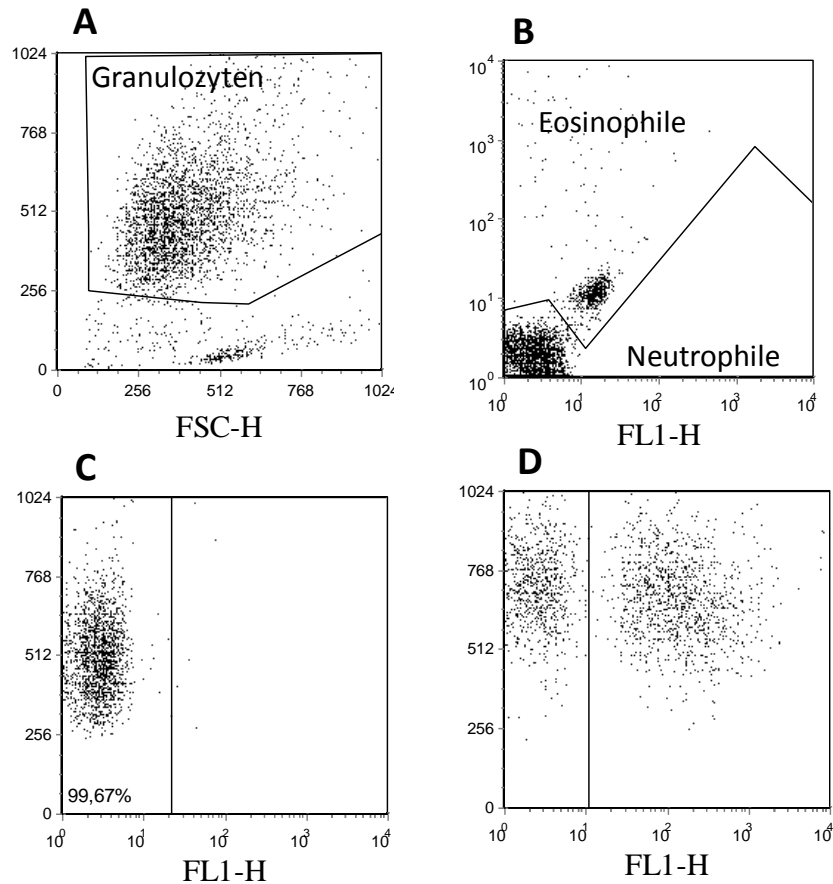


Abb. 8: Bestimmung der Phagozytoseleistung neutrophiler Granulozyten.

Punktendiagramme nach durchflusszytometrischer Erfassung von vitalen Granulozyten. A) Identifizierung der Granulozyten unter den vitalen Zellen im FSC/SSC-Dotplot (A). Unter diesen Zellen wurden die neutrophilen Granulozyten anhand ihrer geringeren Autofluoreszenz (im Gegensatz zu eosinophilen Granulozyten) im FL1/FL2-Dotplot identifiziert (B). FL1/SSC-Dotplots von neutrophilen Granulozyten (nach Gating auf Granulozyten UND Neutrophile) ohne (C) und mit (D) Zusatz FITC-markierter Bakterien. Nach Setzen eines Quadranten befinden sich Phagozytose-negative Zellen im oberen linken und Phagozytose-positive Zellen im oberen rechten Quadrant.

3.3.12 Bestimmung von IgG-Isotypen (IgG1 und IgG2) mittels ELISA

Um die Gehalte an IgG-Isotypen (IgG1 und IgG2) in den Milch- und Serumproben aus dem ersten Fütterungsversuch zu ermitteln, wurde ein ELISA (*enzyme-linked Immunosorbent Assay*) angewandt. Im eingesetzten, symmetrische Sandwich-ELISA werden zwei spezifische Antikörper verwendet, wobei der erste Antikörper (*coating*-Antikörper) an eine feste Phase (hier: Flachboden-Mikrotiterplatte) gebunden ist. Er bindet den Fc-Teil (*fragment crystallizable*) des

nachzuweisenden IgG-Isotyps aus der Lösung (Serum oder Milchserum). Im nächsten Schritt wird der zweite Antikörper, ein Peroxidase-gekoppelter Detektionsantikörper, zugegeben, der ebenfalls spezifisch für den Fc-Teil des nachzuweisenden Isotyps ist. Dem Enzym (Peroxidase) wird ein Substrat (Wasserstoffperoxid) angeboten. Die Substratumsetzung führt bei gleichzeitig zugegebenem farblosen Chromogen (Tetramethylbenzidin) zur Farbentwicklung (blau). Die Intensität der Farbe ist dabei proportional zur Konzentration des zu bestimmenden IgG-Isotyps in der Probe.

Durchführung des ELISAs

Jeder IgG-Isotyp wurde getrennt in einer Platte bestimmt. Zur Beschichtung der Mikrotiterplatte wurden Isotyp-spezifische (Schaf-IgG gegen Rind-IgG1 oder -IgG2) Antikörper (Tab. 4) im Beschichtungspuffer auf eine Konzentration von 1 µg/ml verdünnt und in einem Volumen von 75 µl in jede Vertiefung der Platte eingesetzt. Die Platte wurde danach bei Raumtemperatur zunächst eine Stunde auf dem Schüttler und anschließend über Nacht bei 4 °C inkubiert. Vor der Zugabe der zu untersuchenden Proben wurde die beschichtete Platte in einem Plattenwaschgerät fünf Mal (mit Waschpufferlösung) gewaschen und anschließend auf Vliespapier zur Entfernung von Flüssigkeitsresten ausgeklopft. Von jeder Probe (Milchserum oder Serum) wurden in Verdünnungspuffer eine logarithmische Verdünnungsreihe mit vier Konzentrationen in Duplikaten für den Nachweis jedes Isotyps hergestellt und in einem Volumen von 75 µl in jeder Vertiefung angelegt. Als Standard wurde in den ersten zwei Spalten jeder Platte das Rinderreferenzserum (Tab. 4) in sieben logarithmischen Verdünnungen (von 1×10^{-3} bis 1×10^{-8} in Duplikaten) aufgetragen. Zur Überprüfung unspezifischer Bindungen wurden die Detektionsantikörper (Tab. 4) direkt mit dem Beschichtungsantikörper (ohne Probe) inkubiert. Zur Prüfung der Bindung des Detektionsantikörpers an freie Stellen auf der Mikrotiterplatte wurden zwei Vertiefungen mit Beschichtungsantikörper nicht bestückt. Die so bestückten Platten wurden für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und danach fünf Mal mit Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurden 75 µl des Isotyp-spezifischen Detektionsantikörpers (Schaf-IgG gegen Rind-IgG1 oder Schaf-IgG gegen Rind-IgG2, 1:20.000 in Verdünnungspuffer) in die jeweiligen Vertiefungen pipettiert und wiederum für eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden 75 µl Substratlösung (40 µl H₂O₂ + 1 ml TMB + 10 ml Substatpuffer) in jede Vertiefung pipettiert und für 20 Min. unter Lichtausschluss inkubiert. Durch Zugabe von 75 µl einer ein-molaren Schwefelsäure in jede Kavität wurde die Reaktion beendet und die blaue Farbe erfuhr einen Farbumschlag in Gelb. Die Farbintensität in den einzelnen Kavitäten der Platte wurde in einem Plattenphotometer bei einer Wellenlänge von 450 nm (Testfilter) und 630 nm (Referenzfilter) gemessen und als optische Dichte (OD) erfasst.

Die logarithmierten Serumverdünnungen (X-Achse) wurden gegen die logarithmierten ODs (Y-Achse) aufgetragen. Die ELISA-Units unbekannter Proben wurden durch den Vergleich mit den Werten des Referenzserums (100 Units) im linearen Bereich als relative Werte angegeben und danach bezüglich der bekannten Ig-Konzentrationen des Referenzserums als mg/ml berechnet.

3.3.13 *In-vitro*-Proliferationsmessung

Durch verschiedene Substanzen können mononukleäre Zellen aktiviert und zur Teilung angeregt werden. Die mitotische Aktivität der Zellen nach Stimulation mit einem Mitogen kann durchflusszytometrisch bestimmt werden. Proliferierende Zellen nehmen vor der Teilung an Größe zu, außerdem steigert sich auch die Komplexität der Zellen, sodass die blastisch transformierten Zellen von den kleineren ruhenden Lymphozyten im Durchflusszytometer unterscheidbar sind.

Durchführung der Proliferation

Zur Proliferationsinduktion wurden 2×10^5 mononukleäre Zellen mit 1 ng/ml SEA oder 4 µg/ml ConA in einer 96-Loch-Rundbodenmikrotiterplatte für 6 Tage bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Parallele Ansätze enthielten CLA-Isomere, PGJ2 oder GW9662. Ansätze ohne Stimulus dienten als Kontrolle. Für die durchflusszytometrische Quantifizierung wurden die Zellen in 100 µl Trägerflüssigkeit (4 µg/ml PJ) aufgenommen, 50 µl Referenzzellen (3.3.9) dazugegeben und in ein FCS-Röhrchen überführt.

Auswertung

Die morphologische Charakterisierung der Zellen wurde im FSC/SSC-Punktediagramm durchgeführt. Durch das Setzen eines Fensters auf Propidiumjodid-negative Ereignisse im FL-3/SSC-Fenster wurden tote Zellen ausgeschlossen. Es wurde ein Fenster auf kleinere weniger komplexe Ereignisse (ruhende Lymphozyten) und ein zweites Fenster auf größere und komplexere Ereignisse (Blasten) gesetzt. Mit Hilfe der Referenzzellmethode wurde die absolute Zahl generierter Lymphoblasten bestimmt.

3.3.14 Bestimmung der Apoptose mononukleärer Zellen des Blutes

Die Bestimmung des Mitochondrienmembranpotenzials (MMP) erfolgte mit dem lipophilen Kation 5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3'-Tetraethylbenzimidazol-Carbocyanin Jodid, JC-1 (FOSSATI et al. 2003). Dieses Fluorochrom ist ein membranpermeables Zyanid mit einer

positiven Ladung (REERS et al. 1995). Dieser metachromatische Farbstoff kann in monomerer Form vorliegen oder reversibel in Aggregatform übergehen. JC-1-Monomere werden in die Mitochondrienmatrix eingeschleust. Da es sich um ein positiv geladenes Molekül handelt, ist der Einstrom umso stärker, je höher das Mitochondrienmembranpotential ist. Ab einem Schwellenwert des MMP von -80 mV bis -100 mV werden reversibel JC-1-Aggregate gebildet. Nach einer Laseranregung (488 nm) fluoresziert die monomere Form von JC-1 grün, während sie in Aggregatform oranges Licht emittiert. Folglich lassen sich mit Hilfe dieser Färbung und anschließender durchflusszytometrischer Auswertung mononukleäre Zellen mit hohem MMP, deren Mitochondrien orange fluoreszieren, von denen mit niedrigem MMP, deren Mitochondrien grün fluoreszieren, unterscheiden.

Testdurchführung

Die Wirkung von CLA auf die Apoptose von mononukleären Zellen des Blutes wurde mit der JC-1-Färbung geprüft. Dazu wurden bovine MNC wie unter (3.3.5) beschrieben separiert und in Medium suspendiert (6×10^6 Zellen pro/ml). Als Stimulus diente das Superantigen SEA (1 ng/ml). Das CLA-Isomer *Cis9-trans11* wurde in bestimmten Ansätzen in den Konzentrationen von 10 oder 50 $\mu\text{mol/L}$ pipettiert. In einigen Ansätzen wurde CLA erst nach 20 Stunden Inkubation zugegeben. Ansätze ohne Stimulus und/oder ohne CLA dienten als Kontrolle. Anschließend wurden von der Zellsuspension pro Vertiefung jeweils 50 μl (2×10^5) eingesetzt. Nach einer Inkubation von 24 h bei 37°C und 5% CO_2 wurde die JC-1-Färbung durchgeführt. Zunächst wurden die Zellkulturplatten zentrifugiert (250 x g, 20°C , 4 Min.) und die Überstände abgeschlagen. Die Zellen wurden dann in 100 μl PBS suspendiert und nochmal zentrifugiert (250 x g, 20°C , 4 Min.) und die Überstände erneut abgeschlagen. Nach dem Suspendieren wurden 100 μl JC-1-Lösung in einer Konzentration von 7 $\mu\text{mol/L}$ zu den Zellen gegeben und 15 Min. bei 37°C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen wurden die Zellen in 200 μl Trägerflüssigkeit (2 $\mu\text{g/ml}$ PJ) aufgenommen, in FCM-Röhrchen überführt und durchflusszytometrisch erfasst (10.000 Ereignisse). Alle Ansätze erfolgten in Triplikaten.

Auswertung

Bei der Erhebung der Daten wurde in der Darstellung SSC/FSC ein Fenster auf MNC (Abb. 9, A) und im FL3/SSC Punktediagramm ein zweites Fenster auf PJ-negative Ereignisse gesetzt. Durch eine Verknüpfung der beiden Fenster wurden von der Auswertung nekrotische Zellen ausgeschlossen und nur vitale MNC erfasst. Die vitalen MNC wurden in einem Fenster Grünfluoreszenz (FL1) gegen Rotfluoreszenz (FL3) dargestellt. Für die Auswertung wurden 3 Zustände unter den vitalen Zellen unterschieden: vitale nicht apoptotische Zellen im linken unteren Quadranten (Abb. 9, C, 1), apoptotische Zellen, deren MMP depolarisiert ist und die somit nach JC-1-Färbung im linken oberen Quadranten erscheinen (Abb. 9, C, 2) und intermediäre Zellen in den beiden rechten Quadranten (Abb. 9, C, 3). Die Membran von intermediären Zellen ist in ihrer Integrität gestört, sodass PJ in die Zelle eindringen kann und die JC-1-Moleküle aus dem Zytosol in den extrazellulären Raum entweichen können. Folglich ist die Grünfluoreszenz herabgesetzt. Außerdem kann der Anteil der nekrotischen Zellen von der Gesamtheit der Kulturzellen ermittelt werden (Abb. 9, B).

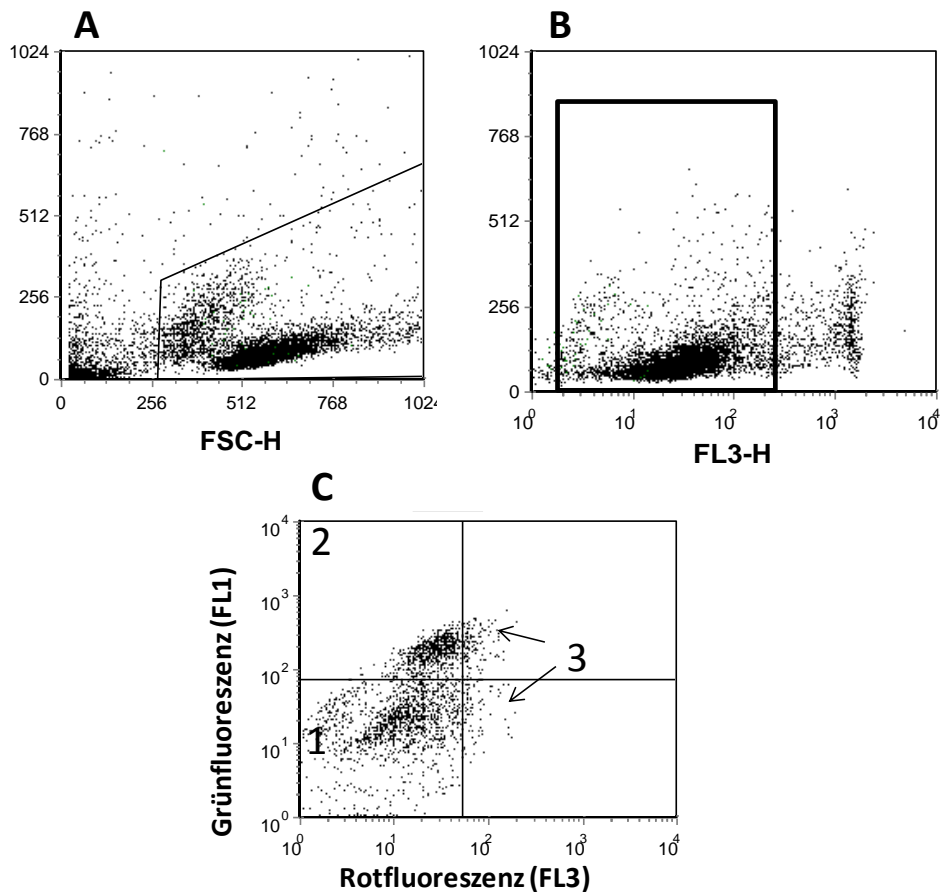


Abb. 9: Darstellung und Auswertung der JC-1-Färbung von bovinen MNC.

Bovine MNC (24 h Kultur) wurden nach JC-1-Färbung durchflusszytometrisch erfasst (jeweils 10.000 Ereignisse). A) Fenster auf morphologisch als MNC identifizierte Ereignisse; B) Fenster auf PJ-negative, vitale MNC; C) vitale MNC dargestellt in Rot- gegen Grünfluoreszenz (1 vitale Zellen; 2 apoptotische Zellen; 3 intermediäre Zellen).

3.3.15 Aufbereitung von mRNA aus bovinen Leukozyten für die quantitative PCR

In-vitro-kultivierte Zellen wurden im Lyse-Puffer des RNeasy Mini Kit (3.2.3) aufgenommen und bis zur weiteren Verarbeitung bei -95°C gelagert. Die RNA aus den Zell-Lysaten wurde über ein System aus Wasch- und Trennsäulen gereinigt. Alle Arbeitsschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Überstände der Zellkulturen wurden nach einer Zentrifugation für 5 Minuten bei 400 x g mit einer Pipette vollständig abgenommen und dann in jede Vertiefung 350 µl Lyse-Puffer pipettiert. Nach mehrmaligem Auf- und Abpipettieren wurde der Inhalt der Vertiefung in ein steriles 1,5 ml Eppendorf-Gefäß (3.2.2) überführt. Zu dem Zell-Lysat wurde nun das äquivalente Volumen an 70%igem Ethanol in das 1,5 ml Eppendorf-Gefäß gegeben und danach der Inhalt durch Schwenken gemischt. Anschließend wurde das Gemisch auf das im Kit enthaltene Filter-System gegeben und für 2 Min. bei 16 000 x g zentrifugiert. Dabei wurden selektiv RNA-Moleküle mit einer Länge von über 200 Basen an der Glasfiber-Membran der Filters adsorbiert, während Proteine und Salze den Filter passierten und in das darunter befindliche Sammelröhrchen gelangten. Das beigemengte Ethanol begünstigte diesen Vorgang. Um kontaminierende DNA aus dem Filter zu entfernen, wurde dieser mit dem RNase-Free DNase Kit (3.2.3) behandelt. Nach einem Waschschrift mit einem kleineren Volumen Puffer RW1 (350 µL) wurde die RNA dann mit DNase I (3.2.3) behandelt, während sie an der Silicagel-Membran gebunden ist. Dabei wurden 80 µL DNase-I-Mischung (10 µl DNase-I-Stammlösung zu 70 µl Puffer RDD) auf die RNeasy Silicagel-Membran pipettiert und für 15 min bei Raumtemperatur (20–30 °C) inkubiert. Puffer RDD ist in dem RNase-Free DNase Set enthalten. Durch einen zweiten Waschschrift mit Puffer RW1 wird die DNase wieder entfernt. Um kontaminierendes Material aus dem Filter zu entfernen, wurde dieser mit dem im Kit enthaltenen Waschlösung (RPE) zweimal gewaschen. Dabei wurden jeweils 500 µl der Waschlösung über das Filter-System gegeben und jeweils für 15 Sec. bei 16 000 x g zentrifugiert. Der bei den einzelnen Schritten erzeugte Durchfluss wurde nach jeder Zentrifugation verworfen. Nach dem letzten Wasch-Schritt wurde das Filter-System einmal leer zentrifugiert, um Ethanol-haltige Rückstände der Waschlösungen vollständig zu entfernen. Zum Schluss wurde das Filter-System in ein neues 2 ml Sammelröhrchen eingebracht und die im Filter befindliche RNA mittels Elution

in zwei Schritten gewonnen. Dazu wurden 50 µl Elutions-Lösung (RNase-Freies Wasser) direkt auf die Glasfaser-Membran pipettiert. Daran schloss sich ein Zentrifugationsschritt für 1 Min. bei 16 000 x

g an. Mit einer Menge von 30 µl Elutions-Lösung wurde dieser Schritt wiederholt. Die so gewonnene Gesamt-RNA wurde direkt nach der letzten Zentrifugation auf Eis gestellt. Die Reinheit und Konzentration der gewonnenen RNA wurde im Eppendorf Biophotometer (3.1) über die Extinktion bei 260 nm und 280 nm ermittelt. Zur Messung im Photometer wurden die Proben 1:50 in TE-Puffer (3.2.6.5) verdünnt. Nach der Beurteilung der Reinheit und der Bestimmung der Konzentration wurden die Proben einheitlich auf 50 ng Gesamt-RNA pro µl eingestellt. Anschließend wurde die RNA entweder sofort in cDNA umgeschrieben oder bei -95°C gelagert.

3.3.16 Synthese von cDNA

In der Reversen-Transkriptase-Reaktion wurde die aus den Zellen gewonnene RNA durch das Enzym Superscript™-II Reverse Transkriptase (3.2.3) in komplementäre cDNA umgeschrieben. Um ausschließlich die für die Genexpressionsanalyse relevante mRNA in cDNA umzuschreiben, wurden Oligo-(dt)12-18-Primer (3.2.3) verwendet, die sich an den Poly-A-Schwanz der mRNA Moleküle anlagerten und damit als Startregion für die Reverse Transkriptase dienten. In einem 200 µl Reaktionsgefäß (3.2.2) wurden 10 µl der RNA, 1 µl Oligo-(dt)12-18-Primern und 1 µl Trinukleotiden gemischt. Die Komponenten wurden für 5 Min. bei 65°C im Biometra T-Gradient (3.1) zum Auffalten von Sekundärstrukturen der RNA inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Proben sofort auf Eis gestellt und jeweils 7 µl des in der Zwischenzeit hergestellten Mastermix (Tab. 7) hinzugefügt. Es folgte eine zweite Inkubation bei 42° C für 2 Min., um das Temperaturoptimum für die Reverse Transkriptase zu erreichen. Durch Zugabe von 1 µl (200 U) SuperScript™-II Reverse Transkriptase in den Reaktionsansatz und nachfolgender Inkubation bei 42° C für 50 Min. erfolgte die Reverse-Transkriptase-Reaktion. Zum Stoppen der Reaktion und um eine Interaktion der bei der Umschreibung verwendeten Enzyme mit denen der nachfolgenden PCR zu vermeiden, wurde abschließend eine Enzym-Denaturierung bei 70° C für 15 Min. durchgeführt.

Tab. 7: Mastermix für die Umschreibung von mRNA in cDNA.

Reagenz	Volumen	Endkonzentration
5 x First-Strand-Puffer (250 mmol/L Tris-HCl, 375 mmol/L KCl, 15 mmol/L MgCl ₂)	4,0 µL	
RNase Inhibitor (RNaseOUT™)	1,0 µL	40 IU
Reduktionsmittel (DTT, Dithiothriol)	2,0 µL	0,1 mol/L

Die Reinheit und Konzentration der cDNA wurde im Eppendorf Biophotometer (3.1) ermittelt. Zur Messung im Photometer wurden die Proben 1:50 in TE-Puffer (3.2.6.5) verdünnt. Nach der Beurteilung der Reinheit und der Bestimmung der Konzentration wurden die Proben einheitlich auf 200 ng cDNA pro µl eingestellt. Die so gewonnene cDNA konnte für 7 Tage im Kühlschrank oder für mehrere Monate bei -20°C gelagert werden.

3.3.17 Quantitative *real time* PCR (qrtPCR)

Prinzip der qrtPCR

Bei der qrtPCR findet eine Quantifizierung der PCR-Produkte in „Echtzeit“, das heißt während der Amplifikationszyklen statt. In den Reaktionsansätzen befindet sich der Farbstoff *SYBR Green*, der nach der Anlagerung an die kleine Windung doppelsträngiger DNA grün fluoresziert. Die Fluoreszenz steht dabei in direktem Verhältnis zur Menge der amplifizierten DNA und wird über die gesamte Laufzeit durch die *StepOne™ Software* Version 2.0 aufgezeichnet. Wie eine konventionelle PCR besteht auch die qrtPCR aus der Wiederholung der drei Reaktionsschritte: 1) Aufschmelzen der doppelsträngigen DNA, 2) Anlagerung der Primer und 3) Verlängerung des Produkts. Der Ablauf der drei Reaktionsschritte wird als Zyklus bezeichnet. Eine vollständige PCR umfasst 40 bis 50 Zyklen. In den frühen Zyklen kommt es lediglich zu einem basalen Fluoreszenzsignal, das auch als Hintergrundsignal bezeichnet wird. In Abhängigkeit von der initialen Menge an DNA im Reaktionsansatz steigt nach einer bestimmten Zyklenzahl die Fluoreszenz des PCR-Produkts exponentiell an. Der Zyklus, an dem die Fluoreszenz aus dem Hintergrundsignal in eine exponentielle Phase übergeht, wird als *Cycle threshold* (Ct) (Abb. 10, B) bezeichnet und korreliert direkt mit der ursprünglichen Kopienzahl der Proben. Die exponentielle Phase geht im weiteren Verlauf der PCR aufgrund von Inhibition durch Reaktionsprodukte und Enzymlimitierung zunächst in eine lineare Phase und letztendlich in eine Plateauphase über (Abb. 10, B). Da *SYBR Green* unspezifisch an jede doppelsträngige DNA bindet, muss nach den Amplifikationszyklen eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt werden (Abb. 10, A). Dabei werden die Proben schrittweise denaturiert. Abhängig von der Größe der

Amplifikationsprodukte zerfallen diese zu einem bestimmten Zeitpunkt und es findet ein schlagartiger Abfall der Fluoreszenz statt. Befinden sich verschiedene Produkte im Reaktionsansatz, wird dies durch eine mehrgipfelige Schmelzkurve sichtbar.

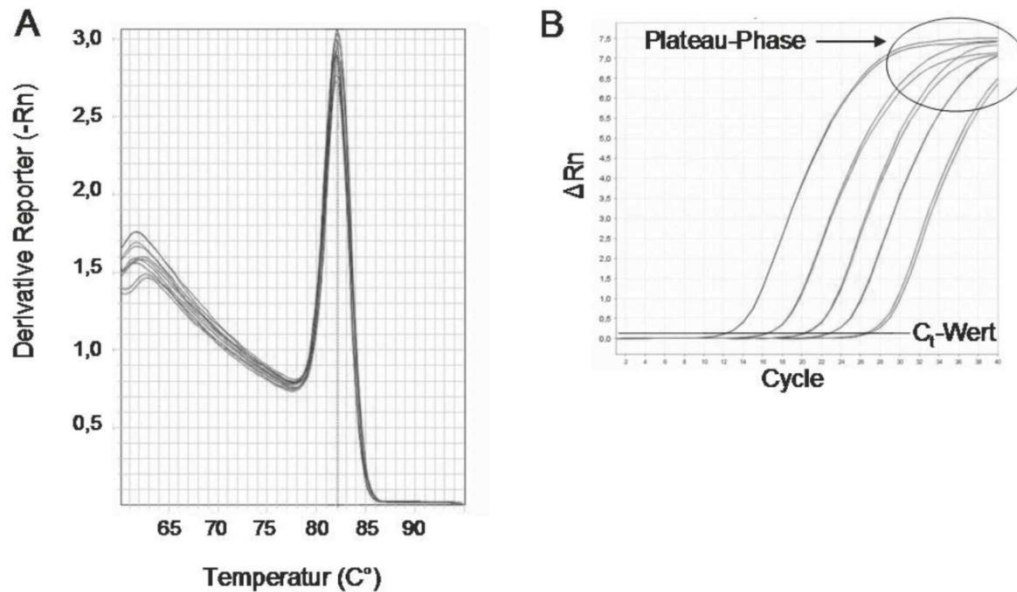


Abb. 10: Schmelzkurve und Amplifikations-Plot einer qPCR, aus (SIPKA 2007).

Dargestellt wurden:

- A) die Schmelzkurve von IFN- γ in Abhängigkeit von der Temperatur und
- B) der Anstieg des Fluoreszenzsignals in Abhängigkeit der PCR-Zyklusanzahl einer Standardverdünnungsreihe von IFN- γ (Amplifikationsplot).

Primeroptimierung

Die optimale Konzentration von Vorwärts- und Rückwärts-Primers ist je nach Primer und Gerät unterschiedlich. Daher wurden vor der Messung die optimalen Primer-Konzentrationen für die zu untersuchenden Gene ermittelt. Entsprechend der Matrix aus Abb. 11 wurde für jede Konzentration ein Duplikat aus der Standardreihe (1000 Kopien/ μ l, Positivkontrolle) und ein Duplikat DNase/RNase freies Wasser (Negativkontrolle) eingesetzt. Ausgewählt wurde diejenige Kombination von Vorwärts- und Rückwärts-Primer-Konzentration, bei der eine höchstmögliche Sensitivität bei niedriger oder fehlender Amplifikation in der Negativkontrolle vorlag.

Rückwärts-Primer
(nmol/l)

	50	300	900
300			
900			

Abb. 11: Matrix für die Primeroptimierung.

Kombination der einzelnen Konzentrationen von Vorwärts- und Rückwärts-Primern (nmol/L).

Messung unbekannter Proben

In der qrtPCR wurde die Beeinflussung der Genexpression der Zytokine IFN- γ , IL-4, IL-17, IL-12 und IL-10 sowie des Transkriptionsfaktor PPAR γ und das PPAR γ -reguliertes Gen PTX3 in den Superantigen-stimulierten bovinen MNC durch C9, t11-CLA untersucht. Für die Durchführung wurde der SYBR Green® PCR Master Mix verwendet. Die Proben wurden wie in (3.3.15) beschrieben extrahiert, auf eine Konzentration von einheitliche 50 ng/ μ l Gesamt-RNA eingestellt und in cDNA umgeschrieben. Für jede Messung wurden mindestens fünf Punkte der Standardreihe (100 Kopien–10 Kopien) und eine Negativkontrolle (Mastermix + Wasser) eingesetzt. In eine *Micro Amp™ Fast 96-well* PCR-Platte wurde pro Vertiefung jeweils 1 μ l cDNA und 24 μ l des entsprechenden Mastermix (Tab. 8, 9, 10) pipettiert. Alle Ansätze wurden in Duplikaten angelegt. Zu Beginn der Two-Step-PCR wurden die Proben zur vollständigen Denaturierung der DNA einmalig für 10 Minuten auf 95°C erhitzt. Danach erfolgten 40 Zyklen mit je einer Denaturierung der Proben bei 95°C über 15 Sekunden und der Anlagerung der Primer und der Verlängerung des Produkts bei 60°C über 1 Minute. Nach Ablauf der Amplifikationszyklen wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Dabei wurden die Proben von 60°C in Schritten von 0,3°C unter ständiger Aufzeichnung der Fluoreszenz auf 95°C erhitzt.

Tab. 8: Mastermix für IFN γ .

Reagenz	Volumen (μ l)
SYBR Green® PCR Master Mix	12,5
Wasser (RNase-DNase-frei)	9,75
Vorwärts-Primer (5 μ mol/L)	1,5
Rückwärts-Primer (5 μ mol/L)	0,25

Tab. 9: Mastermix für IL-17, IL-12, IL-10, PTX3, PPAR γ .

Reagenz	Volumen (μl)
SYBR Green® PCR Master Mix	12,5
Wasser (RNase-DNase-frei)	8,5
Vorwärts-Primer (5 $\mu\text{mol/L}$)	1,5
Rückwärts-Primer (5 $\mu\text{mol/L}$)	1,5

Tab. 10: Mastermix für IL-4.

Reagenz	Volumen (μl)
SYBR Green® PCR Master Mix	12,5
Wasser (RNase-DNase-frei)	5,5
Vorwärts-Primer (5 $\mu\text{mol/L}$)	4,5
Rückwärts-Primer (5 $\mu\text{mol/L}$)	1,5

Auswertung

Die StepOne™ Software zeichnet die Fluoreszenz von SYBR Green auf und legte für die einzelnen Proben die Ct-Werte fest. Für die eingesetzten Konzentrationen des externen Standards mit bekannter Kopienzahl wurden ebenso die Ct-Werte festgelegt. Durch die logarithmische Darstellung der ermittelten Ct-Werte gegen die Kopienzahl der Standardpunkte entstand eine Standardkurve (Regressionsgerade), anhand derer die in den Proben enthaltene Kopienzahl abgeleitet wurde.

Zur Validierung der PCR wurden die Parameter Steigung der Regressionsgeraden, Effizienz, Bestimmtheitsmaß (R^2) und Güte der Schmelzkurve herangezogen. Aus der von der Software berechneten Steigung der Geraden lässt sich die Effizienz der Amplifikation ermitteln. Bei einer Steigung von -3,32 liegt eine 100%ige Effizienz der Amplifikation vor, das heißt das Produkt verdoppelt sich in jedem Zyklus. Steigungen von -3,1 bis -3,6 (entspricht einer Effizienz von 90-110%) gelten als auswertbar (Abb. 12). Ist die Amplifikation nicht ausreichend effizient, so können die Ausgangsmengen nicht exakt berechnet werden. Zusätzlich wird von der Software das Bestimmtheitsmaß berechnet. So kann der lineare Zusammenhang zwischen Ct-Werten und eingesetzter Kopienzahl überprüft werden, dabei sollte R^2 Werte >0.985 haben. Bei der Analyse der Schmelzkurve durfte lediglich ein einzelner Peak auftreten, um sicherzustellen, dass nur ein Produkt amplifiziert wurde (Abb. 10, A). Nur wenn die genannten Parameter den vorgegebenen Kriterien entsprachen, wurden die von der Software nach der Regressionsgerade berechneten Kopienzahlen der unbekannt Proben für die weitere Auswertung verwendet.

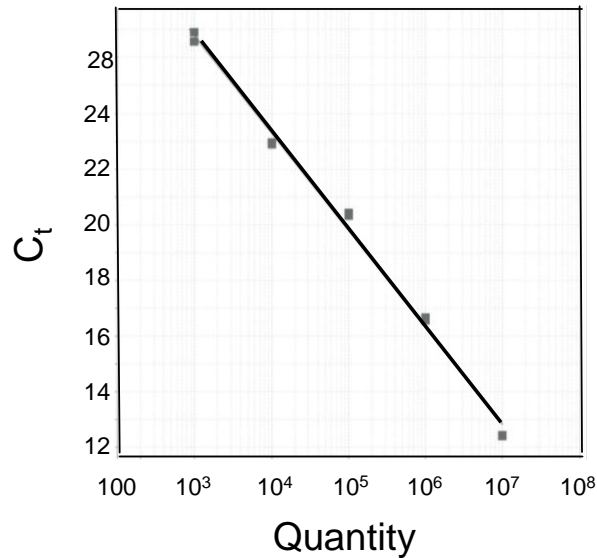


Abb. 12: Regressionsgerade einer Standardreihe in der qrtPCR.

Dargestellt sind Messplasmide des Zytokins IL-17 in den Verdünnungen 1×10^3 Kopien bis 1×10^7 Kopien. Die Ct-Werte (Cycle threshold) sind gegen die Kopienzahlen aufgetragen und ergeben die Regressionsgerade mit der Steigung $s = -3,429$; einer Effizienz von 93,3% und mit $R^2 = 0,994$.

3.3.18 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mithilfe des Programms Microcal Origin durchgeführt. In der deskriptiven Statistik wurden die Daten mit dem Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung geprüft. Die Daten wurden entweder durch Mittelwert und Standardfehler oder durch Minimal- und Maximalwerte, das obere und untere Quartil sowie den Median (in Boxplots Abb. 13) beschrieben und dargestellt

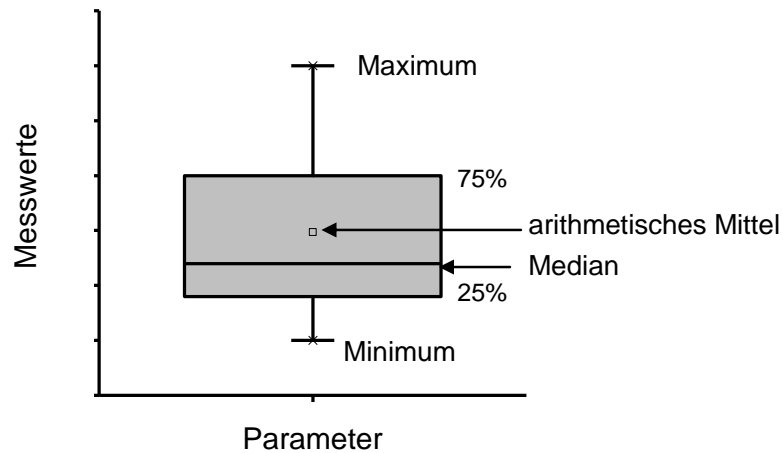


Abb. 13 Exemplarische Darstellung eines Boxplots.

Exemplarische Darstellung von Messwerten eines Parameters in einem Boxplot. Die zentralen 50% der Daten befinden sich in der Box, in der der Median durch eine horizontale Linie und der arithmetische Mittelwert durch ein Rechteck gekennzeichnet sind.

Um zu prüfen, ob sich in voneinander abhängigen Stichproben zwei qualitative Merkmale bezüglich eines quantitativen Merkmals voneinander unterscheiden, wurde bei normalverteilten Daten der gepaarte Student's t-Test angewendet, bei nicht normalverteilten Daten wurde der Wilcoxon Signed-Rank Test verwendet. Um mehr als zwei qualitative Merkmale bezüglich eines quantitativen Merkmals untereinander zu vergleichen, wurde bei den abhängigen Stichproben die 1-faktorielle Varianzanalyse (ANOVA) für wiederholte Messungen durchgeführt (normalverteilte Daten) bzw. der Friedmann ANOVA für nicht normalverteilte Daten. Unterschiede zwischen Parameterklassen mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ wurden als signifikant bezeichnet. Um Zusammenhänge zwischen quantitativen Daten zu erfassen, wurden Korrelationsanalysen (nach Pearson für normalverteilte Daten, nach Spearman für nicht normalverteilte Daten) durchgeführt. Die Signifikanz des Korrelationskoeffizienten (r) wurde anhand der berechneten Irrtumswahrscheinlichkeit bewertet (PETRI u. WATSON 2006).

4 Ergebnisse

Um die Wirkung von konjugierten Linolsäuren auf das bovine Immunsystem zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit zwei Fütterungsversuche sowie *In vitro*-Analysen durchgeführt. Die in den Fütterungsversuchen verwendeten Tiergruppen unterschieden sich bis zur Abkalbung in keinem der untersuchten Parameter.

4.1 Der Einfluss einer CLA-Supplementation im Futter auf die relative Zellzusammensetzung mononukleärer Zellen des Blutes

Um die Wirkung einer langzeitigen Supplementierung von konjugierten Linolsäuren auf die Zellzusammensetzung mononukleärer Zellen des peripheren Blutes zu untersuchen, wurden MNCs aus dem Blut von Milchkühen, die ab ihrer Abkalbung (d0) mit 100 g oder mit 50 g CLA pro Tier und Tag supplementiert oder ohne Zusatz von CLA gefüttert wurden, auf ihre Zellzusammensetzung durchflusszytometrisch untersucht. Für die Charakterisierung der verschiedenen Subpopulationen von MNC wurden die aus dem peripheren Blut separierten mononukleären Zellen mit fluorochrommarkierten monoklonalen Antikörpern gegen die Zelloberflächen-Strukturen CD14, CD4, CD8, WC1, und MHC-II inkubiert. Anhand der durchflusszytometrischen Analyse konnten die relativen prozentualen Anteile folgender Zellpopulationen quantifiziert werden: Monozyten (CD14+, MHC-II+), B-Zellen (CD14-, MHC-II+), CD4-positive T-Zellen, CD8-positive T-Zellen sowie $\gamma\delta$ -T-Zellen (WC1+). Es wurde überprüft, ob sich die Werte der einzelnen Gruppen voneinander unterschieden oder ob der zeitliche Verlauf jeder Gruppe von CLA beeinflusst wurde.

4.1.1 Eine CLA-Supplementierung zeigt keine Wirkung auf die prozentualen Anteile von Monozyten, B-Zellen oder T-Zellen

Im Hinblick auf den Anteil der Monozyten, B-Lymphozyten und T-Lymphozyten unter den mononukleären Zellen konnte zu keinem Messzeitpunkt ein Einfluss durch die CLA-Supplementierung festgestellt werden (Abb. 14). Um zu prüfen, ob es durch CLA zur Beeinflussung der Expressionsstärke von MHC-II-Molekülen auf B-Zellen oder Monozyten kam, wurde die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von MHC-II Molekülen auf B-Zellen und auf Monozyten berechnet und ins Verhältnis zueinander gesetzt. Die CLA-50 Gruppe zeigte von Anfang an und unabhängig von der CLA-Supplementierung bis zum Tag 49 p.p. relativ hohe

Werte, allerdings konnten keine signifikanten Wirkungen von CLA auf die MHC-II-Expression festgestellt werden (Abb. 14).

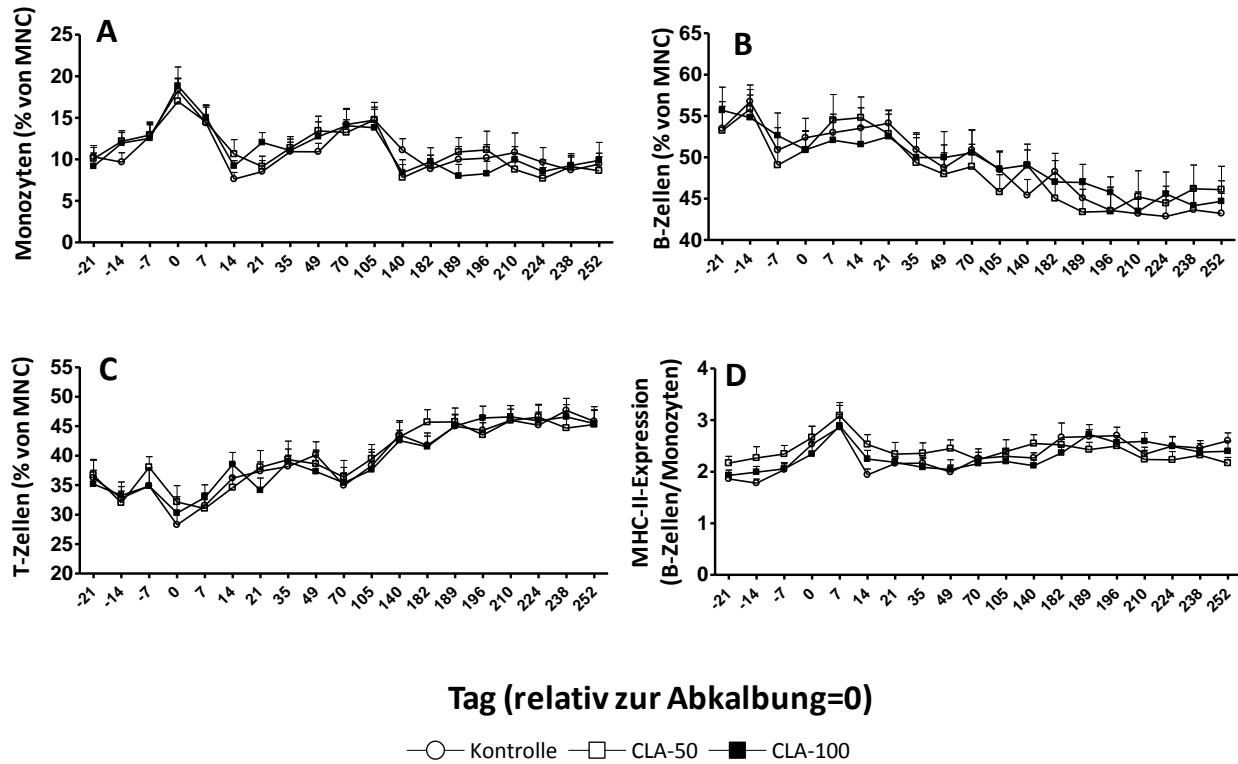


Abb. 14: Der Einfluss von CLA auf die Zellzusammensetzung mononukleärer Zellen des Blutes.

CLA wurde ab dem Tag der Abkalbung (Tag 0) zu dem Futter der CLA-Gruppen (jede Gruppe n=16) in zwei Dosen (CLA-50 und CLA-100) zugesetzt und ab Tag 182 abgesetzt. Der Kontrollgruppe (n=17) wurde das gleiche Futter ohne CLA angeboten. Der Anteil von Monozyten (A), B-Zellen (B), T-Zellen (C) an den MNC wurde mittels Immunphänotypisierung bestimmt. Die Expressionsstärke (MFI) der MHC-II Moleküle auf B-Zellen wurde ins Verhältnis zur Expressionsstärke auf Monozyten dargestellt (D).

4.1.2 Eine CLA-Supplementierung beeinflusst die Subpopulationen unter den T-Zellen

Subpopulationen von T-Zellen, CD4+ $\alpha\beta$ -T-Zellen, CD8+ $\alpha\beta$ -T-Zellen und $\gamma\delta$ -T-Zellen (WC1+) wurden durch CLA unterschiedlich beeinflusst. Während CLA keine Wirkung auf den prozentualen Anteil von $\gamma\delta$ -T-Zellen und nur einen leichten Einfluss auf den Anteil von

CD8+ $\alpha\beta$ -T-Zellen zeigte, wurde der Anteil von CD4+ $\alpha\beta$ -T-Zellen im Unterschied dazu sehr stark beeinflusst. So sank der Anteil dieser Zellen ab Tag 21 p.p., bei der CLA-100 Gruppe drei Wochen nach Beginn der CLA-Supplementierung stark ab ($p < 0,05$) und erreichte damit den niedrigsten Wert im gesamten Verlauf. Von Tag 21 bis Tag 182 p.p. zeigte die CLA-100-Gruppe einen signifikant ($p < 0,05$) niedrigeren Anteil an CD4+ $\alpha\beta$ -T-Zellen als die Kontrollgruppe. Diese Wirkung war 4 Wochen nach dem Absetzen von CLA (Tag 210 p.p.) rückläufig, sodass sich der Mittelwert der CLA-100 Gruppe von Tag 7 vor CLA-Supplementierung wieder einstellte. Die CLA-50 Gruppe wies eine geringgradigere Beeinflussung auf, deren Werte nur tendenziell unter den Werten der Kontrollgruppe lagen, und zudem keine statistische Signifikanz erbrachte ($p > 0,05$) (Abb. 15). Der Anteil der CD8+ $\alpha\beta$ -T-Zellen blieb im Abschnitt von Tag 14 bis Tag 252 p.p. bei der Kontrollgruppe sowie bei der CLA-50 Gruppe konstant, während es bei der CLA-100 Gruppe am Tag 35 p.p. zu einem tendenziellen Anstieg kam, der bis zu Tag 210 p.p. konstant hoch blieb. Zwischen den Tagen 105 und 210 p.p. wies die CLA-100 Gruppe höhere Mittelwerte an CD8+ T-Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe und zur CLA-50 Gruppe auf, was allerdings nur an Tag 196 p.p. (im Vergleich zu Kontrollgruppe ($p = 0,02$)) und an den Tagen 105 und 189 p.p. (im Vergleich zu CLA-50 Gruppe ($p < 0,05$)) signifikant war (Abb. 15). Der außerordentliche Abfall an CD4+ $\alpha\beta$ -T-Zellen bei der CLA-100 Gruppe mit einer leichten Erhöhung des Anteils der CD8+ $\alpha\beta$ -T-Zellen führte zu einem starken Abfall des CD4/CD8-Verhältnisses in dieser Gruppe, welcher zwischen Tag 21 und 182 p.p. signifikant unter den Werten der Kontrollgruppe lag ($p < 0,05$) (Abb. 15).

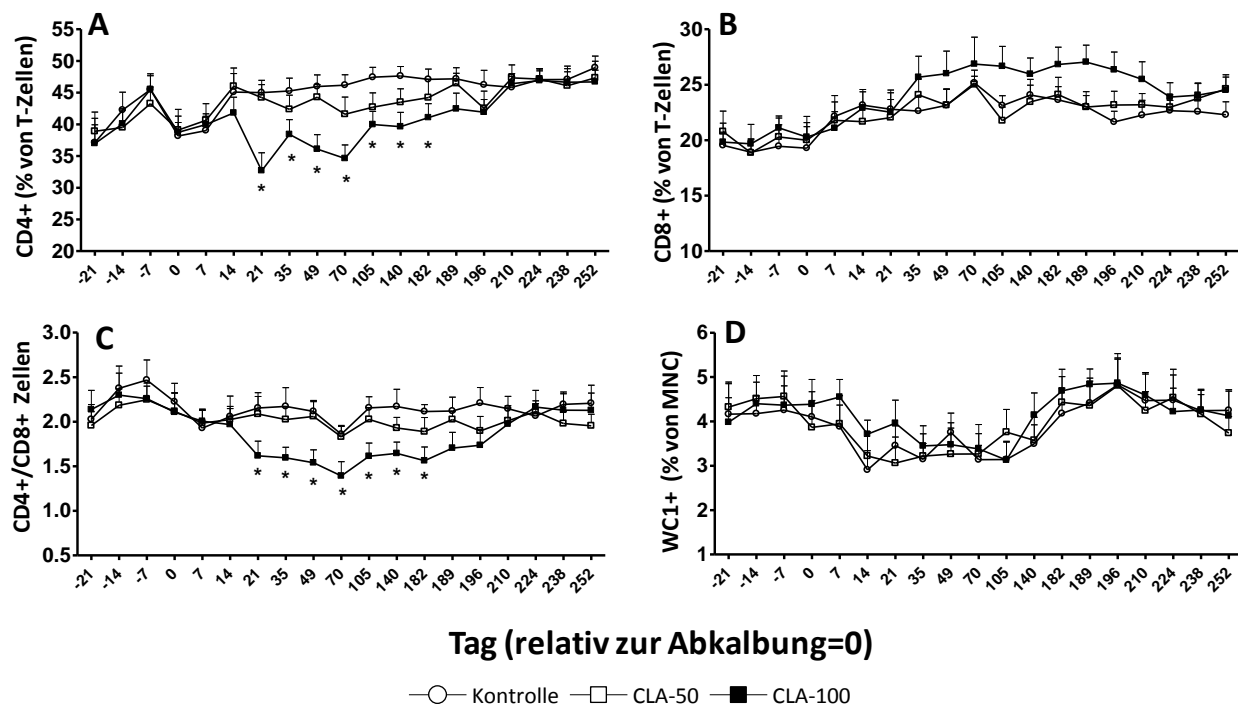


Abb. 15: Der Einfluss von CLA auf die T-Zellen-Suppopulationen .

CLA wurde ab dem Tag der Abkalbung (Tag 0) zum Futter der CLA-Gruppen (jede Gruppe n=16) in zwei Dosen (CLA-50 und CLA-100) zugesetzt und ab Tag 182 abgesetzt. Der Kontrollgruppe (n=17) wurde das gleiche Futter, jedoch ohne Zusatz von CLA, angeboten. Der Anteil von CD4+ T-Zellen (A), CD8+ T-Zellen (B) WC1+ T-Zellen (D), sowie das Verhältnis CD4/CD8 (C) wurde mittels Immunphänotypisierung bestimmt.

4.2 Einfluss der CLA-Supplementierung auf die Phagozytosekapazität neutrophiler Granulozyten

Um die Wirkungen der CLA-Supplementierung auf die Kernfunktion neutrophiler Granulozyten zu prüfen, wurde die Phagozytosekapazität der PMN durch die *Ex vivo*-Inkubation dieser Zellen mit opsonierten, FITC-markierten Staphylokokken in drei verschiedenen Verhältnissen von Bakterien zu PMN (50:1, 100:1, 200:1) durchflusszytometrisch quantifiziert. Der relative Anteil phagozytischer PMN stieg mit zunehmender Bakterienanzahl zu PMN an ($p < 0,001$) (Abb. 16). Bei den Ansätzen des 200:1-Verhältnisses erreichte der Anteil phagozytischer PMN bei einigen Tieren ein Plateau von 80-90 %.

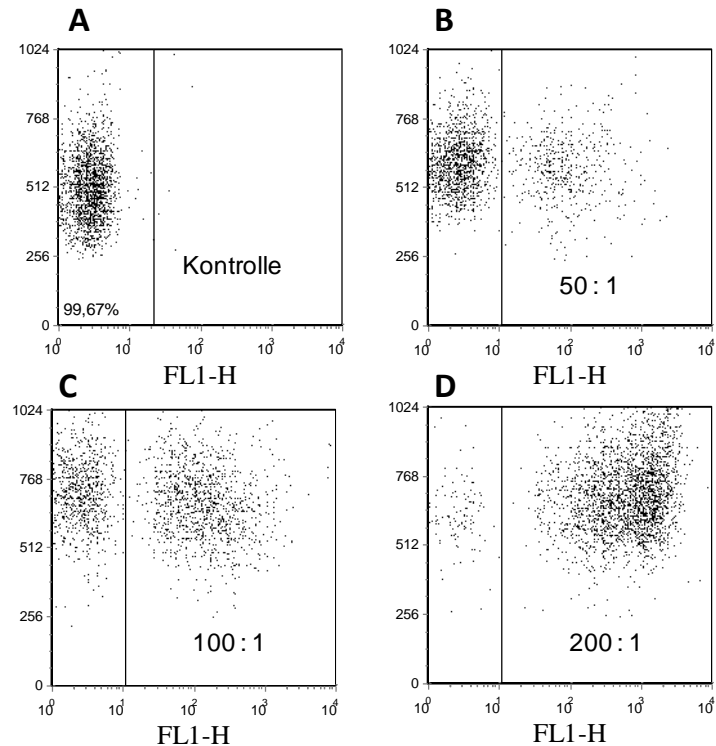


Abb. 16: Zunahme des Anteils phagozytischer PMNs mit steigendem Bakterien zu PMN Verhältnis.

A) Kontrollansatz (PMN ohne Bakterien), B) Bakterien zu PMN-Verhältnis 50:1, C) Bakterien zu PMN-Verhältnis 100:1, D) Bakterien zu PMN-Verhältnis 200:1.

Bereits eine Woche nach Beginn der CLA-Supplementierung war bei der CLA-50 Gruppe ein starker und signifikanter ($p=0,02$) Anstieg des Anteils phagozytischer PMN zu sehen. Zu den meisten untersuchten Zeitpunkten während der CLA-Supplementation zeigte die CLA-50 Gruppe im Vergleich zu der Kontrollgruppe höhere Anteile ($p<0,05$) an phagozytischen PMN. Die Mittelwerte bei der CLA-100 Gruppe waren im Vergleich zu der Kontrollgruppe leicht, jedoch statistisch nicht signifikant ($p>0,05$) erhöht. Ab Tag 189 p.p., eine Woche nach dem Absetzen des CLA-Gemisches, hatten die Werte der einzelnen Gruppen wieder ein vergleichbares Niveau ($p>0,05$).

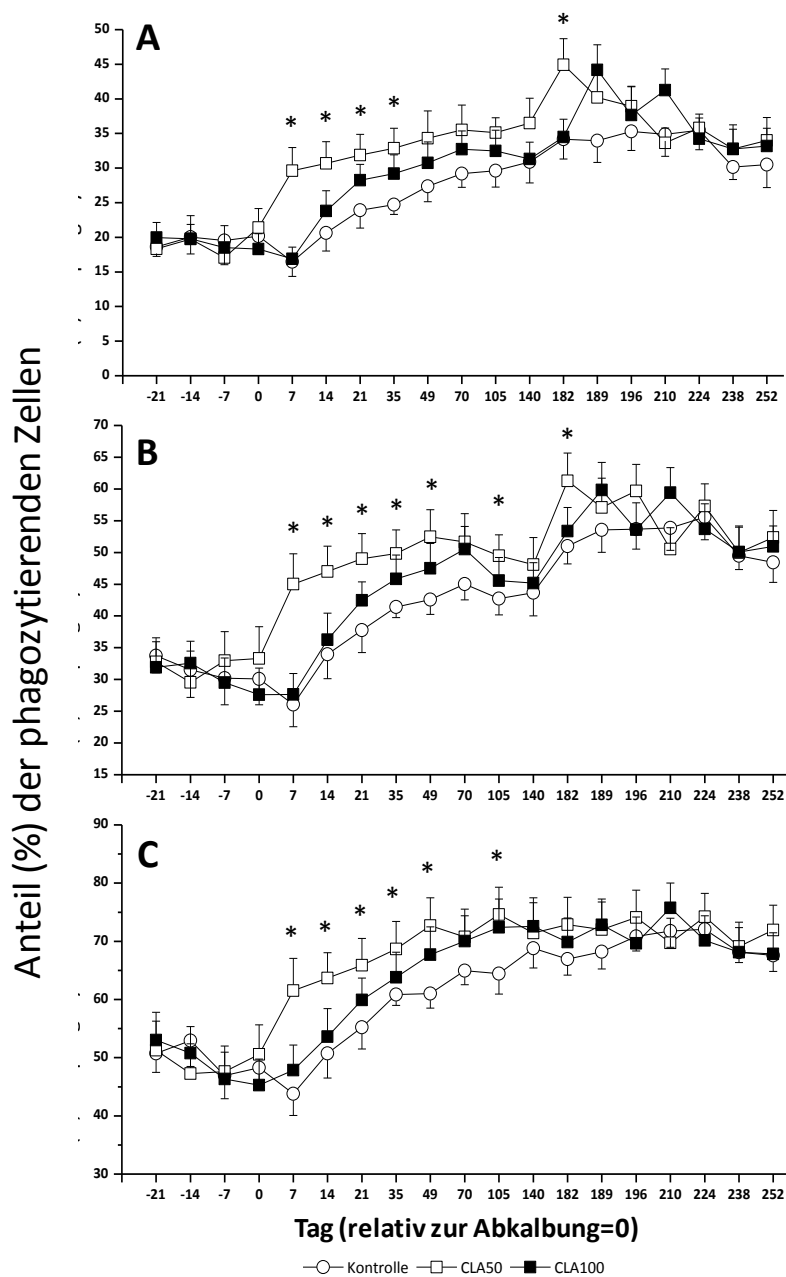


Abb. 17: Einfluss der CLA-Supplementierung auf die Phagozytose bei neutrophilen Granulozyten.

CLA wurde ab dem Tag der Abkalbung (Tag 0) zu dem Futter der CLA-Gruppen (jede Gruppe n=16) in zwei Dosen (CLA-50 und CLA-100) zugesetzt und ab dem Tag 182 abgesetzt. Der Anteil phagozytierender PMN ist für die Bakterien/PMN-Verhältnisse 50:1 (A), 100:1 (B) und 200:1 (C) in Prozent dargestellt.

4.3 Einfluss der CLA-Supplementierung auf die IgG-Konzentration im Blut- und Milchserum

Um eine mögliche modulierende Wirkung der CLA-Supplementierung auf die Immunpolarisierung beim Rind zu untersuchen, wurde die Konzentration beider IgG-Isotypen im Blu- und Milchserum mittels *sandwich Elisa* bestimmt. Nach Titrationsversuchen zur Ermittlung der optimalen optischen Dichten (ODs) bei niedrigen Hintergrundwerten wurde eine Konzentration von 1 µg/ml für die *capture*-Antikörper und von 0,05 µg/ml für die Detektionsantikörper (gilt für IgG1 und IgG2), ausgewählt. Die idealen Serum-Verdünnungen, bei denen eine optimale Abstufung der ODs zu erkennen war lagen für Blutserumproben zwischen $3,16 \times 10^{-5}$ und 1×10^{-7} , und für Milchserumproben zwischen 1×10^{-3} und $3,16 \times 10^{-4}$.

4.3.1 Eine CLA-Supplementierung reduziert den Gehalt beider IgG-Isotypen im Blutserum

Während die Kontrollgruppe und die CLA-50 Gruppe einen kontinuierlichen Anstieg der Konzentration beider IgG-Isotypen ab Tag 7 p.p. aufwiesen ($p < 0,01$), war bei der CLA-100 Gruppe nur ein schwacher ($p > 0,05$) Anstieg zu sehen. Somit lag sie im Abschnitt von Tag 7 p.p. (eine Woche nach Beginn der CLA-Zufütterung) bis Tag 196 p.p. (zwei Wochen nach CLA-Absetzen) mit den IgG1- und IgG2-Konzentrationen unter den Werten der Kontrollgruppe und der CLA-50 Gruppe. Dieser Unterschied war zwischen der CLA-100 Gruppe und der Kontrollgruppe zu allen Zeitpunkten, mit Ausnahme vom Tag 70 p.p. für IgG1 und von den Tagen 49, 70 und 140 p.p. für IgG2 signifikant gesichert ($p < 0,05$). Die Werte der CLA-50 Gruppe verliefen parallel zu den Werten der Kontrollgruppe, lagen allerdings über den Werten der CLA-100 Gruppe, was nur zu einigen Tagen signifikant war ($p < 0,05$). Nach dem Absetzen von CLA waren die IgG1- und IgG2-Konzentrationen der CLA-100 Gruppe mit den Werten anderer zwei Gruppen wieder vergleichbar ($p > 0,05$). Der allgemeine Abfall der Konzentration beider IgG-Isotypen in den Seren der CLA 100-Gruppe führte zu IgG1/IgG2-Verhältnissen, die sich im gesamten Verlauf von den Verhältnissen der anderen Gruppen nicht unterschieden (Abb. 18).

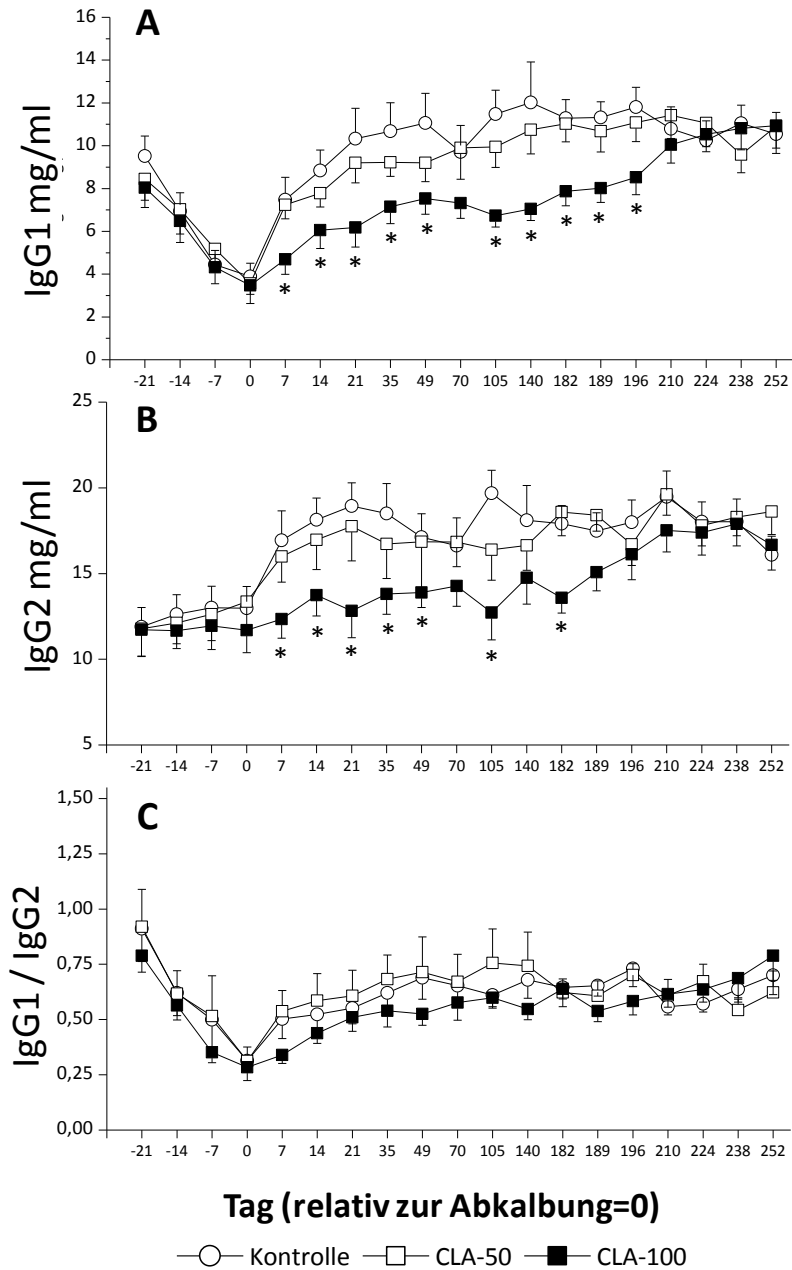


Abb. 18: Einfluss der CLA-Supplementierung auf IgG-Isotypen-Konzentrationen sowie auf das Verhältnis IgG1/IgG2 im Serum.

CLA wurde ab dem Tag der Abkalbung (Tag 0) dem Futter der CLA-Gruppen (jede Gruppe n=16) in zwei Dosen (CLA-50 und CLA-100) zugesetzt und ab dem Tag 182 abgesetzt. Der Kontrollgruppe (n=17) wurde das gleiche Futter, jedoch ohne Zusatz von CLA, angeboten. IgG-Isotyp-Konzentrationen (A,B) wurden in den gewonnenen Serumproben mittels Elisa bestimmt.C) Verhältnis zwischen IgG1 und IgG2.

4.3.2 Eine CLA-Supplementierung reduziert die Konzentration an Milch-IgG1, jedoch nicht IgG2

Ab dem Tag 14 nach der Abkalbung fiel die Konzentration beider IgG-Isotypen kontinuierlich in der Milch aller drei Gruppen ab. Während alle drei Gruppen einen gleichmäßigen Abfall an Serum-IgG2 zeigten, war der Abfall an Milch-IgG1 bei der CLA-100 Gruppe stärker als bei den anderen beiden Gruppen zu sehen, sodass diese Gruppe zu den Tagen 49, 70, 105, 140 ($p < 0,05$) und 182 ($p = 0,06$) p.p. IgG1-Konzentrationen in der Milch aufwies, die unter den Werten der Kontrollgruppe lagen. Im Vergleich zu der CLA-50 Gruppe waren die Werte nur an Tag 70 p.p. signifikant niedriger ($p < 0,05$). In der Zeit nach dem Absetzen der Supplementierung waren die Werte der einzelnen Gruppen wieder vergleichbar ($p > 0,05$). Während des gesamten Verlaufs waren die IgG1/IgG2-Verhältnisse aller drei Gruppen miteinander vergleichbar ohne signifikante Einflüsse durch CLA-Supplementierung bzw. nach CLA-Absetzen zu sehen ($p > 0,05$) (Abb. 19). Eine mögliche lineare Korrelation zwischen der Konzentration der IgG-Isotypen im Blut und ihren Konzentrationen in der Milch wurde anhand des Korrelationskoeffizienten nach Pearson überprüft. Während sich eine positive ($r = 0,55$) signifikante ($p < 0,0001$) Korrelation zwischen der IgG1-Konzentration im Serum und der im Milchserum an Tag 14 p.p. ergab, zeigte die IgG2-Konzentration im Blutserum keinen signifikanten Zusammenhang mit der im Milchserum ($p = 0,6$). Für IgG1 war die Korrelation zu den meisten untersuchten Zeitpunkten signifikant ($p < 0,01$), IgG2 zeigte hingegen zu keinem Zeitpunkt eine signifikante Korrelation ($p > 0,05$).

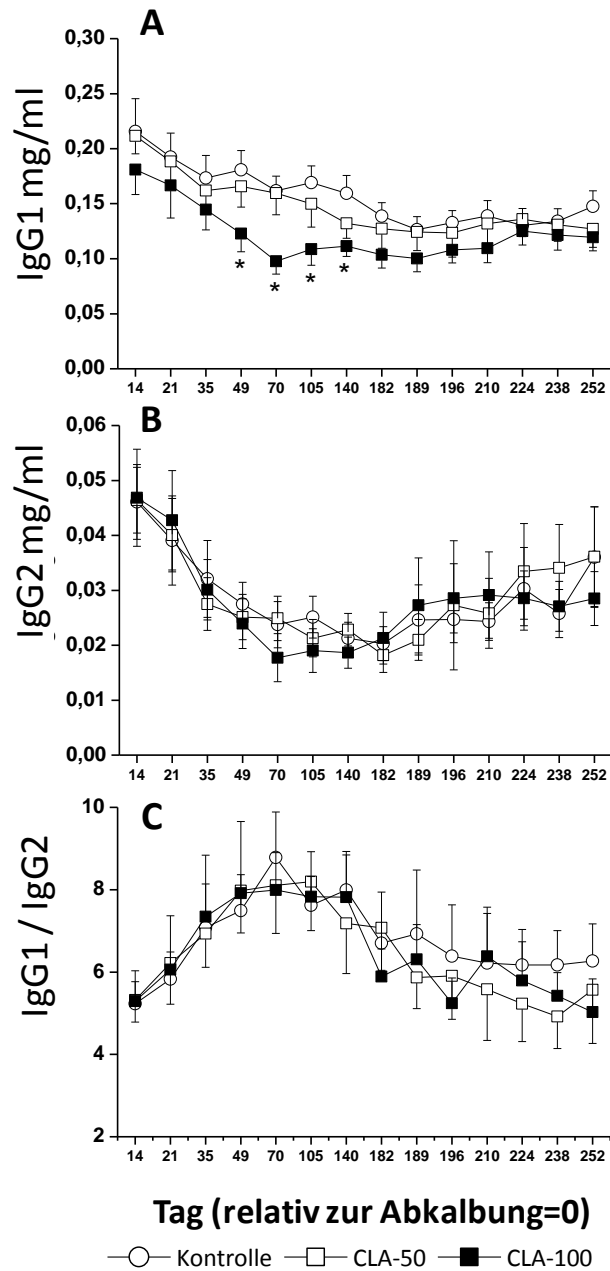


Abb. 19: Einfluss der CLA-Supplementierung auf IgG-Isotypen-Konzentrationen sowie auf das Verhältnis IgG1/IgG2 im Milchserum.

CLA wurde ab dem Tag der Abkalbung (Tag 0) zum Futter der CLA-Gruppen (jede Gruppe n=16) in zwei Dosen (CLA-50 und CLA-100) zugesetzt und ab Tag 182 abgesetzt. Der Kontrollgruppe (n=17) wurde das gleiche Futter, jedoch ohne Zusatz von CLA, angeboten. IgG-Isotyp-Konzentrationen (A,B) wurden in den gewonnenen Milchproben bei allen Tieren mittels Elisa bestimmt. C) Verhältnis zwischen IgG1 und IgG2.

4.4 Einfluss der CLA-Supplementierung auf die absolute Zellzusammensetzung des peripheren Blutes

Um zu prüfen, ob die durch die relative Quantifizierung nachgewiesenen Wirkungen der CLA-Supplementierung auf die Zellzusammensetzung des Blutes (4.1) sich auch in unterschiedlichen absoluten Werten äußern, erfolgte in einem zweiten Fütterungsversuch - basierend auf den Ergebnissen des ersten Fütterungsversuchs - ab dem Tag der Abkalbung eine Supplementation mit 100 g CLA pro Tier und Tag. Um die absoluten Zellzahlen von Granulozyten und mononukleären Zellen im Blut zu bestimmen, wurden zuerst ihre prozentualen Anteile an den Gesamtleukozyten (nach der Entfernung von Erythrozyten) durchflusszytometrisch erfasst. Für die weitere Charakterisierung der MNC-Populationen wurde die Membranimmunfluoreszenz (3.2.5) durchgeführt. Die ermittelten relativen Zellzahlen wurden mit den absoluten Blut-Leukozytenzahlen verrechnet. Leukozytenzahlen wurden freundlicherweise von der Klinik für Rinder, Tierärztliche Hochschule Hannover zur Verfügung gestellt.

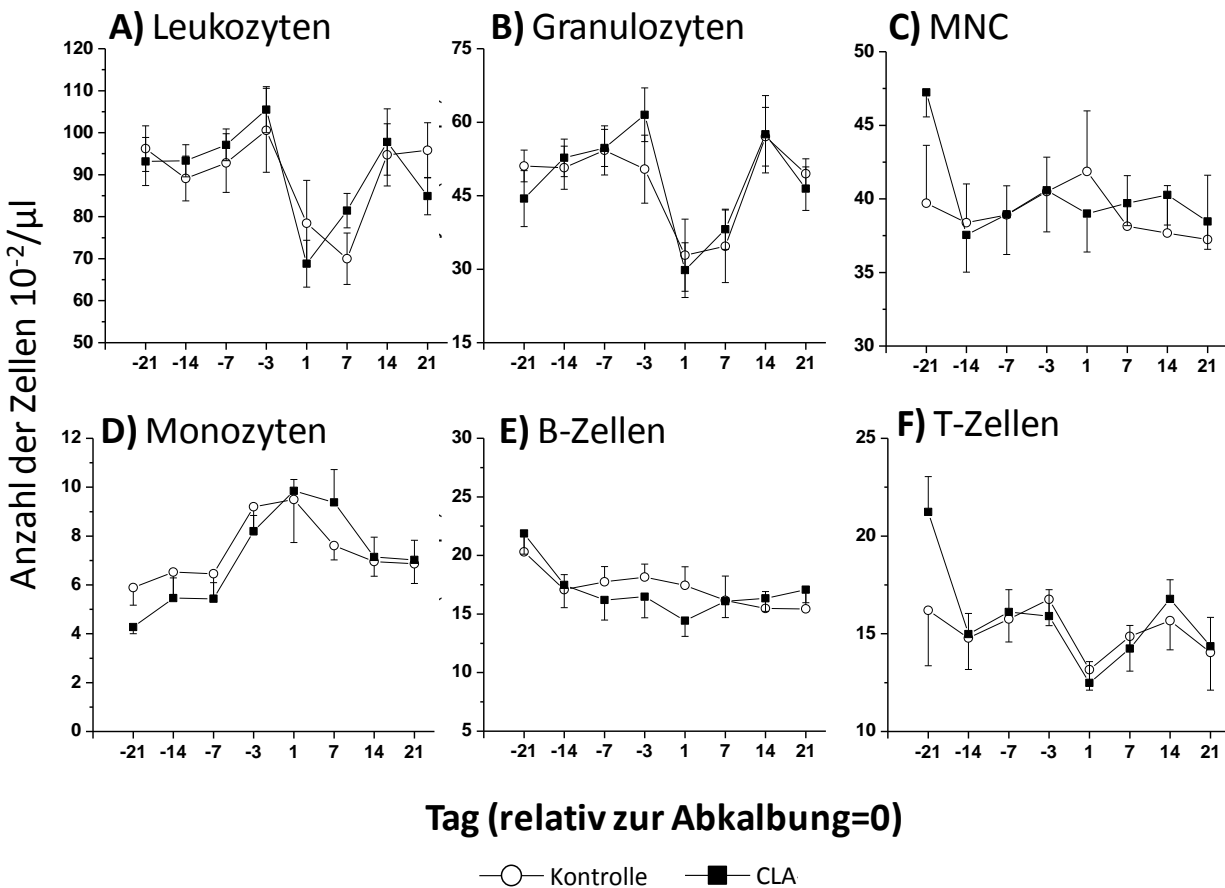


Abb. 20: Einfluss der CLA-Supplementation auf die absolute Anzahl von Leukozyten, Granulozyten und mononukleären Zellen im Blut.

CLA wurde ab dem ersten Tag nach der Abkalbung (Tag 1 p.p.) und bis Tag 21 p.p. angeboten. Die absolute Anzahl von (A) Leukozyten, (B) Granulozyten, (C) MNC, (D) Monozyten, (E) B-Zellen und (F) T-Zellen im Blut ist als das Hundertfache an Zellen pro μL Blut dargestellt.

Eine CLA-Supplementierung hatte keinen signifikanten Einfluss auf die absoluten Zahlen der Gesamtleukozyten, Granulozyten, MNC, Monozyten, B-Zellen und T-Zellen im Blut (Abb. 20). Die CLA-Gabe führte zu einem deutlichen Rückgang der absoluten Anzahl an CD4 positiven $\alpha\beta$ -T-Zellen, was, wie im ersten Versuch, zu demselben Zeitpunkt nach Beginn der CLA-Supplementierung auftrat. Bei der CLA-100 Gruppe fiel die Anzahl der CD4 positiven T-Zellen stark und signifikant von Tag 14 p.p. ($8,2 \pm 0,7 \times 10^2/\mu\text{L}$) bis Tag 21 p.p. ($5,4 \pm 0,4 \times 10^2/\mu\text{L}$) ab ($p < 0,01$) und lag unter dem Mittelwert ($p = 0,07$) der Kontrollgruppe ($7,3 \pm 0,9 \times 10^2/\mu\text{L}$). Die untersuchten Gruppen zeigten keine signifikanten Unterschiede im Hinblick auf die Anzahl CD8-positiver $\alpha\beta$ -T-Zellen, $\gamma\delta$ -T-Zellen oder auf das CD4/CD8-Verhältnis ($p > 0,05$) (Abb. 21).

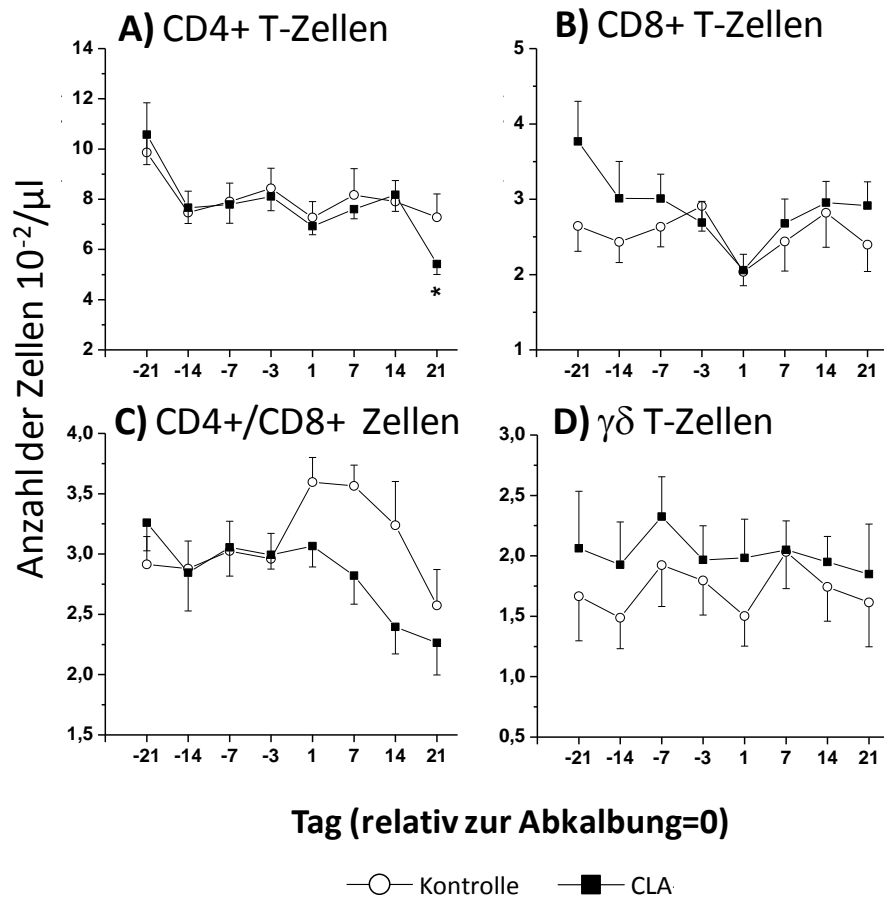


Abb. 21: Der Einfluss von CLA auf die absolute Anzahl von CD4+, CD8+ $\alpha\beta$ -T-Zellen und $\gamma\delta$ -T-Zellen.

CLA wurde ab dem ersten Tag nach der Abkalbung (Tag 1 p.p.) und bis Tag 21 p.p. angeboten. Die absolute Anzahl von CD4+ T-Zellen (A), CD8+ T-Zellen (B), $\gamma\delta$ -T-Zellen (D) ($\times 10^2/\mu\text{L}$) sowie das Verhältnis CD4/CD8 (C) ist dargestellt.

4.5 Peripartale Veränderungen des Immunsystems bei Milchkühen

Um die Reaktion des bovinen Immunsystems auf die Abkalbung zu prüfen, wurden die untersuchten Immunparameter im Hinblick auf ihre Veränderungen im peripartalen Zeitraum bewertet.

Im Unterschied zu MNCs, deren Anzahl während der peripartalen Zeit keine Änderung erfuhr, fiel die Anzahl der Granulozyten im Blut ab Tag 1 p.p. deutlich ab ($p < 0,001$) und war mit einer Reduktion der Gesamtleukozytenzahl verbunden ($p < 0,001$). In der postpartalen Zeit stieg sowohl die Granulozyten- als auch die Leukozytenzahl ab Tag 7 p.p. an. Beide Werte waren zwei Wochen nach der Abkalbung (Tag 14 p.p.) signifikant höher ($p < 0,05$) als an Tag 1 p.p. (Abb. 20). Obwohl die MNC-Zahl durch die Abkalbung nicht beeinflusst wurde, zeigte ihre relative Zellzusammensetzung deutliche Veränderungen in der peripartalen Zeit. Die Abkalbung führte bei allen Gruppen zu einem signifikanten Anstieg des Anteils von Monozyten (von Tag 7 *a.p* auf Tag 0, $p = 0,0003$, während bei den B- und T-Zellen ein Rückgang ihrer Anteile ($p < 0,01$) zu beobachten war. Der minimale Wert des Anteils an B-Zellen wurde an Tag 7 p.p. und an T-Zellen an Tag 0 erreicht. In den ersten Wochen nach der Abkalbung zeigten die Populationen einen umgekehrten Verlauf, indem der Anteil an Monozyten an Tag 14 p.p. stark absank ($p < 0,001$). Der Anteil von B- ($p > 0,05$) und T-Zellen ($p < 0,05$) stieg hingegen an diesem Tag an. Im Verlauf der Laktation zeigten die Tiere einen kontinuierlichen Abfall des Anteils von B-Zellen. Im Gegensatz dazu gab es bei den T-Zellen und Monozyten einen kontinuierlichen Anstieg, der bei Monozyten bis Tag 105 andauerte. An Tag 140 p.p. fiel der Anteil von Monozyten nochmal stark ($p < 0,001$) ab und blieb dann bis Tag 252 p.p. konstant (Abb. 14).

Zusätzlich zu der relativen Quantifizierung der MHC-II positiven Zellen (B-Zellen und Monozyten), wurde die Expressionsstärke dieser Moleküle auf B-Zellen und auf Monozyten anhand der Mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) bestimmt und das B/M-MFI-Verhältnis bestimmt. Das B/M-MFI-Verhältnis zeigte nach einem kontinuierlichen Anstieg an Tag 7 p.p. den Maximalwert ($p < 0,05$) und fiel danach bis an Tag 14 p.p. signifikant ($p < 0,05$) ab (Abb. 14).

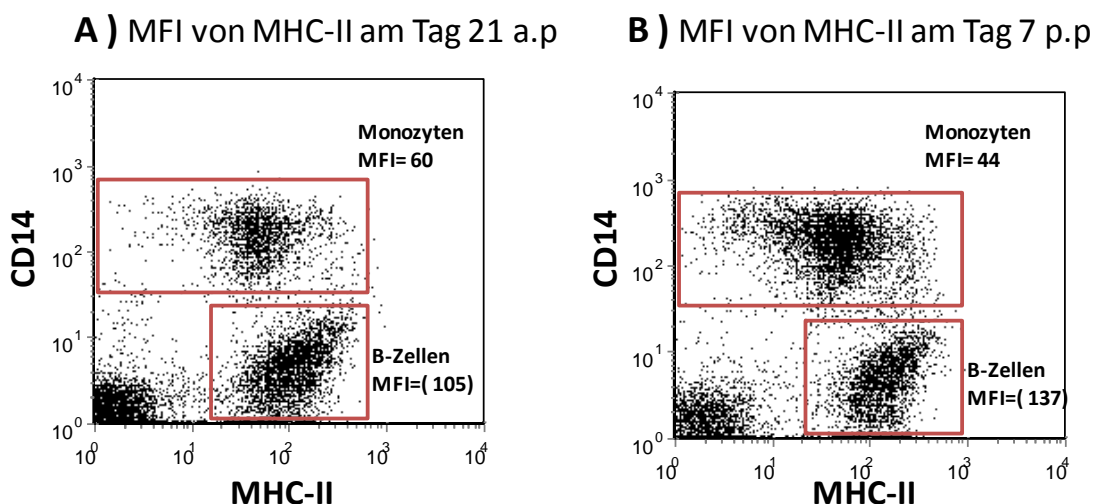


Abb. 22: Veränderung der Expressionsstärke von MHC-II Molekülen auf B-Zellen und auf Monozyten.

Nach durchflusszytometrischer Zweifarbenanalyse (MHC-Klasse-II/CD14) wurde die relative Expressionsstärke der MHC-II Moleküle auf B-Zellen und auf Monozyten anhand der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) am Tag 21 a.p (A) und an Tag 7 p.p. (B) bestimmt.

Die Anteile der T-Zell-Subpopulationen veränderten sich um die Abkalbung unterschiedlich. So blieb der Anteil der $\gamma\delta$ -T-Zellen und der CD8+ $\alpha\beta$ -T-Zellen bis zur Abkalbung konstant, während sich der Anteil von CD4+ $\alpha\beta$ -T-Zellen von Tag 21 a.p. auf Tag 7 a.p. steigerte ($p < 0,01$) und zum Zeitpunkt der Abkalbung auf Werte abfiel ($p < 0,001$), die mit den Werten an Tag 21 a.p. vergleichbar waren. Für das CD4+/CD8+-Verhältnis zeigte sich ein deutlicher Anstieg zu den Tagen 14 ($p = 0,03$) und 7 ($p = 0,0004$) vor der Abkalbung, der von einem Abfall zu Tag 7 p.p. ($p < 0,001$) (Abb. 15) gefolgt war.

Die neutrophilen Granulozyten zeigten während der letzten drei Wochen vor der Abkalbung keine signifikante Änderung ihrer Phagozytosekapazität. Nach der Abkalbung fingen die Werte ab Tag 7 p.p. bei allen Gruppen anzusteigen und erreichten an Tag 182 p.p. Mittelwerte, die doppelt so hoch wie am Abkalbungstag waren ($p < 0,01$) (Abb. 17).

Die Abkalbung führte bei allen Kühen zu einem selektiven und kontinuierlichen Abfall an Serum-IgG1 von Tag 21 a.p. ($8,6 \pm 0,5$ mg/ml) auf Tag 0 ($3,6 \pm 0,4$ mg/ml) ($p < 0,001$), während die Serum-IgG2-Werte in den letzten drei Wochen vor der Abkalbung konstant blieben. Mit $0,9 \pm 0,08$ wies das IgG1/IgG2-Verhältnis an Tag 21 a.p. auf ähnliche Konzentrationen beider Isotypen im Blut hin. Der selektive Abfall der IgG1-Konzentration während der letzten drei Wochen vor

der Abkalbung führte zu einem signifikanten Abfall des IgG1/IgG2-Verhältnisses an Tag 14 a.p ($0,6 \pm 0,05$), Tag 7 a.p ($0,5 \pm 0,08$) sowie am Tag der Abkalbung ($0,3 \pm 0,03$). IgG2-Konzentrationen im Serum von allen Gruppen waren zur Abkalbung 3- bis 4-mal höher als die Serum-IgG1-Konzentrationen ($p < 0,00001$) (Abb. 18). Die Milchproben, die ab der zweiten Woche nach der Abkalbung gesammelt wurden, wiesen einen kontinuierlichen Konzentrations-Abfall beider IgG-Isotypen in allen Gruppen auf. Im Gegensatz zu ihren vergleichbaren Konzentrationen im Serum, waren die IgG-Isotypen mit sehr unterschiedlichen Mengen in der Milch vertreten. Während das IgG1/IgG2-Verhältnis im Serum bei 0,9 lag, zeigten alle Gruppen ein IgG1/IgG2-Verhältnisse zwischen 5,2 bis 5,3 in der Milch. Durch den stärkeren Abfall der Milchserum-IgG2-Konzentration gegenüber der von IgG1 stieg das IgG1/IgG2-Verhältnis bei allen Gruppen von Tag 14 bis Tag 70 p.p. signifikant ($p < 0,05$) an und fiel erst ab Tag 140 p.p. langsam ab (Abb. 19).

4.6 Einfluss von CLA-Isomeren auf die Stimulierbarkeit mononukleärer Zellen nach *In-vitro*-Stimulation

Mithilfe der *In vitro*-Stimulation wurde geprüft, ob die CLA-Isomere proliferationsinduzierend oder -hemmend wirken und wie sich CLA-Isomere (*c*9, *t*11- und *t*10, *c*12-CLA) auf die Proliferationsreaktion boviner mononukleärer Zellen gegenüber verschiedenen Stimuli auswirken. Für diese Untersuchungen wurden das Superantigen SEA und das Lektin ConA als Stimulanzen gewählt, da sie sich im Modus der Zellaktivierung deutlich unterscheiden. In zusätzlichen Kontrollansätzen wurde das CLA-Lösungsmittel DMSO auf eine mögliche Wirkung geprüft. Die Stimulation mit den Mitogenen führte zur Bildung von Blasten (großen Zellen), die neben der Gesamtzahl vitaler lymphoider Zellen separat quantifiziert wurden. In Abb. 23 und Abb. 24 ist die Anzahl vitaler lymphoider Zellen und vitaler Blasten an Tag 6 der *In-vitro*-Stimulation dargestellt.

Die Stimulation mit ConA induzierte mehr Blasten als SEA ($p = 0,000002$). SEA führte zur Entstehung von signifikant ($p < 0,000001$) mehr Blasten im Vergleich zur Mediumkontrolle. Die Stimulation mit SEA und ConA führte zu einem Abfall der Zahl vitaler Zytten, was nur für ConA signifikant war ($p < 0,04$). Im Vergleich zur Mediumkontrolle bewirkten die beiden CLA-Isomere - sowohl nach der Stimulation mit ConA als auch mit SEA - in den Konzentration 25 $\mu\text{mol/L}$ ($p < 0,05$), 50 $\mu\text{mol/L}$ ($p < 0,01$) und 100 $\mu\text{mol/L}$ ($p < 0,0001$) durchgängig eine Hemmung der Blastogenese. Die hemmende Wirkung der CLA-Isomere war nach der Stimulation mit ConA Dosis-abhängig, während durch die SEA-Stimulation (T-Zellrezeptor-abhängige Stimulation) die höchste hemmende Wirkung schon mit der 25 $\mu\text{mol/L}$ CLA zu erreichen war. Eine Reduktion der

Zahl vitaler Zytten wurde nur durch die höchste Konzentration (100 $\mu\text{mol/L}$) der CLA-Isomere nach ConA-Stimulation erreicht ($p < 0,01$).

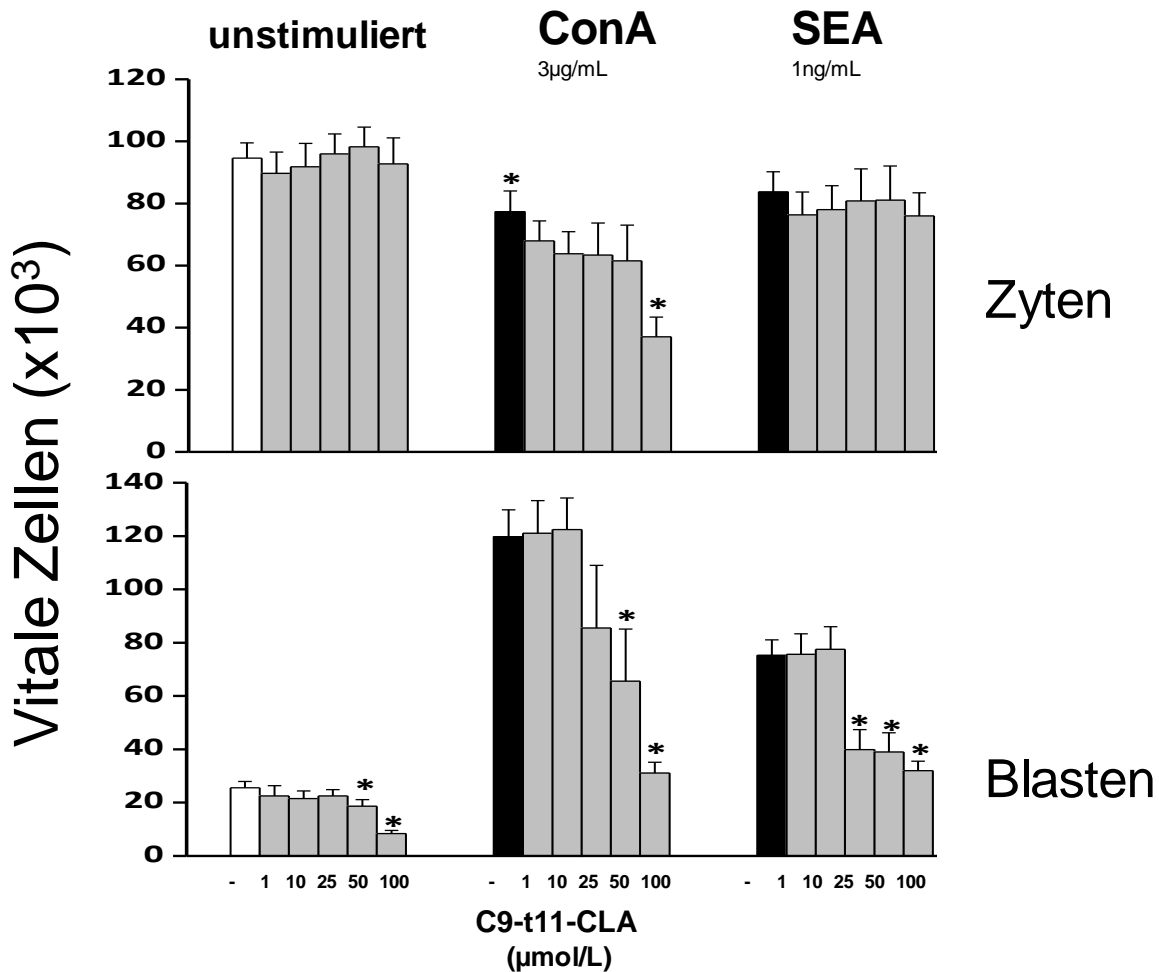


Abb. 23: Einfluss von Cis9-trans11-CLA auf die Mitogen-induzierte Blastogenese boviner MNC nach in vitro Stimulation.

Frisch separierte MNC wurden zusammen mit dem CLA-Isomer *Cis9-trans11* in verschiedenen Konzentrationen (1 $\mu\text{mol/L}$, 10 $\mu\text{mol/L}$, 25 $\mu\text{mol/L}$, 50 $\mu\text{mol/L}$ und 100 $\mu\text{mol/L}$) mit und ohne Zusatz von Staphylokokken Enterotoxin A (SEA, 1 ng/ml) oder Concanavalin A (ConA 3 $\mu\text{g/ml}$) inkubiert. Die Zellen wurden über 6 Tage bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM (n=8) der Gesamtzahl vitaler kleiner lymphoider Zellen und der Anzahl vitaler Blasten. Signifikante Unterschiede der Ansätze mit CLA beziehen sich auf den Mitogen-stimulierten Ansatz ohne CLA.

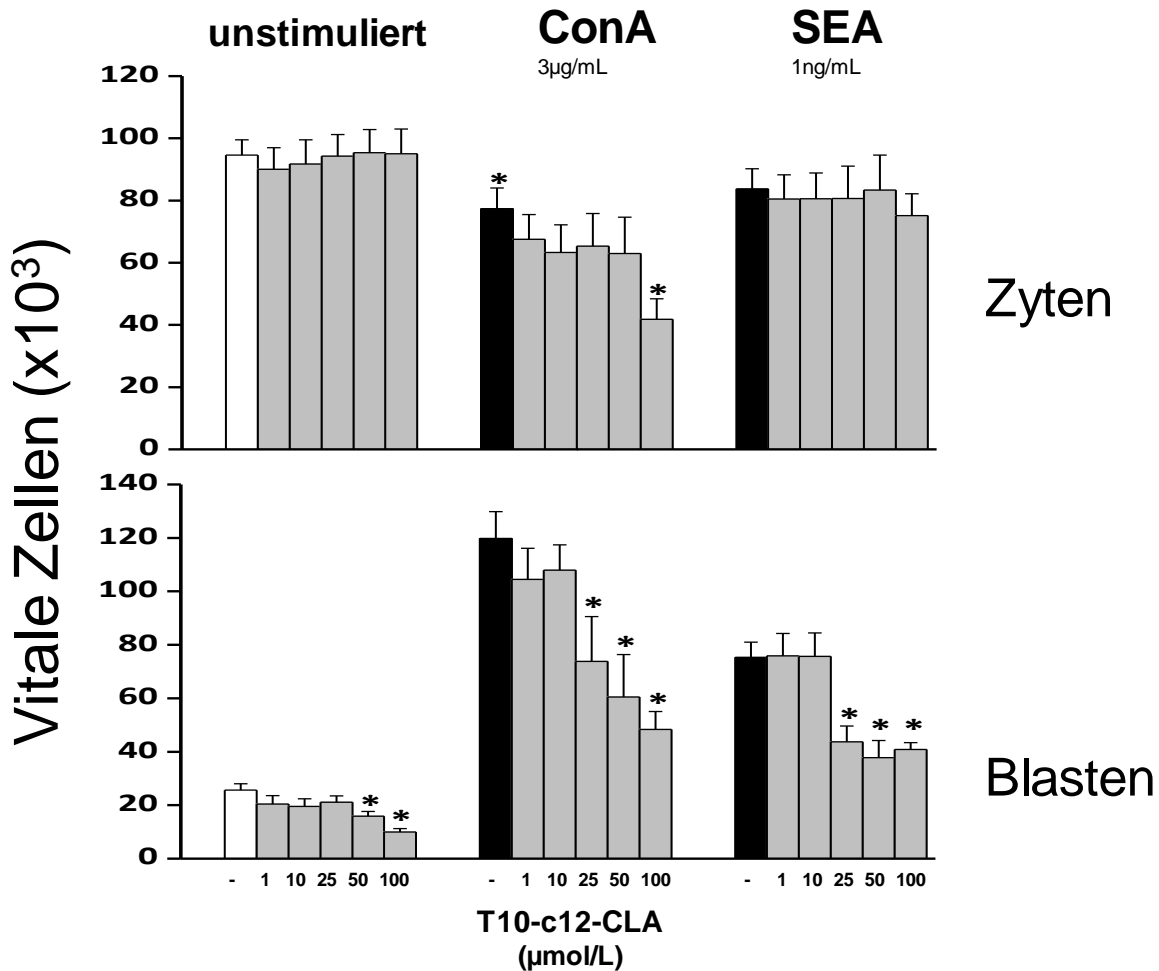


Abb. 24 Einfluss von *Trans10-cis12*-CLA auf die Mitogen-induzierte Blastogenese boviner MNC nach *In vitro*-Stimulation.

Frisch separierte MNC wurden zusammen mit dem CLA-Isomer *Trans10-cis12* (10-12) in verschiedenen Konzentrationen (1 µmol/L, 10 µmol/L, 25 µmol/L, 50 µmol/L und 100 µmol/L) mit und ohne Zusatz von Staphylokokken Enterotoxin A (SEA, 1 ng/ml) oder Concanavalin A (ConA 3 µg/ml) inkubiert. Die Zellen wurden über 6 Tage bei 37°C und 5% CO₂ bebrütet. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM (n=8) der Gesamtzahl vitaler kleiner lymphoider Zellen und der Anzahl vitaler Blasten. Signifikante Unterschiede der Ansätze mit CLA beziehen sich auf den Mitogen-stimulierten Ansatz ohne CLA

4.7 Einfluss der CLA-Isomere auf die T-Zellsubpopulationen nach *In-vitro*-Stimulation

Nachdem sich eine hemmende Wirkung beider CLA-Isomere auf die Mitogen-induzierte Proliferation der MNC feststellen ließ, wurde geprüft, ob die CLA-Isomere die Zusammensetzung der Zellpopulationen unter den Zytten und den Blasten und somit das Verhältnis CD4-positiver zu CD8-positiven Zellen nach der Stimulation mit SEA beeinflussen. Dazu wurden mononukleäre Zellen von 4 Tieren über 6 Tage in An- oder Abwesenheit der CLA-Isomere mit dem Superantigen SEA (1 ng/ml) stimuliert oder als unstimulierte Kontrolle belassen. Anhand der direkten Membranimmunfluoreszenz mit Antikörpern gegen die Oberflächenmoleküle CD4 und CD8 wurde der Anteil vitaler CD4- und CD8-positiver Zytten und Blasten durchflusszytometrisch erfasst und zueinander ins Verhältnis gesetzt. In unstimulierten Ansätzen lagen überwiegend mehr CD4-positive Zellen vor (Tab. 11). In den mit SEA stimulierten Ansätzen war der Anteil der CD8-positiven Zellen höher als in den Mediumkontrollen, was für ein niedriges CD4/CD8-Verhältnis ($p = 0,0002$) sorgte. Weder alleine noch nach Stimulation mit SEA beeinflussten die CLA-Isomere das CD4/CD8-Verhältnis unter den Zytten oder unter den Blasten ($p > 0,05$).

Tab. 11 CD4+/CD8+ Verhältnis unter Zytten und Blasten nach 6-tägiger *In-vitro*-Stimulation boviner MNC mit SEA (1 ng/ml) im Vergleich zur Mediumkontrolle.

Verhältnis CD4+/CD8+ Zytten							
		Trans10-cis12-CLA			Cis9-trans11-CLA		
		25µmol/L	50µmol/L	100µmol/L	25µmol/L	50µmol/L	100µmol/L
Medium	1,4±0,1	1,4±0,1	1,5±0,2	1,4±0,2	1,4±0,1	1,4±0,2	1,4±0,2
SEA	0,6±0,1	0,7±0,1	0,7±0,1	0,6±0,1	0,7±0,1	0,7±0,1	0,7±0,1
Verhältnis CD4+/CD8+ Blasten							
		Trans10-cis12-CLA			Cis9-trans11-CLA		
		25µmol/L	50µmol/L	100µmol/L	25µmol/L	50µmol/L	100µmol/L
Medium	0,9±0,1	1,1±0,3	1,1±0,3	0,8±0,3	1,1±0,3	1,1±0,3	0,8±0,2
SEA	0,6±0,1	1,0±0,3	1,1±0,3	0,9±0,1	0,9±0,2	1,0±0,2	0,9±0,1

Frisch separierte MNC wurden zusammen mit dem CLA-Isomer *Trans10-cis12* (10-12) in verschiedenen Konzentrationen (25 µmol/L, 50 µmol/L und 100 µmol/L) mit und ohne Zusatz von Staphylokokken Enterotoxin A (SEA, 1 ng/ml) inkubiert. Die Zellen wurden über 6 Tage bei 37°C und 5% CO₂ bebrütet. Danach wurden die Zellen mit anti-CD4 und anti-CD8 Antikörper gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Mittelwerte von 4 Tieren ± SEM; Unterschiede zwischen Kontrolle und CLA-Ansätzen sind nicht signifikant.

4.8 Beeinflussung der CLA- und PGJ2-induzierten Hemmung der Blastogenese von bovinen MNC durch den PPAR γ -Antagonisten GW9662

Um zu prüfen, ob die Wirkungen von CLA auf die Immunzellen PPAR γ -vermittelt sind, wurde der Einfluss des PPAR γ -Antagonisten GW9662 auf die CLA-induzierte Hemmung der MNC-Proliferation untersucht. Zum Vergleich wurde der PPAR γ -Ligand PGJ2 in dem Versuch eingesetzt. Dazu wurden mononukleäre Zellen von 7 Tieren über 6 Tage mit dem Superantigen SEA (1 ng/ml) in An- oder Abwesenheit von C9-t11-CLA, PGJ2 oder GW9662 stimuliert. In Parallelansätzen wurden die PPAR γ -Liganden (C9-t11-CLA oder PGJ2) mit dem PPAR γ -Antagonisten GW9662 inkubiert. Nach 6-tägiger Inkubation wurde die Gesamtzahl vitaler Zellen und die Anzahl vitaler Blasten und Zytoten mittels Referenzzellverfahren bestimmt. Die Stimulation mit dem Superantigen SEA induzierte nach 6 Tagen signifikant mehr Blasten im Vergleich zur Mediumkontrolle ($p=0,0001$). Der Zusatz von PGJ2, CLA25 sowie CLA50 führte zum signifikanten Rückgang ($p<0,01$) der Anzahl vitaler Blasten, wobei die stärkste Hemmung der Blastogenese durch PGJ2 zu sehen war. Die niedrigste Konzentration von GW9662 (0,1 $\mu\text{mol/L}$) hemmte weder die SEA-induzierte MNC-Proliferation noch die CLA- oder PGJ2-induzierte Hemmung der Proliferation ($p>0,05$). Die Höchste Konzentration von GW9662 (1 $\mu\text{mol/L}$) führte hingegen zur Hemmung der SEA-induzierten Blastogenese ($p<0,01$) und zur Verstärkung ($p<0,01$) der CLA- und PGJ2-induzierten Hemmung der Blastogenese. (Abb. 25).

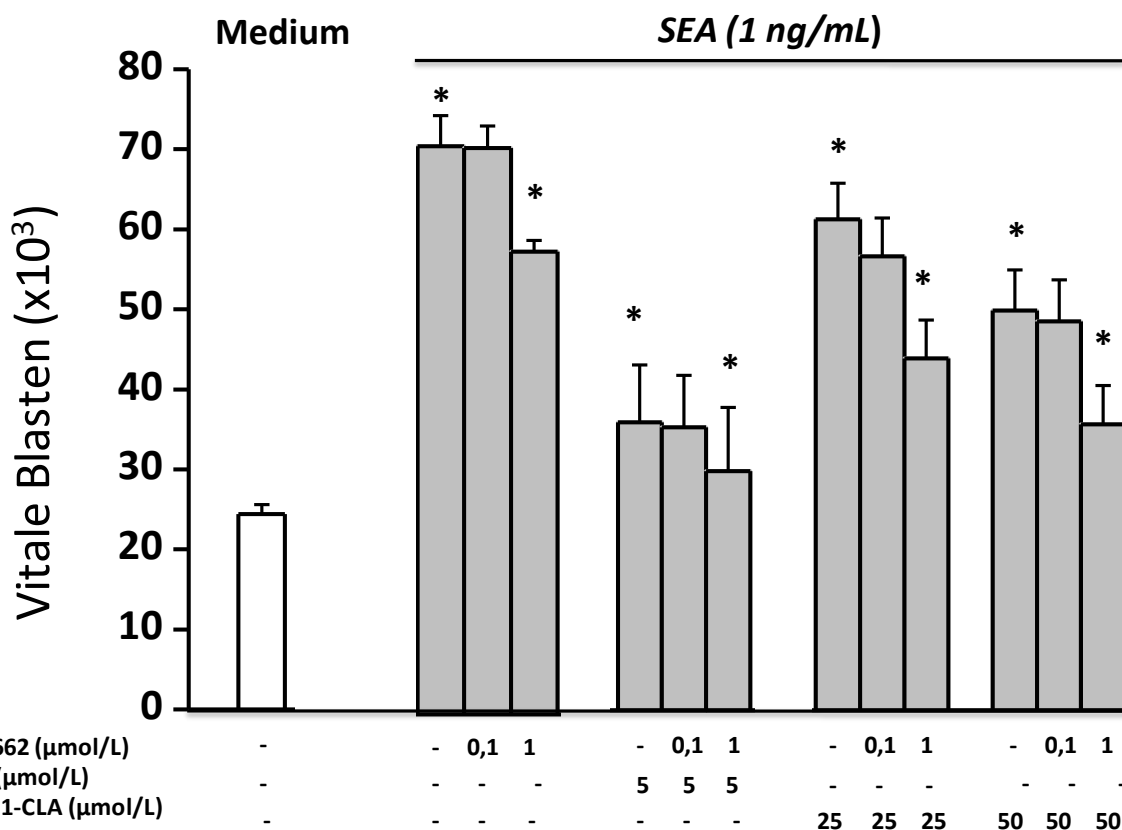


Abb. 25: Einfluss des PPAR γ -Antagonisten GW9662 auf die CLA- bzw. PGJ2-induzierte Hemmung der Blastogenese von bovinen MNC.

Frisch separierte MNC wurden mit dem Superantigen SEA (1 ng/ml) in An- oder Abwesenheit vom CLA-Isomer *Cis9-trans11* (25 μ mol/L und 50 μ mol/L), mit dem PPAR γ -Liganden PGJ2 (5 μ mol/l) oder mit dem PPAR γ -Antagonisten GW9662 (0,1 oder 1 μ mol/L) *in vitro* stimuliert. Die Zellen wurden über 6 Tage bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM der Gesamtzahl vitaler Blasten (n=7).

4.9 Beeinflussung der Überlebensrate mononukleärer Zellen durch CLA nach *In vitro*-Stimulation

In diesem Versuchsabschnitt sollte der Einfluss von CLA auf die Absterberate von mononukleären Zellen untersucht werden. Dazu wurden Kulturen von bovinen MNC über 24 Stunden mit SEA in An- oder Abwesenheit von *Cis9-trans11*-CLA (10 oder 50 μ mol/L) stimuliert. Ansätze nur mit CLA oder dem CLA-Lösungsmittel DMSO dienten zur Kontrolle. Um zu prüfen, ob eine Vorstimulation der Zellen in Abwesenheit von CLA einen Einfluss auf die Ergebnisse hat, wurden die Zellen in einigen Ansätzen zuerst über 20 Stunden mit SEA stimuliert

und dann für 4 Stunden mit CLA inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durchflusszytometrisch erfasst und quantifiziert. Die Anzahl vitaler MNC in den verschiedenen Ansätzen ist in Abb. 26 dargestellt.

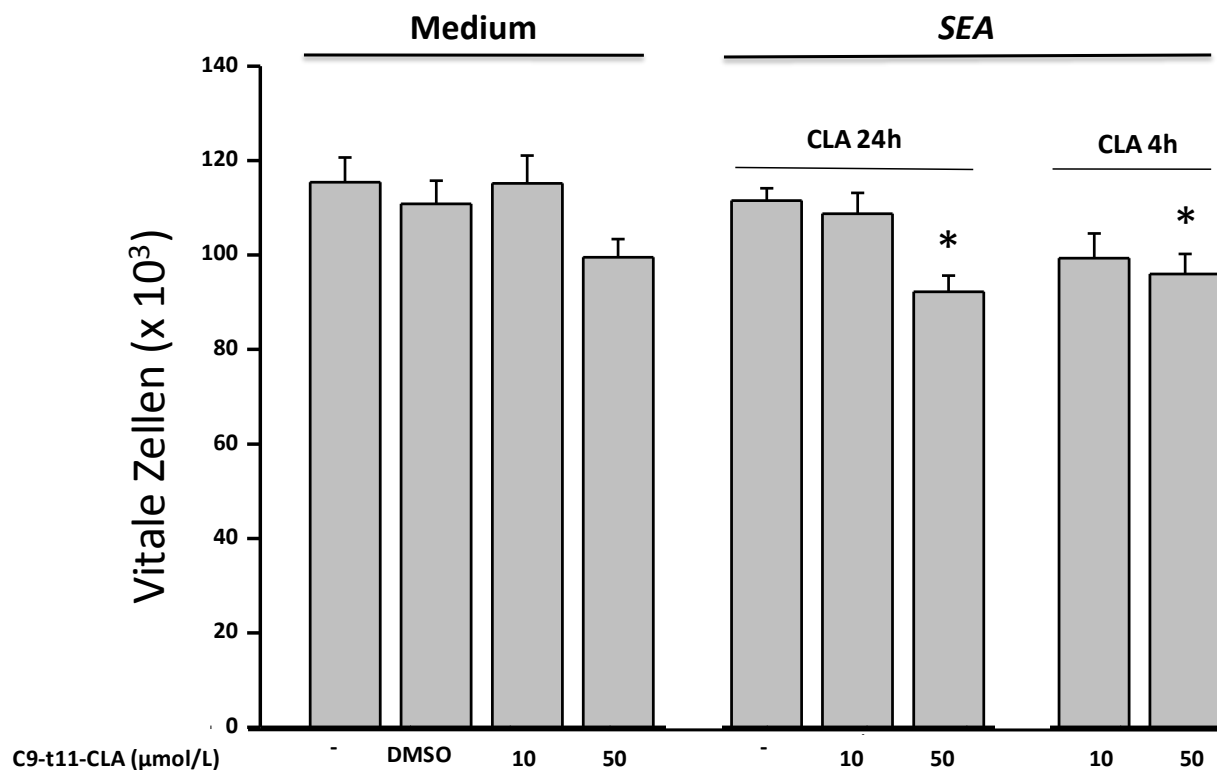


Abb. 26 Die Anzahl vitaler MNC nach der Inkubation mit CLA in An- oder Abwesenheit von SEA.

Vitale MNC wurden mit oder ohne Stimulus (SEA, Konzentration) mit *Cis9-trans11*-CLA für 24h inkubiert und durchflusszytometrisch quantifiziert. Parallele Ansätze erhielten *Cis9-trans11*-CLA erst 20 Stunden nach Stimulation mit SEA. Die Anzahl der Kulturzellen wurde durchflusszytometrisch ermittelt und mit den Anteilen vitaler Zellen (JC-1-negativ, PJ-negativ) verrechnet. Mittelwerte \pm SEM (n=6 Tiere).

Die Inkubation der unstimulierten MNC mit 10 oder 50 $\mu\text{mol/L}$ *Cis9-trans11*-CLA hatte keinen Einfluss auf die Zahl vitaler Zellen ($p > 0,5$). Weder die Stimulation mit SEA alleine noch die Stimulation mit Zusatz von 10 $\mu\text{mol/L}$ CLA veränderte die Zahl vitaler Zellen ($p > 0,5$). Die Stimulation mit SEA in Anwesenheit von 50 $\mu\text{mol/L}$ CLA führte im Vergleich zu Medium ($p = 0,002$) als auch zu DMSO-Kontrolle ($p = 0,01$) zu einem signifikanten Abfall der Zahl vitaler MNC. Der Zusatz von CLA 50 $\mu\text{mol/L}$ nach einer Vorinkubation mit SEA (über 20 Stunden) führte im Vergleich zur Mediumkontrolle, zur DMSO-Kontrolle und dem SEA-Ansatz nach 4

Stunden zu einem signifikanten ($p < 0,05$) Abfall in der Zahl vitaler Zellen. Die Vorinkubation mit SEA führte durch den Zusatz von CLA 10 $\mu\text{mol/L}$ zur Verringerung der Zahl vitaler MNC im Vergleich zu 10 $\mu\text{mol/L}$ CLA alleine ($p < 0,05$).

Um zu klären, ob die Reduktion der Zahl vitaler MNC durch CLA auf die Nekrose und/oder Apoptose-Induktion beruht, wurde der Anteil apoptotischer MNC in den Ansätzen bestimmt. Es zeigte sich, dass in den Ansätzen, denen 50 $\mu\text{mol/L}$ *Cis9-trans11*-CLA zugesetzt wurde, die Anzahl apoptotischer Zellen erhöht war, wenn Zellen mit SEA stimuliert wurden ($p < 0,05$) (Abb. 27).

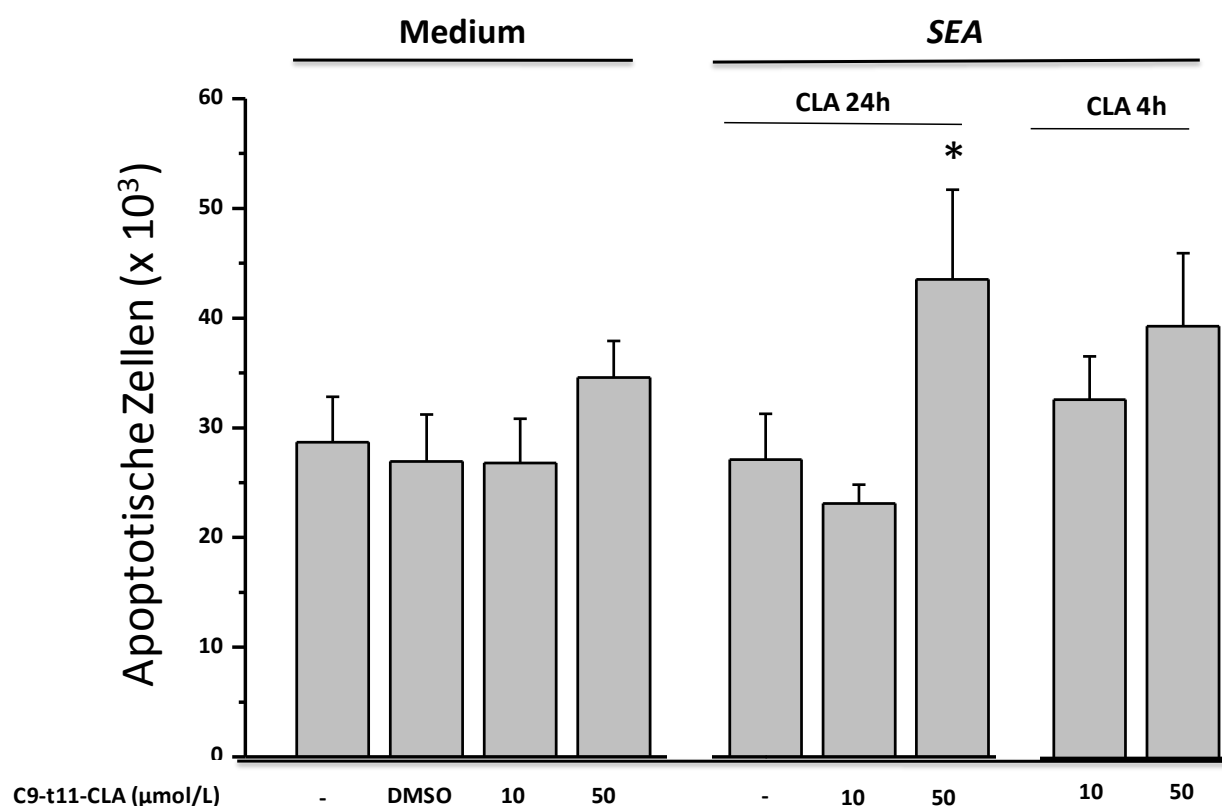


Abb. 27: Die Anzahl apoptotischer MNC nach der Inkubation mit CLA in An- oder Abwesenheit von SEA.

Vitale, SEA (1 ng/ml)-stimulierte oder unstimulierte MNC wurden nach Inkubation in Kulturmedium sowie Medium mit einem Zusatz von *Cis9-trans11*-CLA nach 24h *in vitro* durchflusszytometrisch quantifiziert. Parallele Ansätze enthielten *Cis9-trans11*-CLA 20 Stunden nach SEA-Stimulationsbeginn. Die Zahl vitaler Kulturzellen wurde durchflusszytometrisch ermittelt und mit den Anteilen apoptotischer Zellen (JC-1-positiv, PJ-negativ) verrechnet. Mittelwerte \pm SEM (n=6 Tiere).

4.10 Die Wirkung von CLA auf die Genexpression verschiedener Zytokine sowie PPAR γ und PTX3 in Superantigen-stimulierten MNC

Um die Wirkungsmechanismen von CLA auf Genexpression-Ebene zu analysieren, und um zu prüfen, ob diese Wirkungen von CLA auf einen PPAR γ -vermittelten Mechanismus beruhen, wurden Genexpressionsanalysen mit MNC durchgeführt. Bovine MNC wurden mit *Cis9-trans11-CLA* (50 $\mu\text{mol/L}$) inkubiert und für 17 Stunden mit SEA (1 ng/ml) stimuliert. Die Anzahl der mRNA-Kopien von verschiedenen Zytokinen sowie von PPAR γ und PTX3, ein PPAR γ -reguliertes Gen, wurde mittels qrt-PCR bestimmt. Um das Vielfache der Genexpression durch die SEA-Stimulation zu berechnen, wurden die stimulierten und die unstimulierten Ansätze zueinander ins Verhältnis gesetzt. Bei Betrachtung der Genexpression der untersuchten Zytokine in den unstimulierten Ansätzen zeigte sich kein Unterschied in der Anzahl der Kopien zwischen dem CLA-Ansatz und der Mediumkontrolle ($p>0,05$) (Abb. 28).

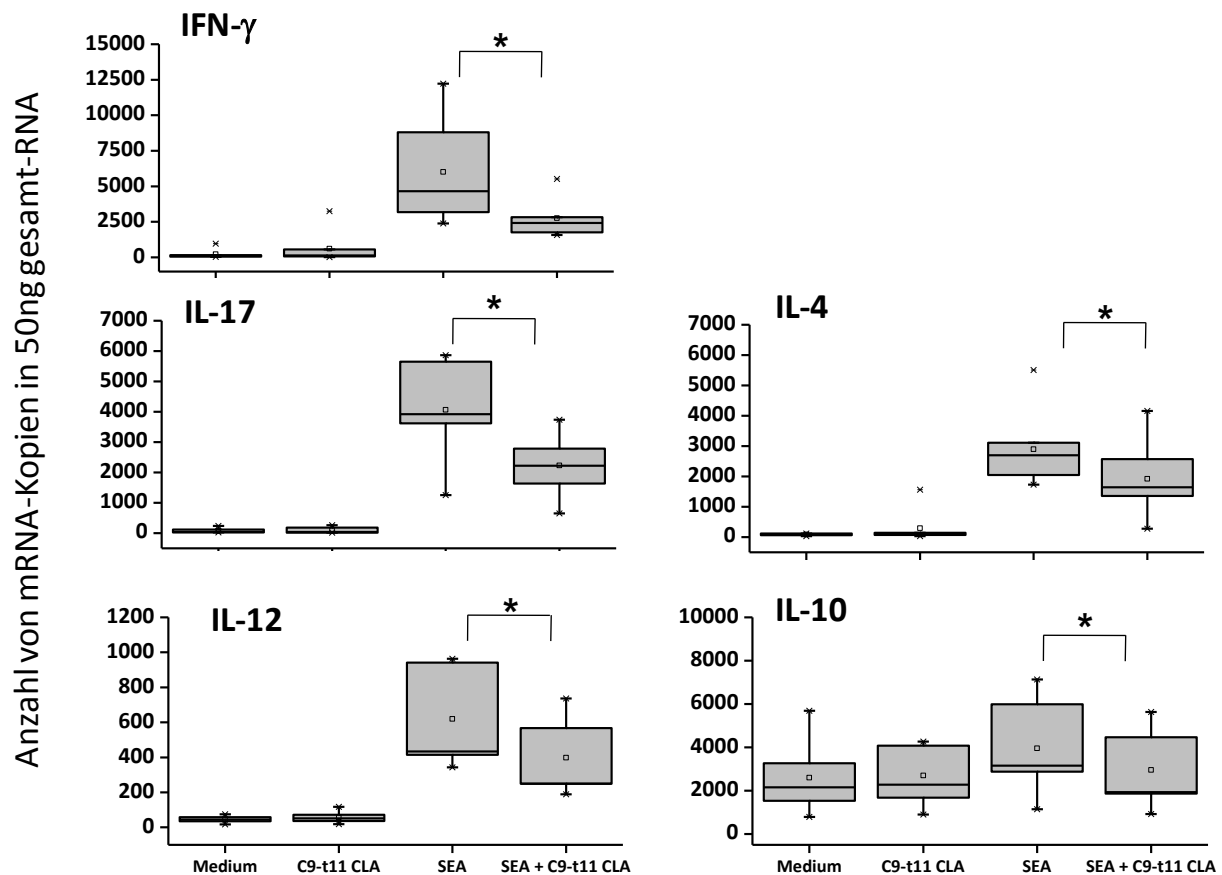


Abb. 28 mRNA-Expression verschiedener Zytokine in mononukleären Zellen unter dem Einfluss von *Cis9-trans11*-CLA.

Bovine mononukleäre Zellen (n = 7 Tiere) wurden mit dem *Cis9-t11*-CLA (50 µmol/L) inkubiert und über 17 Stunden mit dem Superantigen SEA (1 ng/ml) stimuliert oder unstimuliert belassen. Die mRNA-Expression der Zytokine IFN-γ, IL-4, IL-17, IL-12 sowie IL-10 ist in der Anzahl der Kopien in 50 ng Gesamt-RNA angegeben (*: p<0,05).

Im Vergleich zur Mediumkontrolle ergab sich bei den mit SEA stimulierten Zellen eine statistisch signifikante Hochregulation für IFN-γ (27fach), IL-4 (33fach), IL-17 (52fach) sowie IL-12 (13fach) (p≤0,01). Die Expression von IL-10 wurde durch SEA nicht signifikant reguliert (p=0,17). Im Vergleich zu dem nur mit SEA stimulierten Ansatz wurde durch eine Inkubation mit *C9-t11*-CLA (50 µmol/L) die Expression von IFN-γ, IL-4, IL-17, IL-12 sowie IL-10 signifikant herabreguliert (p<0,05). In den Ansätzen mit CLA schwankte die Anzahl der Kopien zwischen 50 % (IL-17, IL-12, IFN-γ) und zwischen 70 % (IL-4, IL-10) in den Ansätzen mit SEA alleine. IL-17 war das am stärksten durch CLA gehemmte Zytokin nach SEA-Stimulation (p=0,001).

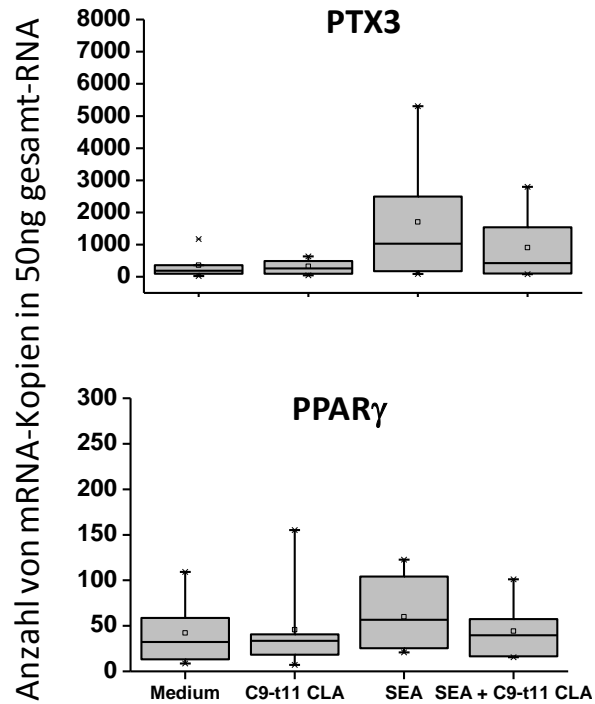


Abb. 29 mRNA-Expression von PPAR γ und PTX3 in mononukleären Zellen unter dem Einfluss von *Cis9-trans11*-CLA.

Bovine mononukleäre Zellen (n = 7 Tiere) wurden mit dem *Cis9-t11*-CLA (50 μ mol/L) inkubiert und über 17 Stunden mit dem Superantigen SEA (1 ng/ml) stimuliert oder unstimuliert belassen. Die mRNA-Expression von PPAR γ sowie PTX3 ist als Anzahl der Kopien in 50 ng Gesamt-RNA angegeben.

Durch die Stimulation mit SEA wurde weder der Transkriptionsfaktor PPAR γ noch Pentraxin 3 in MNC hochreguliert ($p > 0,05$). Weder bei unstimulierten noch bei den SEA-stimulierten MNC wurde die PPAR γ - oder PTX3-Genexpression von CLA beeinflusst ($p > 0,05$) (Abb. 29).

5 Diskussion

Seit einigen Jahren wird wiederholt auf die Bedeutung von konjugierten Linolsäuren (CLA) in der Ernährungsphysiologie sowie bei der Minderung verschiedener Gesundheitsrisiken hingewiesen (PARIZA u. HARGRAVES 1985; WHIGHAM et al. 2000; BELURY 2002a; WAHLE et al. 2004; PARK et al. 2007). Zahlreiche Studien, sowohl am Tier als auch aus dem Humanbereich, konnten zeigen, dass CLA-Isomere massiv in verschiedene Immunmechanismen eingreifen können (PARIZA et al. 2000; O'SHEA et al. 2004).

Beim Rind wurden immunmodulatorische Wirkungen von CLA bisher kaum untersucht. Um den Einfluss konjugierter Linolsäuren auf das bovine Immunsystem zu charakterisieren, wurden die möglichen *In-vivo*-Wirkungen einer Langzeit-Supplementierung mit CLA auf die Zellzusammensetzung leukozytärer Zellen des Blutes *ex vivo* geprüft. Schlüsselfunktionen neutrophiler Granulozyten und mononukleärer Zellen wurden *ex vivo* erfasst und *in vitro* analysiert. Das Spektrum der Stimulations-induzierten Expression pro- und anti-inflammatorischer Zytokine sowie die *ex vivo* gebildeten Antikörperisotypen IgG1 und IgG2 sollten Hinweise auf eine Polarisierung adaptiver Immunmechanismen durch CLA Isomere *in vivo* geben.

5.1 Einfluss einer langzeitigen Supplementation pansengesetzter CLA im Futter auf das Immunsystem von Milchkühen

Supplementierungsversuche über den Einfluss von CLA auf das Immunsystem liegen in der Literatur sowohl für die Maus (YANG et al. 2000) und den Menschen (ALBERS et al. 2003; H. J. SONG et al. 2005) als auch für andere Tierarten, wie Hühner (ZHANG et al. 2006), Schwein (BONTEMPO et al. 2004) und Hund (NUNES et al. 2008) vor. Die bis dato für das Rind durchgeführten Supplementierungsversuchen mit CLA konzentrierten sich nur auf die günstigen Effekte von CLA auf den Lipidstoffwechsel (BAUMAN et al. 2008; NUNES et al. 2008), während die Wirkungen solcher Supplementierungen auf das bovine Immunsystem noch nicht betrachtet wurden. Darüberhinaus wurde CLA auch in den meisten Supplementierungsversuchen anderer Tierarten, in denen das Immunsystem im Mittelpunkt stand, nur für kurze Zeit zugesetzt. So untersuchten OSTROWSKA et al. (2004) die Wirkung einer CLA-Supplementierung über 8 Wochen auf das porcine Immunsystem. Obwohl NUNES et al. (2008) einen Supplementierungsversuch für 9 Monate beim Hund durchführten, untersuchten sie die Wirkungen der CLA-Supplementierung allerdings nicht während, sondern erst zum Ende der

Supplementierungsphase. In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung einer Langzeitsupplementierung mit konjugierten Linolsäuren (für 185 Tagen) auf das bovine Immunsystem charakterisiert. Die untersuchten Immunparameter wurden vor, während sowie nach Ende der Supplementierung analysiert.

Die peripartale Phase bei Milchkühen ist durch massive Veränderungen verschiedener Immunparameter gekennzeichnet, die auf zahlreichen hormonellen und metabolischen Verschiebungen beruhen und zu einer labilen peripartalen Phase führen, wodurch häufig keine effektive Funktion des Immunsystems gegeben ist (NONNECKE et al. 2003). Für eine optimale Charakterisierung der Wirkung einer CLA-Supplementierung während der Laktation auf die Hauptparameter des Immunsystems bei Milchkühen, wurde zunächst geprüft, ob die späteren CLA- und Kontroll-Gruppen eine vergleichbare Kinetik der Veränderung ihrer untersuchten Immunparameter im peripartalen Zeitraum aufwiesen. Ferner sollte anhand dieser Analyse ein besseres Verständnis der physiologischen Immunmechanismen, die den peripartalen Zeitraum begleiten, gewonnen werden, was zu einer Erklärung der hohen Anfälligkeit der Milchkuh gegenüber Mastitis- und Metritis-Erregern in der peripartalen Zeit beitragen könnte.

5.1.1 Peri- und postpartale Veränderungen der Zellzusammensetzung im Blut der Milchkühen

Studien berichten von Schwankungen der Zahl und Zusammensetzung der Leukozyten des Blutes peripartaler Kühe (SAAD et al. 1989; HUSSAIN u. DANIEL 1992). Dass die Abkalbung starke Einflüsse auf die Zahl der Hauptzellen des adaptiven Immunsystems (T- und B-Zellen) sowie auf die Zahl der myeloiden Effektorzellen des angeborenen Immunsystems (Monozyten, Neutrophile) im peripheren Blut hat, konnte auch in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden. Unmittelbar nach der Abkalbung kam es zu einem starken Rückgang der Anzahl zirkulierender neutrophiler Granulozyten, was im Vergleich zum Zeitraum vor der Abkalbung mit einer reduzierten Anzahl der Gesamtleukozyten im Blut verbunden war. Der Rückgang neutrophiler Granulozyten wird in der Literatur durch den starken Einstrom dieser Zellen, auch unter physiologischen Bedingungen, in die Gebärmutter nach der Abkalbung erklärt (HUSSAIN u. DANIEL 1992). Eine reduzierte Anzahl der neutrophilen Granulozyten in Blut der Milchkuh kann zu einer hohen Anfälligkeit gegen akute Infektionen wie z.B. Mastitis beitragen.

In zahlreichen Studien wird von einem peripartalen Stress-Leukogramm bei laktierenden Milchkühen berichtet, was durch eine Monozytose und Lymphopenie gekennzeichnet ist, wobei die verschiedenen Subpopulationen der T-Zellen unterschiedlich beeinflusst werden (VAN KAMPEN u. MALLARD 1997; MEGLIA et al. 2005). In dieser Arbeit führte die Abkalbung zu

einer Veränderung der relativen Zellzusammensetzung mononukleärer Zellen des Blutes, die sich in einem Anstieg des Anteils von Monozyten und einem Rückgang des Anteils von B- sowie T-Lymphozyten ausgedrückte. Unter den T-Zellen wurden die Subpopulationen unterschiedlich beeinflusst. Während der Anteil der $\gamma\delta$ -T-Zellen und der CD8+ $\alpha\beta$ -T-Zellen bis zur Abkalbung konstant geblieben ist, steigerte sich der Anteil von CD4+ $\alpha\beta$ -T-Zellen im prepartalen Zeitraum und fiel danach zum Partus stark ab, was zu einem ähnlichen Verlauf des CD4+/CD8+-Verhältnisses führte. Im Unterschied zu diesen Ergebnissen konnte in einer Studie von KIMURA et al. (2003) ein gleichzeitiger Rückgang aller T-Zell-Subpopulationen (CD3, CD4, CD8, $\gamma\delta$) bei Milchkühen zum Zeitpunkt der Abkalbung beobachtet werden. Der kontinuierliche Anstieg des B/M-MFI-Verhältnis von MHC-II-Expression bis zu der Abkalbung lässt sich auf eine tendenzielle Zunahme ihrer Expressionsstärke auf B-Zellen und einer tendenzielle Abnahme dieser auf Monozyten zurückführen.

5.1.2 Peri- und postpartale Veränderungen der Phagozytoseleistung neutrophiler Granulozyten

Eine Schlüsselfunktion der neutrophilen Granulozyten besteht darin, mikrobielle Erreger zu phagozytieren und abzutöten (LEE et al. 2003b). Wenn man die Ergebnisse der Phagozytoseleistung für den antepartalen und den postpartalen Zeitraum vergleichend betrachtet, so deutet sich eine verminderte Phagozytoseleistung neutrophiler Granulozyten zwischen Tag 21 a.p. und Tag 7 p.p. an, was zu einer peripartal erhöhten Anfälligkeit der Kühe gegenüber Infektionen beitragen könnte (HAMMON et al. 2006). Diese Ergebnisse bestätigen die Beobachtungen von Cai et al. (1994), die eine Verbesserung der Phagozytoseleistung der Neutrophilen unmittelbar nach der Abkalbung feststellen konnten. Auf eine reduzierte Funktionsfähigkeit der PMN im peripartalen Zeitraum wurde auch in vielen Studien hingewiesen (MALLARD et al. 1998; PAAPE et al. 2002). Obwohl keine vollständige Erklärung für die peripartale Dysfunktion der PMN vorliegt, werden einige Faktoren wie z.B. die hohe Konzentration von Glucocorticoiden (PAAPE et al. 2002; BURTON et al. 2005) oder die niedrige Konzentration von Selenium (hilft bei der Reduktion von Zytochrom und der Produktion von Superoxid) (CEBRA et al. 2003) im Blut peripartaler Milchkühe als Ursachen in der Literatur diskutiert.

5.1.3 Peri- und postpartale Veränderungen der IgG-Isotypengehalte im Blut

Es konnte in dieser Arbeit auch gezeigt werden, dass die IgG-Isotypengehalte deutlich von der Abkalbung beeinflusst wurden. Mit einem IgG1/IgG2-Verhältnis von 0,9 zeigten beide IgG-Isotypen ähnliche Konzentrationen im Blut, wobei IgG2 am Tag 21 a.p leicht überwog. Während die Konzentration von Serum-IgG2 etwa um 6% von Tag 21 a.p. bis Tag 0 anstieg, fielen die IgG1-Werte bei allen Kühen kontinuierlich stark um 60% bis zum Tag der Abkalbung ab. In einer Studie von FRANKLIN et al. (2006), in der sie die quantitativen Veränderungen der IgG-Isotypengehalte im Blut peripartaler Milchkühe untersuchten, kam es von der vierten Woche a.p. bis zur Abkalbung hin zu einer ähnlichen Reduktion der IgG1-Konzentration (67%), während die IgG2-Konzentration um etwa 15% anstieg. Der selektive Abfall der IgG1-Konzentration während der letzten drei Wochen vor der Abkalbung rief einen ähnlich kontinuierlichen Abfall des IgG1/IgG2-Verhältnisses hervor, sodass die IgG2-Konzentration zur Abkalbung 3- bis 4-mal höher als die IgG1-Konzentration war. Aus der Literatur ist bekannt, dass beide IgG-Isotypen, IgG1 und IgG2, während der Laktation in gleicher Konzentration im Blut der Milchkühe vorliegen (BUTLER et al. 1972; BUTLER 1983). Ab der vierten Woche a.p. führt ein selektiver Transportmechanismus, der durch den spezifischen FC-Rezeptor *newborn Fc receptor* (FcRn) vermittelt wird (MAYER et al. 2005), zu einem selektiven Transport von IgG1 aus dem Serum ins Kolostrum (PORTER 1973; LASCELLES 1979). Nach der Abkalbung kam es zu einem kontinuierlichen Anstieg beider Isotypen im Blut. Der Anstieg der IgG1-Konzentration von Tag 0 auf Tag 7 p.p. belief sich auf 45%, während IgG2 nur um etwa 15% anstieg. Nach der Abkalbung wird deutlich weniger IgG1 aus dem Plasma in die Milch übertragen, was zu einer Steigerung des IgG1-Gehaltes im Serum führt (HARRINGTON et al. 2005). Laut Literatur ist der peripartale Anstieg der IgG2-Konzentration zwar bekannt, aber nicht erklärt. Möglicherweise findet auf der Ebene aktivierter B-Zellen ein präferenzzieller Isotypwechsel von IgM zu IgG2 statt. DETILLEUX et al. (1995) konnten bezüglich der IgG2-Konzentration eine Steigerung von 20% im Serum der Milchkuh nach der Abkalbung gegenüber vor der Abkalbung feststellen.

Die in dieser Arbeit beobachteten peripartalen Verschiebungen der Zellzusammensetzung des Blutes sowie der Phagozytoseleistung neutrophiler Granulozyten als auch die quantitativen Veränderungen der IgG-Isotypengehalte im Serum waren bei allen drei Gruppen identisch, was als Hinweis für eine homogene Einteilung der späteren Versuchsgruppen gewertet werden kann. Ausgehend von diesen homogenen Werten der drei Gruppen wurde überprüft, ob der Zusatz von CLA ab dem Tag der Abkalbung zu einer Beeinflussung der untersuchten Immunparameter postpartal sowie während der Laktation führt.

5.1.4 Einfluss von CLA-Supplementierung auf die Zellzusammensetzung leukozytärer Zellen des peripheren Blutes

Eine CLA-Supplementierung hatte keinen Einfluss auf die Anzahl von Leukozyten, Granulozyten oder mononukleären Zellen im Blut. Die mittels Membranimmunfluoreszenz durchgeführte Phänotypisierung mononukleärer Zellen des Blutes deutete jedoch darauf hin, dass eine CLA-Supplementierung die Anzahl bestimmter Zellpopulationen unter den MNC beeinflusst. Beide Fütterungsversuche zeigten, dass CLA-Supplementierung selektiv sowohl den relativen Anteil als auch die absolute Anzahl CD4+ $\alpha\beta$ -T-Zellen im Blut ab dem Tag 21 nach Beginn der CLA-Supplementierung reduzierte. Hingegen wurde weder der relative Anteil noch die absolute Zahl von Monozyten, B-Zellen, Gesamt-T-Zellen oder $\gamma\delta$ -T-Zellen durch die CLA-Ergänzung verändert. Die CLA-100 Gruppe zeigte ab der dritten Laktationswoche und über den gesamten Supplementierungszeitraum signifikant weniger CD4+ $\alpha\beta$ -T-Zellen im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Die Ergebnisse der vorliegenden Fütterungsversuche decken sich mit den Ergebnissen aus einem Fütterungsversuch beim Schwein, in dem OSTROWSKA et al. (2004) die Wirkung von CLA (Isomer-Mischung) auf die Zellzusammensetzung der Leukozyten im Blut sowie auf einige Immunfunktionen und Immunparameter untersuchten. Nach 8 Wochen Supplementierung mit CLA wurde in dieser Studie kein Unterschied in der Gesamtzahl der Leukozyten, der Granulozyten, der Monozyten oder der Lymphozyten im Blut zwischen den verschiedenen Gruppen beobachtet. Die Phänotypisierung von T-Zellen zeigte hingegen, dass die Anzahl von CD4+ $\alpha\beta$ -T-Zellen mit zunehmender Aufnahme von CLA mit dem Futter linear reduziert wurde.

CD4+ $\alpha\beta$ -Th-Zellen stellen die zentralen Regulationszellen des adaptiven Immunsystems dar (ROMAGNANI 2006), deren Bedeutung bei angeborenen Defekten (SAVINO et al. 2002) oder bei Infektionen, die zum Ausfall dieser Zellen führen, wie z.B. HIV (PIRZADA et al. 2006), besonders deutlich wird. Sie erkennen die von MHC Klasse II präsentierte Peptide und aktivieren u.a. durch die Sekretion von Zytokinen Makrophagen dazu, phagozytierte Bakterien abzutöten. Sie helfen B-Zellen bei der humoralen Immunantwort gegen T-Zellabhängige Antigene (Proteinantigene) und unterstützen zytotoxische T-Zellen bei ihrer Aufgabe, virusinfizierte oder tumorentartete Zellen abzutöten (JANEWAY u. TRAVERS 2005). Die reduzierende Wirkung von CLA auf CD4+ $\alpha\beta$ -T-Zellen ohne dabei die CD8+ $\alpha\beta$ -T-Zellen zu beeinflussen, führte zu einem niedrigen CD4/CD8-Verhältnis im Blut der CLA-100 Gruppe. Dies spiegelte sich allerdings nur im ersten Versuch durch die höhere Anzahl der Tiere wider.

CD4⁺ T-Zellen entwickeln sich entweder zu einer Th1-, Th2- oder Th17-Zelle, die sich funktionell unterscheiden (CARTER u. DUTTON 1996; DELMONTE et al. 2005; BETTELLI et al. 2007). Ob CLA die Entwicklung bestimmter CD4 T-Zelltypen beeinflusst und ob diese negative Wirkung von CLA auf CD4⁺ T-Zellen sich funktionell bestätigen lässt, wird später anhand der Bestimmung der IgG-Isotypen und der Genexpressionsanalysen diskutiert.

5.1.5 Einfluss von CLA-Supplementierung auf die Phagozytosekapazität neutrophiler Granulozyten im Blut

In dieser Arbeit führte der Zusatz von 50 g CLA pro Tier und Tag zu besseren *ex vivo* Phagozytoseraten (CLA-50 Gruppe). Über die Wirkung von CLA auf neutrophile Granulozyten beim Rind gibt es bis jetzt noch keine Studien. Untersuchungen zur Modulierung der Phagozytosekapazität neutrophiler Granulozyten durch CLA bei anderen Tierarten ergaben unterschiedliche Ergebnisse. Während eine CLA-Supplementierung beim Hund keinen Einfluss auf die Phagozytoseleistung von PMN *ex vivo* zeigte (NUNES et al. 2008), wurde eine indirekte Verbesserung der Phagozytoseleistung (durch Förderung der TNF α -Sekretion von Monozyten) caniner PMN durch t10,c12-CLA *in vitro* nachgewiesen (KANG u. YANG 2008). Ein positiver Effekt von CLA auf die Phagozytosekapazität porziner PMN konnte man sowohl *in vitro* (KANG et al. 2007) als auch *ex vivo* (HAN et al. 2003; OSTROWSKA et al. 2004) nach der CLA-Supplementierung nachweisen. Die Phagozytoseleistung von PMN wird durch das Vorhandensein von opsonisierenden Antikörpern oder Komplementfaktoren deutlich verbessert. Eine besondere Rolle spielen dabei sowohl die Komplementrezeptor 3 (CR3) als auch die Fc-Gamma Rezeptoren, die auf der Oberfläche der PMN exprimiert werden (HUANG et al. 2010). Bovine Neutrophile exprimieren bei der Einwanderung in infiziertes Gewebe verstärkt hochaffine, spezifische Fc-Rezeptoren für pathogenebundene IgG2-Komplexe, jedoch keine Fc-Rezeptoren für IgG1- oder IgA-Antikörper (LEE et al. 2003b). Eine positive Korrelation zwischen der Phagozytoseleistung der PMN und der Expression von CD64 (FC γ RI) als hochaffiner Rezeptor für opsonisierende IgG-Antikörper auf diesen Zellen wurde von (DANIKAS et al. 2008) nachgewiesen. Möglicherweise führt die Supplementierung mit 50 g CLA pro Tier und Tag zur Verstärkung der Expression von Opsoninrezeptoren, besonders der Fc γ -Rezeptoren auf neutrophilen Granulozyten und dadurch zur Verbesserung ihre Phagozytoseleistung. Da in dieser Arbeit Hitze-inaktiviertes Poolserum für die Opsonisierung der Bakterien verwendet wurde, kann nur spekuliert werden ob die CLA-Supplementation zu einer verstärkten Expression von Complementrezeptoren auf den PMN führte.

5.1.6 Einfluss von CLA-Supplementierung auf die IgG-Isotypengehalte in Blut- und Milchserum

Um die Wirkung von CLA auf die Immunpolarisierung beim Rind zu prüfen, wurden die Gehalte beider IgG-Isotypen (IgG1 und IgG2) im Serum sowie in der Milch mittels ELISA quantifiziert. Die Bildung von Immunglobulin G im Rahmen einer adaptiven Immunantwort wird über Zytokine gesteuert, was bei Mensch und Maus umfassend untersucht worden ist (CONSTANT u. BOTTOMLY 1997; ROMAGNANI 1997). Demnach wird die Bildung von humanen IgG2 durch Th1-Zytokine (IL-2, IFN- γ , TNF- α) gesteuert, während die Bildung von humanen IgG1 durch Th2-Zytokine (IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13) gefördert wird. Auch beim Rind geben die IgG-Isotypen einen deutlichen Hinweis für eine Polarisierung der Immunantwort. So gilt bovines IgG1 als Marker einer Th2-Antwort, *in vitro* induzierbar durch IL-4 und IL-13 (TRIGONA et al. 1999; ESTES u. BROWN 2002), während bovines IgG2 präferentiell dann gebildet wird, wenn inflammatorische Zytokine, besonders Interferon- γ und Typ-1-Interferone, von T-Zellen gebildet werden (ESTES et al. 1998).

Bereits ab Tag 7 nach Beginn der Supplementierung mit CLA führte der Zusatz von 100 g CLA pro Tag und Tier zu niedrigeren Konzentrationen beider IgG-Isotypen im Blut (CLA-100 Gruppe) als in den anderen zwei Gruppen. Diese vermindernde/reduzierende Wirkung von CLA konnte bei dieser Gruppe während der Dauer der Fütterungszugabe an den meisten Zeitpunkten beobachtet werden und konnte durch das Absetzen von CLA aufgehoben werden. Bezüglich der Beeinflussung der Ig-Isotypen durch CLA gibt es in der Literatur unterschiedliche/heterogene Angaben. Die vorliegenden Ergebnisse stimmen mit den Ergebnissen eines Supplementierungsversuchs beim Schwein überein (OSTROWSKA et al. 2004). In diesem Versuch wurde der Gehalt an IgG im Serum zum Ende einer CLA-Supplementierung um etwa die Hälfte reduziert, wobei die einzelnen IgG-Isotypen in diesem Versuch nicht quantifiziert wurden. Eine Mausstudie zeigte, dass Splenozyten aus mit *t10-c12*-CLA supplementierten Mäusen mit mehr IgM- und IgA-Produktion auf eine *ex vivo*-Stimulation mit ConA reagierten, während es bei der IgG-Produktion zu keiner Beeinflussung kam. *C9-t11*-CLA hatte im Gegenteil dazu keinen Einfluss auf die *Ex-vivo*-Produktion der Ig-Isotypen (YAMASAKI et al. 2003).

Die Unterdrückung beider IgG-Isotypen durch CLA lässt sich möglicherweise auf die negative Beeinflussung der CD4+ $\alpha\beta$ -T-Zellen zurückführen. Um eine Immunantwort mit Antikörperproduktion und Isotypwechsel gegen Proteinantigene zu leisten, ist eine zusätzliche Hilfe von antigenspezifischen CD4+ T-Helferzellen für die B-Zellen sehr entscheidend. Diese T-Zellhilfe führt zu Aktivierung, Proliferation und Ausdifferenzierung der B-Zellen in Antikörper-

produzierende Plasmazellen (KUCHEN et al. 2007). Da in dieser Arbeit beide IgG-Isotypen von der Konzentrationsreduktion durch CLA betroffen waren, könnten sowohl Th1- als auch Th2-Zellen für die B-Zelldifferenzierung fehlen.

In der Milch erfuhr die IgG1-Konzentration, jedoch nicht die IgG2-Konzentration in der CLA-100 Gruppe eine Verringerung und eine Erhöhung nach dem CLA-Absetzen. Die selektive Beeinflussung des IgG1-Gehalts in der Milch durch CLA ist dadurch zu klären, dass der größte Teil von Milch-IgG1 aus dem Serum kommt, während Milch-IgG2 hauptsächlich lokal von Plasmazellen in der bovinen Milchdrüse produziert wird (NEWBY et al. 1982). Gestützt wird dies durch den positiven Zusammenhang zwischen dem IgG1-Gehalt im Serum und der Milch. Der IgG2-Gehalt der Milch korreliert hingegen nicht mit dem im Blutplasma. Somit scheint CLA nicht am Transportprozess von Plasma-IgG1 in die Milch einzugreifen. Der insgesamt reduzierte Gehalt an Antikörpern in der Milch impliziert eine verringerte Fähigkeit eindringende Pathogene zu neutralisieren oder zu opsonisieren.

Weder im Blut- noch im Milchserum wurde das IgG1/IgG2-Verhältnis durch beide CLA-Dosen beeinflusst. Die Unterdrückung beider IgG-Isotypen ohne das IgG1/IgG2-Verhältnis zu beeinflussen, deutet wiederum auf einen allgemeinen negativen Effekt der höheren CLA-Dosis (CLA-100) hin, ohne eine Wirkung auf die Immunpolarisierung beim Rind zu haben. Dies ist vergleichbar mit den Ergebnissen eines Asthma-Modells bei der Maus, in dem die Fütterung mit einer *c9,t11*-CLA-reichen Diät vor und während der Sensibilisierung zu einer Suppressionseffekt der Immunglobulin-Isotypen IgE sowie IgG1 (als Th2-Marker) als auch IgG2a (als Th1-Marker) führte (JAUDSZUS et al. 2008).

Die Untersuchungsergebnisse machen deutlich, dass eine CLA-Supplementierung die Anzahl CD4⁺ αβ-T-Zellen im Blut selektiv reduziert. Um zu prüfen, ob dies auf gehemmten Proliferationsfähigkeit oder einer verringerten Vitalität der Zellen beruht, wurde die Wirkung von CLA auf mononukleäre Zellen *in vitro* untersucht. Da die *In-vivo*-Effekte (*ex vivo* nachgewiesen) von CLA auf MNC durch die Supplementierung von 100 g CLA pro Tier und Tag induziert wurden, was einer Konzentration von 50 µmol jedes Isomers pro Liter Blut entspricht, wurden die meisten *In-vitro*-Untersuchungen mit dieser Konzentration (50 µmol/L) durchgeführt.

5.2 CLA hat einen proliferationsmindernden Effekt auf mononukleäre Zellen *in vitro*

Die Proliferation stellt einen entscheidenden Vorgang im Rahmen einer Immunantwort dar, dessen Prüfung *in vitro* antigenspezifisch sowie Mitogen-vermittelt durchgeführt werden kann. In dieser Arbeit wurden das Superantigen SEA und das Lektin ConA als Stimulanzen gewählt, da sie sich im Modus der Zellaktivierung deutlich unterscheiden. Während das Superantigen SEA T-Zellen abhängig von ihrem T-Zellrezeptor (TCR) stimuliert, ist die Stimulation mit dem Lektin ConA TCR-unabhängig (AN et al. 2009).

Die Mitogen-induzierte Proliferation boviner mononukleärer Zellen wurde in der vorliegenden Arbeit durch CLA-Isomere im eingesetzten Konzentrationsbereich (25, 50 und 100 $\mu\text{mol/L}$) negativ beeinflusst. Dieser hemmende Effekt war von beiden CLA-Isomeren (*Cis9-trans11* und *Trans10-Cis12*) sowohl nach der Stimulation mit dem Superantigen SEA als auch mit dem Lektin ConA zu sehen. Während die Hemmung nach ConA-Stimulation Dosis-abhängig war und die maximale Hemmung erst mit der Konzentration 100 $\mu\text{mol/L}$ beider Isomere erreicht wurde, war der hemmende Effekt auf die SEA-induzierte Proliferation stärker und erreichte schon mit der Konzentration 25 $\mu\text{mol/L}$ den maximalen Wert. Bakterielle Superantigene wie SEA aktivieren T-Zellen über die Kreuzvernetzung ihres T-Zellrezeptors mit den MHC-II-Molekülen auf antigenpräsentierenden Zellen (AN et al. 2009). Daraufhin kommt es zur Produktion und Ausschüttung einer Reihe von Zytokinen, die wiederum kaskadenartig zur Aktivierung und Ausdifferenzierung funktionell unterschiedlicher Zellsubpopulationen beitragen (HEDLUND et al. 1990). Es ist nicht klar, ob CLA nur direkt über die Bindung an Lymphozyten oder auch indirekt über andere Zellen diesen hemmenden Effekt ausübten. In der hier eingesetzten Population der mononukleären Zellen sind neben T- und B-Lymphozyten auch Blutmonozyten enthalten, die sich im Laufe der 6-tägigen Inkubation weiter zu Makrophagen ausdifferenzieren. Somit kann der stärkere proliferationshemmende Effekt nach SEA-Stimulation auch dadurch zustande kommen, dass CLA die Monozyten bzw. Makrophagen beeinflusst.

In einer Untersuchung führte CLA-Supplementierung zu keinem Einfluss auf die ConA-induzierte Proliferation boviner MNC *ex vivo* (RENNER et al. 2012). Aus Studien mit anderen Tierarten gibt es gegensätzliche Aussagen über die Beeinflussung der Proliferation mononukleärer Zellen durch CLA. Einige Autoren beschrieben einen fördernden Einfluss (HAYEK et al. 1999; BASSAGANYA-RIERA et al. 2003; BURTON et al. 2005; ZHANG et al. 2006), während Andere eine hemmende Wirkung oder keine Wirkung feststellen konnten (LUONGO et al. 2003; NUGENT et al. 2005; RITZENTHALER et al. 2005). Luongo et al. (2003) zeigten eine hemmende Wirkung von CLA auf die Proliferation von Jurkat T-Zellen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine CLA-Supplementierung bei Ratten die Antigen-

spezifische Proliferation von Splenozyten verbesserte, während die Mitogen-induzierte Proliferation dieser Zellen reduziert wurde (RAMIREZ-SANTANA et al. 2009).

In den oben genannten Studien wurde die T-Zell-Proliferation über den Einbau von [3H]-Thymidin quantifiziert, wobei die Stärke der Proliferation mit der Menge der von den Zellen aufgenommenen radioaktiv markierten Nukleotide gleichgesetzt wird. So können einzelne, stark proliferierende Zellen unter vielen toten Zellen dieselbe Signalstärke hervorrufen wie eine große Zahl lebender, aber schwächer proliferierender Zellen. Damit kann jedoch weder die Anzahl der tatsächlich blastisch transformierten Zellen, noch die der durch die Stimulation abgestorbenen Zellen erfasst werden. So konnten nach Stimulation mit bakteriellen Superantigenen trotz eines signifikanten Zellsterbens hohe Einbauraten von [3H]-Thymidin erreicht werden (KABELITZ u. WESSELBORG 1992). Aus diesen Gründen wurde in der vorliegenden Arbeit die blastische Transformation von Lymphozyten nach morphologischen Kriterien über die Anzahl vitaler Blasten durchflusszytometrisch quantifiziert. Auf diese Weise werden alle Aktivierungsformen erfasst, die zu einer morphologisch nachweisbaren Proliferation der Zellen führen (PECHHOLD et al. 1994; SCHUBERTH et al. 2001).

Als nächstes wurde geprüft, ob CLA-Isomere die Zusammensetzung der Zellpopulationen unter den Zytten und den Blasten und das Verhältnis CD4-positiver zu CD8-positiven Zellen nach der Stimulation mit SEA für 6 Tage beeinflussen. Das nicht signifikant veränderte Verhältnis zwischen CD4+ und CD8+ T-Zellen – sowohl unter den Zytten wie den Blasten - deutet darauf hin, dass die proliferationsmindernde Wirkung von CLA in vitro nicht spezifisch für eine der T-Zellsubpopulationen ist.

5.3 CLA hat einen vitalitätsmindernden Effekt auf Superantigen-stimulierte mononukleäre Zellen

Für eine mögliche Erklärung der nachgewiesenen negativen Wirkung von CLA auf die Anzahl von CD4+ T-Zellen im Blut, wurde der Einfluss von CLA auf die Absterberate ruhender sowie Superantigen-stimulierter bovinen mononukleären Zellen untersucht. Da die beiden CLA-Isomere identische Wirkungen auf die Blastogenese zeigten, wurden die weiteren Untersuchungen nur mit dem Isomer *Cis9-trans11*-CLA durchgeführt.

Durch CLA (*C9-t11*-CLA) ließ sich kein vitalitätsmindernder Einfluss auf die ruhenden mononukleären Zellen des Blutes feststellen. Die Anzahl vitaler Superantigen-stimulierter MNC konnte es allerdings reduzieren. Damit scheint CLA nicht primär toxisch für MNC zu sein, jedoch die Absterberate aktivierter Zellen zu erhöhen. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass die Reduktion der Zahl vitaler Zellen durch CLA auf einer Apoptose-Induktion beruht. In den

Ansätzen, die CLA 50 $\mu\text{mol/L}$ enthielten, wurde die Anzahl apoptotischer Zellen gesteigert. Dieser Anstieg war im Vergleich zu Medium, DMSO und SEA allerdings nur durch eine Coinkubation mit SEA statistisch signifikant. Nach einer Vorstimulation der Zellen mit SEA führte der Zusatz von CLA für 4 Stunden zu keinem signifikanten Anstieg der Anzahl apoptotischer Zellen im Vergleich zu SEA alleine. Dies lässt vermuten, dass die pro-apoptotische Wirkung von CLA nicht sofort nach Zugabe einsetzt und aktivierte Zellen nicht generell sensitiver gegenüber CLA sind.

Die Inkubation von Makrophagen *in vitro* mit *dem C9-t11* oder *T10-c12*-CLA über 2 Tage führte zur Steigerung des Mitochondrienmembranpotenziales, was mit Induktion der Apoptose in diesen Zellen verbunden war (STACHOWSKA et al. 2008). Die Ergebnisse aus Untersuchungen an Tumormodellen zeigten, dass die Induktion der Apoptose durch CLA zumindest teilweise auf die Spaltung von Caspase-12 zurückzuführen ist (BANNERMAN et al. 2008). Es wurde auch berichtet, dass CLA die ROS-Bildung in T-Zellen durch eine Aktivierung der NADPH-Oxidase und der Proteinkinase C (PKC) auszulösen vermag (CHO et al. 2008) und dadurch Apoptose induzieren kann (BERGAMO et al. 2004).

5.4 CLA führt zur Herabregulation von Th1-, Th2- und Th17-Zytokinen *in vitro*

Aus beiden CLA-Fütterungsversuchen ergab sich eine selektive Reduktion der Zahl CD4+ $\alpha\beta$ -T-Zellen. Um zu prüfen, ob CLA einen Einfluss auf funktionelle Untergruppen der CD4+ T-Zellen nimmt wurde die mRNA-Expression charakteristischer Zytokine analysiert. CD4+ T-Zellen werden aufgrund der von ihnen produzierten Zytokine und der dadurch ausgeübten spezifischen Effektorfunktionen in Th1-, Th2- und Th17-Zellen unterteilt (DELMONTE et al. 2005; HARRINGTON et al. 2005). Th1-Zellen produzieren das für sie charakteristische inflammatorische Zytokin IFN- γ , aktivieren Makrophagen und induzieren in der Folge eine zelluläre Immunreaktion gegen intrazelluläre Erreger (TRINCHIERI 1997). Th2-Zellen sezernieren vor allem Interleukin-4 und sind an der humoralen Immunreaktion gegen extrazelluläre Bakterien und Helminthen beteiligt, indem sie B-Zellen beim Immunglobulin-Klassenwechsel für die protektive Antikörperproduktion helfen (MOSMANN et al. 1986). Die inflammatorischen Th17-Zellen können weder das Th1-Zytokin IFN- γ noch das Th2-Zytokin IL-4 produzieren (DELMONTE et al. 2005; HARRINGTON et al. 2005), sezernieren allerdings das Zytokin IL-17. Dieses spielt bspw. bei inflammatorischen Prozessen wie der Mastitis eine Rolle (RIOLLET et al. 2006). IL-10 kann von Makrophagen aber z.B. auch von Th2-Zellen sezerniert

werden und ist in der Lage die Differenzierung in Richtung Th1-Zellen zu hemmen (JANEWAY u. TRAVERS 2005).

Anhand der vorliegenden Untersuchung konnte gezeigt werden, dass konjugierte Linolsäuren keinen Einfluss auf die basale Expression der untersuchten Zytokine haben. Ebenfalls führte der Zusatz von CLA zu den SEA-stimulierten Zellen führte zu einer signifikanten Unterdrückung aller untersuchten Th1- (IFN γ und IL-12), Th2- (IL-4 und IL-10) sowie Th17-Zytokine. Somit besteht keine Selektivität in der Hemmung bestimmter boviner T-Helferzellpopulationen durch CLA.

Obwohl eine Tendenz in Richtung Th1-Antwort durch CLA in einigen Studien in der Literatur nachgewiesen werden konnte, zeigten hingegen andere Autoren eine selektiv hemmende Wirkung von CLA auf Th1-Zytokine. CLA konnte die *ex vivo*-Produktion von IL-4 bei ConA-stimulierten Milzzellen reduzieren (KELLEY et al. 2002; YANG u. COOK 2003). Eine Antwort in Richtung Th2 wurde auch in einer anderen Studie bestätigt, in der es zu Verminderung der IgE-Spiegel in mit CLA gefütterten Mäusen kam (SUGANO et al. 1998). Da nicht alle Schlüsselzytokine der verschiedenen Th-Zellen analysiert wurden, blieb in diesen Versuchen jedoch unklar, ob es sich nur um einen Ausdruck einer allgemeinen Unterdrückung aller Th-Aktivitäten handelte oder ob CLA gezielt im Stande war die Immunantwort in eine bestimmter Richtung zu verschieben. Eine neue Studie über die Wirkung von CLA auf das Th1 Profil von Zytokinen, wie IL-12 oder IFN- γ , in einem Mausmodell für Sepsis brachte hervor, dass eine CLA-Supplementierung über 6 Wochen die Konzentrationen von IL-12 und IFN- γ im Serum reduziert (REYNOLDS et al. 2009). Nach einer 14-tägigen Supplementierung mit einem CLA-Gemisch (*cis-9, trans-11: trans-10, cis-12* = 50:50) produzierten porzine MNC nach der *ex vivo*-Stimulation mit phorbol myristate acetate/Ionomycin deutlich weniger INF- γ (MALOVRH et al. 2009).

5.5 Die Rolle von PPAR γ bei CLA-vermittelte Effekte in bovinen Immunzellen

Obwohl in zahlreichen Studien auf eine Wirkung von CLA auf das Immunsystem hingewiesen wurde (PARIZA et al. 2000; O'SHEA et al. 2004), sind die Mechanismen dahinter noch nicht vollständig geklärt. In der Literatur wird davon ausgegangen, dass CLA - als natürliche PPAR γ -Liganden (BOCCA et al. 2007) - ihre immunmodulierenden Wirkungen über die Aktivierung von PPAR γ entfalten. PPAR γ wird von CLA in einer Konzentration im μ M-Bereich aktiviert (BELURY 2002a) und in den Zellkern translokalisiert (BOCCA et al. 2007). Bei der Maus wurde

die Expression von PPAR γ in Monozyten (JIANG et al. 1998), Makrophagen (LEE et al. 2003a; BARISH et al. 2005), T-Zellen (CLARK et al. 2000), B-Zellen (SETOGUCHI et al. 2001), dendritischen Zellen (GOSSET et al. 2001) und neutrophilen Granulozyten (GREENE et al. 1995) nachgewiesen.

In der vorliegenden Arbeit zeigten die ruhenden bovinen MNC nur eine schwache basale Expression von PPAR γ , die sich weder durch die SEA-vermittelte Aktivierung noch durch die Inkubation mit CLA steigern ließ. Dies stimmt nicht mit den Ergebnissen anderer Autoren überein, nach denen die Expression von PPAR γ durch die Mitogen-vermittelte Aktivierung (TAUTENHAHN et al. 2003) von T-Zellen sowie in Milzzellen aus CLA-gefütterten Broilern (H J. ZHANG et al. 2006) deutlich gesteigert werden konnte. Darüberhinaus konnte die Expression von Pentraxin 3 (PTX3), einem PPAR γ -abhängig reguliertem Gen (MAJAI et al. 2007), durch CLA weder in ruhenden noch in stimulierten MNC gesteigert werden. Letzteres kann als Hinweis dafür gewertet werden, dass PPAR γ im vorliegenden Fall keine Rolle spielte.

GW9662 gilt als spezifischer PPAR γ -Antagonist und wurde wegen seiner blockierenden Wirkung auf die PPAR γ -Aktivierung in vielen Studien eingesetzt (POLIKANDRIOTIS et al. 2005). In dieser Arbeit konnte die hemmende Wirkung von CLA und PGJ2, ein weiterer PPAR γ -Ligand, durch den PPAR γ -Inhibitor GW9662 nicht blockiert werden, was die Schlussfolgerung eines PPAR γ -unabhängigen Mechanismus zulässt.

Die schwache Expression von PPAR γ in MNCs, das Ausbleiben einer Expressionsinduktion von PTX3 durch CLA sowie die fehlende Wirkung des PPAR γ -Antagonisten GW9662 auf die CLA-vermittelte Proliferationshemmung sprechen in der Summe dafür, dass die Wirkungen von CLA auf bovine Immunzellen PPAR γ -unabhängig sind.

Fettsäuren spielen unterschiedliche Rollen in Körperzellen. Sie sind als Energiequelle sowie als strukturelle Bestandteile der Zellmembranen sehr wichtig. Sie beeinflussen dadurch die physikalischen und funktionalen Eigenschaften von Membranen und können als Signalmoleküle und Regulatoren der Genexpression dienen (BURDGE et al. 2005). Innerhalb des Immunsystems können die verschiedenen Fettsäuren durch unterschiedliche Effekte auf die Struktur und Funktion von Zellmembranen, auf die Transduktion von Zellsignalen, auf die Genexpression und auf die produzierten Muster von Lipidmediatoren in der Breite viele Effekte ausüben (CALDER 2006).

Ob sich die beobachteten CLA-Effekte möglicherweise durch den Austausch essentieller Fettsäuren, wie der Linolsäure und Arachidonsäure, in den Membranphospholipiden erklären lassen (YAQOOB u. CALDER 2007), wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Derartige Änderungen der strukturellen Eigenschaften der Plasmamembranen von Immunzellen

können die Aktivität von Proteinen, die als Ionenkanäle, Transporter, Rezeptoren, kostimulatorische Moleküle oder Enzyme dienen, beeinflussen (STUBBS u. SMITH 1984; HUGHES u. PINDER 2000; FIELD u. SCHLEY 2004).

So war bspw. die Reduktion der Aktivierung humaner T-Lymphozyten durch *cis-9,trans-11* und *trans-10,cis-12* mit einem gleichzeitigen Anstieg beider Isomere in den Lipiden der peripheren mononukleären Zellen verbunden (TRICON et al. 2004).

Es ist durchaus möglich, dass die durch CLA veränderte Lipidzusammensetzung der Zellmembran unterschiedlichster Zellen des Immunsystems Prozesse beeinflusst, was eine veränderte Zellzusammensetzung im peripheren Blut mit sich ziehen könnte. Die Funktion des Immunsystems hängt von den Interaktionen zwischen verschiedenen Zelltypen ab und durch Änderungen in der Membranzusammensetzung können diese Interaktionen moduliert werden (YAQOOB u. CALDER 2007).

5.6 Ausblick

Die Reduzierung von CD4⁺ T-Zellen im Blut sowie die Senkung beider IgG-Isotypen im Blut, ohne dabei das IgG1/IgG2-Verhältnis zu beeinflussen, als auch die Senkung von IgG1 in der Milch und die gleichmäßige Hemmung von Th1 und Th2 Zytokinmustern *in vitro* deuten auf eine unmittelbare Modulation der Immunabwehrbereitschaft durch CLA in Kühen hin, wobei es nicht zu einer Polarisierung der Immunantwort beim Rind kommt. Weiterführend könnte untersucht werden, ob auch andere Ig-Isotypen (IgM, IgA) durch CLA in ihrer Expression vermindert werden.

Die für das Rind vorliegenden Ergebnisse zeigen eine Proliferationshemmung durch CLA-Isomere. Bei der Proliferation sind die Transkriptionsfaktoren NFκB, NFAT und AP-1, die für die Regulation verschiedener Zytokine entscheidend sind, involviert (CUNARD et al. 2004). Da eine PPARγ-vermittelte Hemmung der Proliferation nicht festgestellt werden konnte, erscheint es sinnvoll zu klären, ob CLA die genannten Transkriptionsfaktoren direkt beeinflusst.

Der tägliche Zusatz von 50 g CLA pro Tier führte zu einer besseren Phagozytoseleistung neutrophiler Granulozyten, die auch in anderen Studien in der Literatur beschrieben wurde. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um den vermittelten Mechanismus zu klären.

Aufgrund der positiven Wirkungen von CLA auf den menschlichen Organismus, gab es etliche Versuche, die den CLA-Gehalt in Tierprodukten unter anderem in der Kuhmilch erhöhten (DHIMAN et al. 2005). Zurzeit wird auch von verschiedenen Futterherstellern die Zugabe von CLA im Mischfutter zur Senkung des Milchfettgehaltes bei Milchkühen und damit zur besseren Milchquote empfohlen. Zusätzlich wird eine Verringerung des Energiedefizits in der frühen

Laktation unterstellt, was Auswirkungen auf den Stoffwechsel und die Gesundheit hochleistender Kühe erwarten lässt (BAUMAN et al. 2008). Es ist durchaus von großer Bedeutung toxikologische Studien durchzuführen, um mögliche negative Einflüsse durch eine zusätzliche Supplementierung mit konjugierten Linolsäuren bei Milchkühen zu vermeiden.

6 Zusammenfassung

Jamal Hussien

Einfluss von konjugierten Linolsäuren (CLA) auf das bovine Immunsystem

Konjugierte Linolsäuren (CLA) haben zunehmend in den letzten Jahren besondere Beachtung in der Ernährungsphysiologie sowie bei der Minderung verschiedener Gesundheitsrisiken erfahren. Zahlreiche Untersuchungen an Zelllinien sowie in Tiermodellen weisen darauf hin, dass CLA-Isomere verschiedene Parameter des angeborenen sowie des adaptiven Immunsystems beeinflussen. Über immunmodulierende Effekte von konjugierten Linolsäuren beim Rind liegen in der Literatur bislang noch keine Studien vor. In der vorliegenden Arbeit wurden Kühe nach der Abkalbung für 183 Tage über das Futter mit CLA (50 oder 100 g pro Tier und Tag) supplementiert. Über einen Zeitraum von 21 Tagen vor bis 256 Tage nach der Abkalbung wurde die Zellzusammensetzung im Blut charakterisiert, die Phagozytosekapazität neutrophiler Granulozyten untersucht und Funktionen mononukleärer Zellen *ex vivo* erfasst und *in vitro* analysiert. Eine mögliche polarisierende Wirkung von CLA auf adaptive Immunmechanismen *in vivo* wurde anhand der Stimulations-induzierten Expression pro- und anti-inflammatorischer Zytokine sowie der gebildeten Antikörperisotypen IgG1 und IgG2 geprüft.

Unmittelbar nach der Abkalbung kam es zu einem starken Rückgang der Anzahl zirkulierender neutrophiler Granulozyten, was mit einer reduzierten Anzahl der Gesamtleukozyten im Blut verbunden war. Unter den mononukleären Zellen rief die Abkalbung einen Anstieg des Anteils von Monozyten hervor, während der Anteil von B- sowie T-Lymphozyten zum Partus zurückging. Unter den T-Zellen blieb der Anteil der $\gamma\delta$ -T-Zellen und der CD8+ $\alpha\beta$ -T-Zellen bis zur Abkalbung konstant, während der Anteil von CD4+ $\alpha\beta$ -T-Zellen zum Partus stark abfiel. Die Phagozytoseleistung neutrophiler Granulozyten sank signifikant zwischen Tag 21 a.p und Tag 7 p.p.. Während die Konzentration von Serum-IgG2 in den letzten drei Wochen vor der Abkalbung keine Veränderung zeigte, fielen die IgG1-Werte bei allen Kühen kontinuierlich bis zum Tag der Abkalbung stark ab.

Die CLA-Supplementierung zeigte keinen Einfluss auf die Anzahl von Leukozyten, Granulozyten oder mononukleären Zellen im Blut. Die Phänotypisierung mononukleärer Zellen zeigte jedoch, dass eine CLA-Supplementierung selektiv die Anzahl CD4-positiver $\alpha\beta$ -T-Zellen reduzierte, während die Anzahl von Monozyten, B-Zellen, CD8+ $\alpha\beta$ -T-Zellen und $\gamma\delta$ -T-Zellen nicht verändert wurde. Nach dem Absetzen von CLA normalisierten sich die Unterschiede zwischen den Tiergruppen.

Der Zusatz von 50 g CLA pro Tier und Tag führte zu einer signifikant gesteigerten Phagozytose von opsonisierten Bakterien durch PMN. Möglicherweise führt die Supplementierung mit CLA zur verstärkten Expression von Fc-gamma Rezeptoren auf neutrophilen Granulozyten.

Der Zusatz von 100 g CLA pro Tier und Tag senkte ab dem Tag 7 p.p über den gesamten Supplementierungszeitraum die Konzentration beider IgG-Isotypen (IgG1, IgG2) im Blut. In der Milch führte CLA nur zur signifikanten Senkung der IgG1-Konzentration. Dies lässt vermuten, dass lokale Plasmazellen, die das Milch-IgG2 sezernieren, nicht von CLA beeinflusst werden.

In vitro wurde die Lektin (ConA)- und Superantigen (SEA)-induzierte Proliferation boviner mononukleärer Zellen durch die beide CLA-Isomere (*Cis9-trans11* und *Trans10-Cis12*) im eingesetzten Konzentrationsbereich von 25 bis 100 mmol/L signifikant gehemmt. *C9-t11*-CLA hatte *in vitro* keinen vitalitätsmindernden Einfluss auf ruhende mononukleäre Zellen des Blutes, konnte allerdings die Zahl vitaler SEA-stimulierter MNC reduzieren, was durchflusszytometrisch auf die Induktion der Apoptose durch CLA zurückzuführen war.

Die hemmende Wirkung von CLA und PGJ2 auf die Proliferation boviner MNC konnte durch den PPAR γ -Inhibitor GW9662 nicht blockiert werden. Die schwache Expression von PPAR γ in MNC, das Ausbleiben einer Expressionsinduktion des PPAR γ -reguliertes Gen \square PTX3 durch CLA sowie die fehlende Wirkung des PPAR γ -Antagonisten auf die CLA-vermittelte Proliferationshemmung sprechen dafür, dass die Wirkungen von CLA auf bovine Immunzellen PPAR γ -unabhängig sind.

Die Stimulation mit dem Superantigen SEA führte zur verstärkten mRNA-Expression der Zytokine IFN γ , IL-4, IL17 und IL-12. Der Zusatz von CLA zu SEA-stimulierten Zellen führte zu einer signifikanten Unterdrückung aller untersuchten Th1- (IFN γ und IL-12), Th2- (IL-4 und IL-10) sowie Th17-Zytokine (IL-17), während die basale Expression dieser Zytokine durch CLA nicht beeinflusst wurde. Damit war kein selektiver T-Helfer-Subpopulations-spezifischer Effekt von CLA nachzuweisen. Da der Wechsel von IgM- zu IgG1- oder IgG2-exprimierenden B-Zellen (und damit zu IgG1- und IgG2-sezernierenden Plasmazellen) von verschiedenen Th-Zytokinen gesteuert wird, deutet der CLA-induzierte gleichmäßige Abfall der IgG1- und IgG2-Konzentrationen im Blutserum ebenfalls auf eine fehlende Selektivität von CLA in der Beeinflussung von Th-Zytokinmustern hin. Insgesamt kann CLA die Immunabwehrbereitschaft des Tieres beeinflussen ohne zu einer Polarisierung von Immunantworten beim Rind beizutragen.

7 Summary

Jamal Hussen The effect of conjugated linoleic acid (CLA) on the bovine immune system

Conjugated linoleic acids (CLA) gained special attention in nutrition physiology as well as in the reduction of various health risks. Numerous studies in cell lines and in animal models suggest that CLA isomers affect various innate and adaptive immune parameters. The effect of CLA on the bovine immune system has gained less attention. In the present study, cows after calving received feed supplemented with CLA (50 or 100 g per animal and day) for 183 days. During a period from 21 days before and 256 days after calving, cellular composition of blood and the phagocytosis capacity of neutrophils was analyzed. The proliferative response of mononuclear cells was analysed *in vitro*. A putative polarizing effect of CLA on adaptive immune mechanisms *in vivo* was tested by analyzing stimulation-induced cytokines by qRT-PCR *in vitro* and IgG1/IgG2 concentrations in blood serum.

Directly after calving, there was a sharp decline in the number of circulating neutrophils, concomitant with a reduced number of total blood leukocytes. Among mononuclear cells, monocyte number raised after calving, whereas percentages of B- and T-cells dropped. Among T-cells the percentage of $\gamma\delta$ T-cells and CD8+ $\alpha\beta$ T-cells remained constant, while the percentage of CD4 + $\alpha\beta$ T-cells significantly dropped. Phagocytosis by neutrophils significantly dropped between day 21 a.p and day 7 p.p.. The concentration of serum IgG2 showed no changes in the last three weeks before calving, while IgG1 levels dropped continuously until the day of calving. The supplementation with CLA showed no effect on the number of blood leukocytes, granulocytes or mononuclear cells. However, phenotyping of mononuclear cells revealed that CLA supplementation selectively reduced the numbers of CD4+ $\alpha\beta$ T-cells, whereas numbers of monocytes, $\gamma\delta$ T-cells, , B-cells and CD8+ $\alpha\beta$ T-cells remained unchanged. After ceasing CLA supplementation, differences between animal groups rapidly disappeared. Addition of 50 g CLA per animal and day significantly increased phagocytosis of opsonized bacteria by neutrophils, suggesting that CLA may enhance the expression of Fc γ receptors on these cells. Addition of 100 g CLA per animal and day reduced the concentration of both IgG isotypes (IgG1, IgG2) in blood serum from day 7 p.p. during the supplementation period. In milk only IgG1 concentrations dropped, suggesting, that local plasma cells secreting milk IgG2 were not affected by CLA.

In vitro, the lectin (ConA) and the superantigen (SEA) induced proliferation of bovine mononuclear cells was significantly inhibited by both CLA isomers (*cis9-trans11* und *trans10-cis12*) at tested concentration between 25 and 100 µmol/L.

C9-t11-CLA showed no effect on the viability of resting bovine blood mononuclear cells in vitro, however, could reduce the number of viable SEA-stimulated MNC (due to flow cytometrically detected apoptosis).

The inhibitory effect of CLA and PGJ2 on the proliferation of bovine MNC could not be blocked through GW9662, a specific inhibitor of PPAR γ . The weak MNC expression of PPAR γ , the lack of an induced expression of PTX3 (PPAR γ -regulated gene) and the absence of a blocking effect of the PPAR γ antagonist GW9662 on CLA-mediated proliferation inhibition suggest that effects of CLA on bovine immune cells are PPAR γ independent.

Stimulation with the superantigen SEA resulted in a significantly higher mRNA expression of IFN- γ , IL-4, IL-17 and IL-12. The addition of CLA to SEA-stimulated cells resulted in a significant reduction of all studied Th1 (IFN- γ , IL-12), Th2 (IL-4, IL-10) and Th17 cytokines (IL-17), while basal expression of these cytokines was not affected by CLA. Thus, no selective effect of CLA on a special T-helper subpopulation could be demonstrated.

Since the change of IgM to IgG1- or IgG2-expressing B-cells (and to IgG1- and IgG2-secreting plasma cells) is governed by different Th cytokines, the CLA-induced simultaneous decrease of IgG1 and IgG2 concentrations in blood serum also argues against a selectivity in the Th cytokine bias by CLA.

Overall, CLA seems to affect the immune defense capacity of the animal, without polarizing immune responses in cattle.

8 Literaturverzeichnis

ADLER, H., E. PETERHANS u. T. W. JUNGI (1994):

Generation and functional characterization of bovine bone marrow-derived macrophages.
Veterinary Immunology and Immunopathology 41, 211-227

AKAHOSHI, A., K. Koba, F. ICHINOSE, M. KANEKO, A. SHIMODA, K. NONAKA, M. YAMASAKI, T. IWATA, Y. YAMAUCHI, K. TSUTSUMI u. M. SUGANO (2004):

Dietary protein modulates the effect of CLA on lipid metabolism in rats.
Lipids 39, 25-30

AKASAKI, Y., G. LIU, H. H. MATUNDAN, H. NG, X. YUAN, Z. ZENG, K. L. BLACK u. J. S. YU (2006):

A peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist, troglitazone, facilitates caspase-8 and -9 activities by increasing the enzymatic activity of protein-tyrosine phosphatase-1B on human glioma cells.
J Biol Chem 281, 6165-6174

ALBERS, R., R. P. VAN DER WIELEN, E. J. BRINK, H. F. HENDRIKS, V. N. DOROVSKA-TARAN u. I. C. MOHEDE (2003):

Effects of cis-9, trans-11 and trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid (CLA) isomers on immune function in healthy men.
Eur J Clin Nutr 57, 595-603

ALMEIDA, P. E., P. S. D. WEBER, J. L. BURTON, R. J. TEMPELMAN, J. P. STEIBEL u. A. J. ZANELLA (2007):

Gene expression profiling of peripheral mononuclear cells in lame dairy cows with foot lesions.
Veterinary Immunology and Immunopathology 120, 234-245

AN, M. J., J. H. CHEON, S. W. KIM, J. J. PARK, C. M. MOON, S. Y. HAN, E. S. KIM, T. I. KIM u. W. H. KIM (2009):

Bovine colostrum inhibits nuclear factor kappaB-mediated proinflammatory cytokine expression in intestinal epithelial cells.
Nutr Res 29, 275-280

APPEL, S., V. MIRAKAJ, A. BRINGMANN, M. M. WECK, F. GRUNEBACH u. P. BROSSART (2005):

PPAR-gamma agonists inhibit toll-like receptor-mediated activation of dendritic cells via the MAP kinase and NF-kappaB pathways.
Blood 106, 3888-3894

ASAI, K., K. KAI, H. RIKIISHI, S. SUGAWARA, Y. MARUYAMA, T. YAMAGUCHI, M. OHTA u. K. KUMAGAI (1998):

Variation in CD4+ T and CD8+ T lymphocyte subpopulations in bovine mammary gland secretions during lactating and non-lactating periods.
Vet Immunol Immunopathol 65, 51-61

ASAI, K., Y. KOMINE, T. KOZUTSUMI, T. YAMAGUCHI, K. KOMINE u. K. KUMAGAI (2000):
Predominant subpopulations of T lymphocytes in the mammary gland secretions during lactation and intraepithelial T lymphocytes in the intestine of dairy cows.
Vet Immunol Immunopathol 73, 233-240

AUWERX, J. (1999):
PPARgamma, the ultimate thrifty gene.
Diabetologia 42, 1033-1049

BALLINGALL, K. T., B. M. DUTIA, J. HOPKINS u. H. WRIGHT (1995):
Analysis of the fine specificities of sheep major histocompatibility complex class II-specific monoclonal antibodies using mouse L-cell transfectants.
Anim Genet 26, 79-84

BANNERMAN, D. D., H. R. SPRINGER, M. J. PAAPE, A. C. KAUF u. J. P. GOFF (2008):
Evaluation of breed-dependent differences in the innate immune responses of Holstein and Jersey cows to *Staphylococcus aureus* intramammary infection.
J Dairy Res 75, 291-301

BARISH, G. D., M. DOWNES, W. A. ALAYNICK, R. T. YU, C. B. OCAMPO, A. L. BOOKOUT, D. J. MANGELSDORF u. R. M. EVANS (2005):
A Nuclear Receptor Atlas: macrophage activation.
Mol Endocrinol 19, 2466-2477

BASSAGANYA-RIERA, J. u. R. HONTECILLAS (2006):
CLA and n-3 PUFA differentially modulate clinical activity and colonic PPAR-responsive gene expression in a pig model of experimental IBD.
Clin Nutr 25, 454-465

BASSAGANYA-RIERA, J., R. HONTECILLAS, D. R. ZIMMERMAN u. M. J. WANNEMUEHLER (2001):
Dietary conjugated linoleic acid modulates phenotype and effector functions of porcine CD8(+) lymphocytes.
J Nutr 131, 2370-2377

BASSAGANYA-RIERA, J., P. R.M, S. C. JOBGEN, P. G. HALBUR, K.-J. YOON, M. O'SHEA, I. MOHEDE u. R. HONTECILLAS (2003):
Conjugated linoleic acid ameliorates viral infectivity in a pig model of virally induced immunosuppression.
Journal of Nutrition 133, 3204-3214

BASSET, C., J. HOLTON, R. O'MAHONY u. I. ROITT (2003):
Innate immunity and pathogen-host interaction.
Vaccine 21 Suppl 2, S12-23

BAUMAN, D. E. u. J. M. GRIINARI (2003):
Nutritional regulation of milk fat synthesis.
Annu Rev Nutr 23, 203-227

BAUMAN, D. E., J. W. PERFIELD, 2ND, K. J. HARVATINE u. L. H. BAUMGARD (2008):
Regulation of fat synthesis by conjugated linoleic acid: lactation and the ruminant model.
J Nutr 138, 403-409

BELURY, M. A. (2002a):
Dietary conjugated linoleic acid in health: physiological effects and mechanisms of action.
Annu Rev Nutr 22, 505-531

BELURY, M. A. (2002b):
Inhibition of carcinogenesis by conjugated linoleic acid: potential mechanisms of action.
J Nutr 132, 2995-2998

BELURY, M. A. u. A. KEMPA-STECZKO (1997):
Conjugated linoleic acid modulates hepatic lipid composition in mice.
Lipids 32, 199-204

BELURY, M. A., K. P. NICKEL, C. E. BIRD u. Y. WU (1996):
Dietary conjugated linoleic acid modulation of phorbol ester skin tumor promotion.
Nutr Cancer 26, 149-157

BENSAID, A. u. M. HADAM (1991):
Individual antigens of cattle. Bovine CD4 (BoCD4).
Vet Immunol Immunopathol 27, 51-54

BERDEAUX, O., J. P. BLOND, L. BRETILLON, J. M. CHARDIGNY, T. MAIROT, J. M. VATELE, D. POUILLAIN u. J. L. SEBEDIO (1998):
In vitro desaturation or elongation of monotrans isomers of linoleic acid by rat liver microsomes.
Mol Cell Biochem 185, 17-25

BERGAMO, P., D. LUONGO u. M. ROSSI (2004):
Conjugated linoleic acid--mediated apoptosis in Jurkat T cells involves the production of reactive oxygen species.
Cell Physiol Biochem 14, 57-64

BERGAMO, P., F. MAURANO, R. D'ARIENZO, C. DAVID u. M. ROSSI (2008):

Association between activation of phase 2 enzymes and down-regulation of dendritic cell maturation by c9,t11-conjugated linoleic acid.
Immunol Lett 117, 181-190

BERTHON, P. u. J. HOPKINS (1996):
Ruminant cluster CD14.
Vet Immunol Immunopathol 52, 245-248

BETTELLI, E., T. KORN u. V. K. KUCHROO (2007):
Th17: the third member of the effector T cell trilogy.
Curr Opin Immunol 19, 652-657

BISHOP-BAILEY, D. (2000):
Peroxisome proliferator-activated receptors in the cardiovascular system.
Br J Pharmacol 129, 823-834

BOCCA, C., F. BOZZO, S. FRANCICA, S. COLOMBATTO u. A. MIGLIETTA (2007):
Involvement of PPAR gamma and E-cadherin/beta-catenin pathway in the antiproliferative effect of conjugated linoleic acid in MCF-7 cells.
Int J Cancer 121, 248-256

BODLES, A. M., V. VARMA, A. YAO-BORENGASSER, B. PHANAVANH, C. A. PETERSON, R. E. MCGEHEE, JR., N. RASOULI, M. WABITSCH u. P. A. KERN (2006):
Pioglitazone induces apoptosis of macrophages in human adipose tissue.
J Lipid Res 47, 2080-2088

BONTEMPO, V., D. SCIANNIMANICO, G. PASTORELLI, R. ROSSI, F. ROSI u. C. CORINO (2004):
Dietary conjugated linoleic acid positively affects immunologic variables in lactating sows and piglets.
J Nutr 134, 817-824

BRETILLON, L., J. M. CHARDIGNY, S. GREGOIRE, O. BERDEAUX u. J. L. SEBEDIO (1999):
Effects of conjugated linoleic acid isomers on the hepatic microsomal desaturation activities in vitro.
Lipids 34, 965-969

BROWN, D. A. u. E. LONDON (1998):
Functions of lipid rafts in biological membranes.
Annu Rev Cell Dev Biol 14, 111-136

BROWN, J. M. u. M. K. MCINTOSH (2003):
Conjugated linoleic acid in humans: regulation of adiposity and insulin sensitivity
J Nutr 133, 3041-3046

BURDGE, G. C., S. TRICON, R. MORGAN, K. E. KLIEM, C. CHILDS, E. JONES, J. J. RUSSELL, R. F. GRIMBLE, C. M. WILLIAMS, P. YAQOOB u. P. C. CALDER (2005):
Incorporation of cis-9, trans-11 conjugated linoleic acid and vaccenic acid (trans-11 18 : 1) into plasma and leucocyte lipids in healthy men consuming dairy products naturally enriched in these fatty acids.
Br J Nutr 94, 237-243

BURTON, J. L., S. A. MADSEN, L. C. CHANG, P. S. WEBER, K. R. BUCKHAM, R. VAN DORP, M. C. HICKEY u. B. EARLEY (2005):
Gene expression signatures in neutrophils exposed to glucocorticoids: a new paradigm to help explain "neutrophil dysfunction" in parturient dairy cows.
Vet Immunol Immunopathol 105, 197-219

BUTLER, J. E. (1983):
Bovine immunoglobulins: an augmented review.
Vet Immunol Immunopathol 4, 43-152

BUTLER, J. E., C. A. KIDDY, C. S. PIERCE u. C. A. ROCK (1972):
Quantitative changes associated with calving in the levels of bovine immunoglobulins in selected body fluids. I. Changes in the levels of IgA, IgG1 and total protein.
Can J Comp Med 36, 234-242

BUTZ, D. E., G. LI, S. M. HUEBNER u. M. E. COOK (2007):
A mechanistic approach to understanding conjugated linoleic acid's role in inflammation using murine models of rheumatoid arthritis.
Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 293, R669-676

CALDER, P. C. (2006):
n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases.
Am J Clin Nutr 83, 1505S-1519S

CARTER, L. L. u. R. W. DUTTON (1996):
Type 1 and type 2: a fundamental dichotomy for all T-cell subsets.
Curr Opin Immunol 8, 336-342

CASSATELLA, M. A. (1999):
Neutrophil-derived proteins: selling cytokines by the pound.
Adv Immunol 73, 369-509

CEBRA, C. K., J. R. HEIDEL, R. O. CRISMAN u. B. V. STANG (2003):
The relationship between endogenous cortisol, blood micronutrients, and neutrophil function in postparturient Holstein cows.
J Vet Intern Med 17, 902-907

CHANGHUA, L., Y. JINDONG, L. DEFA, Z. LIDAN, Q. SHIYAN u. X. JIANJUN (2005):
Conjugated linoleic acid attenuates the production and gene expression of proinflammatory cytokines in weaned pigs challenged with lipopolysaccharide.
J Nutr 135, 239-244

CHAPKIN, R. S., N. WANG, Y. Y. FAN, J. R. LUPTON u. I. A. PRIOR (2008):
Docosahexaenoic acid alters the size and distribution of cell surface microdomains.
Biochim Biophys Acta 1778, 466-471

CHENG, W. L., C. K. LII, H. W. CHEN, T. H. LIN u. K. L. LIU (2004):
Contribution of conjugated linoleic acid to the suppression of inflammatory responses through the regulation of the NF-kappaB pathway.
J Agric Food Chem 52, 71-78

CHO, M. H., J. H. KANG u. M. P. YANG (2008):
Immunoenhancing effect of trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid on the phagocytic capacity and oxidative burst activity of canine peripheral blood phagocytes.
Res Vet Sci 85, 269-278

CHUNG, S. W., B. Y. KANG u. T. S. KIM (2003):
Inhibition of interleukin-4 production in CD4+ T cells by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR-gamma) ligands: involvement of physical association between PPAR-gamma and the nuclear factor of activated T cells transcription factor.
Mol Pharmacol 64, 1169-1179

CLARK, R. B., D. BISHOP-BAILEY, T. ESTRADA-HERNANDEZ, T. HLA, L. PUDDINGTON u. S. J. PADULA (2000):
The nuclear receptor PPAR gamma and immunoregulation: PPAR gamma mediates inhibition of helper T cell responses.
J Immunol 164, 1364-1371

COLLOMB, M., U. BUTIKOFER, R. SIEBER, O. BOSSET u. B. JEANGROS (2001):
Conjugated linoleic acid and trans fatty acid composition of cows' milk fat produced in lowlands and highlands.
J Dairy Res 68, 519-523

COLLOMB, M., R. SIEBER u. U. BUTIKOFER (2004):
CLA isomers in milk fat from cows fed diets with high levels of unsaturated fatty acids.
Lipids 39, 355-364

CONCHA, C., O. HOLMBERG u. B. MOREIN (1978):
Proportion of B- and T-lymphocytes in normal bovine milk.
J Dairy Res 45, 287-290

CONSTANT, S. L. u. K. BOTTOMLY (1997):

Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: the alternative approaches.
Annu Rev Immunol 15, 297-322

COOK, M. E., C. C. MILLER, Y. PARK u. M. W. PARIZA (1993):
Immune modulation by altered nutrient metabolism: nutritional control of immune.
Poult Sci 72, 1301- 1305

CUNARD, R., Y. ETO, J. T. MULJADI, C. K. GLASS, C. J. KELLY u. M. RICOTE (2004):
Repression of IFN-gamma expression by peroxisome proliferator-activated receptor gamma.
J Immunol 172, 7530-7536

DANIKAS, D. D., M. KARAKANTZA, G. L. THEODOROU, G. C. SAKELLAROPOULOS u.
C. A. GOGOS (2008):
Prognostic value of phagocytic activity of neutrophils and monocytes in sepsis. Correlation to
CD64 and CD14 antigen expression.
Clin Exp Immunol 154, 87-97

DAUBENBERGER, C. A., E. L. TARACHA, L. GAIDULIS, W. C. DAVIS u. D. J.
MCKEEVER (1999):
Bovine gammadelta T-cell responses to the intracellular protozoan parasite *Theileria parva*.
Infect Immun 67, 2241-2249

DAUN, M. JANE, MCCARTHY u. O. DONNA (1993):
The role of cholecystokinin in interleukin-1-induced anorexia.
Physiol Behav 54, 237- 241

DELMONTE, P., A. KATAOK, B. A. CORL, D. E. BAUMAN u. M. P. YURAWECZ (2005):
Relative retention order of all isomers of cis/trans conjugated linoleic acid FAME from the 6,8-
to 13,15-positions using silver ion HPLC with two elution systems.
Lipids 40, 509-514

DEWHURST, R. J., D. WADHWA, L. P. BORGIDA u. W. J. FISHER (2001):
Rumen acid production from dairy feeds. 1. Effects on feed intake and milk production of dairy
cows offered grass or corn silages.
J Dairy Sci 84, 2721-2729

DHIMAN, T. R., G. R. ANAND, L. D. SATTER u. M. W. PARIZA (1999):
Conjugated linoleic acid content of milk from cows fed different diets.
J Dairy Sci 82, 2146-2156

DHIMAN, T. R., S. H. NAM u. A. L. URE (2005):
Factors affecting conjugated linoleic acid content in milk and meat.
Crit Rev Food Sci Nutr 45, 463-482

DI FELICE, V., F. MACALUSO, A. MONTALBANO, A. M. GAMMAZZA, D. PALUMBO, T. ANGELONE, M. BELLAFFIORE u. F. FARINA (2007):

Effects of conjugated linoleic acid and endurance training on peripheral blood and bone marrow of trained mice.

J Strength Cond Res 21, 193-198

DIRADOURIAN, C., J. GIRARD u. J. P. PEGORIER (2005):

Phosphorylation of PPARs: from molecular characterization to physiological relevance.

Biochimie 87, 33-38

ENGELKING, L. (2004):

Textbook Of Veterinary Physiological Chemistry.

ESCHER, P. u. W. WAHLI (2000):

Peroxisome proliferator-activated receptors: insight into multiple cellular functions.

Mutat Res 448, 121-138

ESTES, D. M. u. W. C. BROWN (2002):

Type 1 and type 2 responses in regulation of Ig isotype expression in cattle.

Vet Immunol Immunopathol 90, 1-10

ESTES, D. M., W. TUO, W. C. BROWN u. J. GOIN (1998):

Effects of type I/type II interferons and transforming growth factor-beta on B-cell differentiation and proliferation. Definition of costimulation and cytokine requirements for immunoglobulin synthesis and expression.

Immunology 95, 604-611

FIELD, C. J. u. P. D. SCHLEY (2004):

Evidence for potential mechanisms for the effect of conjugated linoleic acid on tumor metabolism and immune function: lessons from n-3 fatty acids.

Am J Clin Nutr 79, 1190S-1198S

FORMAN, B. M., J. CHEN u. R. M. EVANS (1997):

Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta.

Proc Natl Acad Sci U S A 94, 4312-4317

FOSSATI, G., D. A. MOULDING, D. G. SPILLER, R. J. MOOTS, M. R. WHITE u. S. W. EDWARDS (2003):

The mitochondrial network of human neutrophils: role in chemotaxis, phagocytosis, respiratory burst activation, and commitment to apoptosis.

J Immunol 170, 1964-1972

FRITSCHKE, J. u. H. STEINHART (1998):

Analysis, occurrence and physiological properties of trans fatty acids (TFA) with particular emphasis on conjugated linoleic acid isomers (CLA) *Lipid* 100, 190-210

GLASS, C. K. u. S. OGAWA (2006):
Combinatorial roles of nuclear receptors in inflammation and immunity.
Nat Rev Immunol 6, 44-55

GOLDSBY., KINDT. u. OSBORNE. (2004):
Kuby Immunology.

GOSSET, P., A. S. CHARBONNIER, P. DELERIVE, J. FONTAINE, B. STAELS, J. PESTEL, A. B. TONNEL u. F. TROTTEIN (2001):
Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators affect the maturation of human monocyte-derived dendritic cells.
Eur J Immunol 31, 2857-2865

GREENE, M. E., B. BLUMBERG, O. W. MCBRIDE, H. F. YI, K. KRONQUIST, K. KWAN, L. HSIEH, G. GREENE u. S. D. NIMER (1995):
Isolation of the human peroxisome proliferator activated receptor gamma cDNA: expression in hematopoietic cells and chromosomal mapping.
Gene Expr 4, 281-299

GRIINARI , J. M., B. A. CORI , S. H. LACY , P. Y. CHOUINARD, K. V. V. NURMELA u. D. E. BAUMAN (2000):
Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating dairy cows by Delta(9)-desaturase.
J. Nutr 130 2285-2291

GUTIERREZ, M., F. I. FORSTER, S. A. MCCONNELL, J. P. CASSIDY, J. M. POLLOCK u. D. G. BRYSON (1999):
The detection of CD2+, CD4+, CD8+, and WC1+ T lymphocytes, B cells and macrophages in fixed and paraffin embedded bovine tissue using a range of antigen recovery and signal amplification techniques.
Vet Immunol Immunopathol 71, 321-334

HA, Y., N. K. GRIMM u. M. W. PARIZA (1987):
Anticarcinogens from fried ground beef: heat-altered derivatives of linoleic acid.
Carcinogenesis 8, 1881-1887

HA, Y., J. STORKSON u. M. W. PARIZA (1990):
Inhibition of benzo(a)pyrene-induced mouse forestomach neoplasia by conjugated dienoic derivatives of linoleic acid. .
Cancer Res 50 1097-1101

HAMMON, D. S., I. M. EVJEN, T. R. DHIMAN, J. P. GOFF u. J. L. WALTERS (2006):

Neutrophil function and energy status in Holstein cows with uterine health disorders.
Vet Immunol Immunopathol 113, 21-29

HAN, S. C., J. H. KANG, S. M. SON, C. S. CHUNG, C. Y. LEE u. M.P. YANG (2003):
Supplement of conjugated linoleic acid increases neutrophil phagocytosis in pigs.
Journal of Veterinary Clinics 20, 437-442

HARP, J. A., T. E. WATERS u. J. P. GOFF (2004):
Lymphocyte subsets and adhesion molecule expression in milk and blood of periparturient dairy cattle.
Vet Immunol Immunopathol 102, 9-17

HARRINGTON, L. E., R. D. HATTON, P. R. MANGAN, H. TURNER, T. L. MURPHY, K. M. MURPHY u. C. T. WEAVER (2005):
Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages.
Nat Immunol 6, 1123-1132

HARRIS, S. G. u. R. P. PHIPPS (2001):
The nuclear receptor PPAR gamma is expressed by mouse T lymphocytes and PPAR gamma agonists induce apoptosis.
Eur J Immunol 31, 1098-1105

HAYEK, M. G., S. N. HAN, D. WU, B. A. WATKINS, M. MEYDANI, J. L. DORSEY, D. E. SMITH u. S. N. MEYDANI (1999):
Dietary conjugated linoleic acid influences the immune response of young and old C57BL/6NCrIBR mice.
J Nutr 129, 32-38

HE, X., H. ZHANG., X. YANG., S. ZHANG., Q. DALI., W. XIAO. u. G. REN. (2007):
Modulation of immune function by conjugated linoleic acid in chickens.
Food and Agricultural Immunology 18, 169 - 178

HEDLUND, G., M. DOHLSTEN, P. A. LANDO u. T. KALLAND (1990):
Staphylococcal enterotoxins direct and trigger CTL killing of autologous HLA-DR+ mononuclear leukocytes and freshly prepared leukemia cells.
Cell Immunol 129, 426-434

HERZIG, C. T. u. C. L. BALDWIN (2009):
Genomic organization and classification of the bovine WC1 genes and expression by peripheral blood gamma delta T cells.
BMC Genomics 10, 191

HOEK, A., V. P. RUTTEN, J. KOOL, G. J. ARKESTEIJN, R. J. BOUWSTRA, I. VAN RHIJN u. A. P. KOETS (2009):

Subpopulations of bovine WC1(+) gammadelta T cells rather than CD4(+)CD25(high) Foxp3(+) T cells act as immune regulatory cells ex vivo.

Vet Res 40, 6

HOPKINS, P. A., J. D. FRASER, A. C. PRIDMORE, H. H. RUSSELL, R. C. READ u. S. SRISKANDAN (2005):

Superantigen recognition by HLA class II on monocytes up-regulates toll-like receptor 4 and enhances proinflammatory responses to endotoxin.

Blood 105, 3655-3662

HOREJSI, V., W. ZHANG u. B. SCHRAVEN (2004):

Transmembrane adaptor proteins: organizers of immunoreceptor signalling.

Nat Rev Immunol 4, 603-616

HOUSEKNECHT, K. L., B. M. COLE u. P. J. STEELE (2002):

Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) and its ligands: a review.

Domest Anim Endocrinol 22, 1-23

HOY, C. E. u. G. HOLMER (1979):

Incorporation of cis- and trans-octadecenoic acids into the membranes of rat liver mitochondria.

Lipids 14, 727-733

HUANG, Z. Y., S. HUNTER, P. CHIEN, M. K. KIM, T. H. HAN-KIM, Z. K. INDIK u. A. D. SCHREIBER (2010):

Interaction of two phagocytic host defense systems: Fcgamma receptors and complement receptor 3.

J Biol Chem

HUGHES, D. A. u. A. C. PINDER (2000):

n-3 polyunsaturated fatty acids inhibit the antigen-presenting function of human monocytes.

Am J Clin Nutr 71, 357S-360S

HUSSAIN, A. M. u. R. C. W. DANIEL (1992):

Phagocytosis by uterine fluid and blood neutrophils and hematological changes in postpartum cows following normal and abnormal parturition.

Theriogenology 37, 1253-1267

IWAKIRI, Y., D. A. SAMPSON u. K. G. ALLEN (2002):

Suppression of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression by conjugated linoleic acid in murine macrophages.

Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 67, 435-443

JANEWAY, C. A., SEN. u. B. TRAVERS (2005):

Immunologie.

Spektrum,

JAUDSZUS, A., M. KROKOWSKI, P. MOCKEL, Y. DARCAN, A. AVAGYAN, P. MATRICARDI, G. JAHREIS u. E. HAMELMANN (2008):

Cis-9,trans-11-conjugated linoleic acid inhibits allergic sensitization and airway inflammation via a PPARgamma-related mechanism in mice.

J Nutr 138, 1336-1342

JIANG, C., A. T. TING u. B. SEED (1998):

PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines.

Nature 391, 82-86

JUNGI, T. W., H. SAGER, H. ADLER, M. BRCIC u. H. PFISTER (1997):

Serum factors, cell membrane CD14, and beta2 integrins are not required for activation of bovine macrophages by lipopolysaccharide.

Infect Immun 65, 3577-3584

KABELITZ, D. u. S. WESSELBORG (1992):

Life and death of a superantigen-reactive human CD4+ T cell clone: staphylococcal enterotoxins induce death by apoptosis but simultaneously trigger a proliferative response in the presence of HLA-DR+ antigen-presenting cells.

Int Immunol 4, 1381-1388

KANG, J. H., G. S. LEE, E. B. JEUNG u. M. P. YANG (2007):

Trans-10, cis-12-conjugated linoleic acid increases phagocytosis of porcine peripheral blood polymorphonuclear cells in vitro.

Br J Nutr 97, 117-125

KANG, J. H. u. M. P. YANG (2008):

In vitro evaluation of the effect of trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid on phagocytosis by canine peripheral blood polymorphonuclear neutrophilic leukocytes exposed to methylprednisolone sodium succinate.

Am J Vet Res 69, 494-500

KATZ, I. u. M. KEENEY (1966):

Characterization of the octadecenoic acids in rumen digesta and rumen bacteria.

J Dairy Sci 49, 962-966

KELLEY, D. S., V. A. SIMON, P. C. TAYLOR, I. L. RUDOLPH, P. BENITO, G. J. NELSON, B. E. MACKEY u. K. L. ERICKSON (2001):

Dietary supplementation with conjugated linoleic acid increased its concentration in human peripheral blood mononuclear cells, but did not alter their function.

Lipids 36, 669-674

KELLEY, D. S., J. M. WARREN, V. A. SIMON, G. BARTOLINI, B. E. MACKEY u. K. L. ERICKSON (2002):

Similar effects of c9,t11-CLA and t10,c12-CLA on immune cell functions in mice.

Lipids 37, 725-728

KELLEY, N. S., N. E. HUBBARD u. K. L. ERICKSON (2007):

Conjugated linoleic acid isomers and cancer.

J Nutr 137, 2599-2607

KEPLER, C. R., K. P. HIRONS, J. J. MCNEILL u. S. B. TOVE (1966):

Intermediates and products of the biohydrogenation of linoleic acid by *Butyrivibrio fibrisolvens*.

J. Biol. Chem 241, 1350-1354

KEPLER, C. R., W. P. TUCKER u. S. B. TOVE (1971):

Biohydrogenation of unsaturated fatty acids. V. Stereospecificity of proton addition and mechanism of action of linoleic acid delta 12-cis, delta 11-trans-isomerase from *Butyrivibrio fibrisolvens*.

J Biol Chem 246, 2765-2771

KIM, J. H., C. S. CHUNG, C. Y. LEE u. M.P. YANG (2003):

Immunoenhancing effects of conjugated linoleic acid on chemotactic activity of porcine peripheral blood polymorphonuclear cells Journal of Veterinary Clinics 20, 1-6

KIM, Y. J., R. H. LIU, J. L. RYCHLIK u. J. B. RUSSELL (2002):

The enrichment of a ruminal bacterium (*Megasphaera elsdenii* YJ-4) that produces the trans-10, cis-12 isomer of conjugated linoleic acid.

J Appl Microbiol 92, 976-982

KIMURA, K., J. P. GOFF, M. E. KEHRLI, JR. u. J. A. HARP (1999):

Phenotype analysis of peripheral blood mononuclear cells in periparturient dairy cows.

J Dairy Sci 82, 315-319

KIMURA, K., J. P. GOFF, M. E. KEHRLI, JR., J. A. HARP u. B. J. NONNECKE (2002):

Effects of mastectomy on composition of peripheral blood mononuclear cell populations in periparturient dairy cows.

J Dairy Sci 85, 1437-1444

KLIEWER, S. A., S. S. SUNDSETH, S. A. JONES, P. J. BROWN, G. B. WISELY, C. S. KOBLE, P. DEVCHAND, W. WAHLI, T. M. WILLSON, J. M. LENHARD u. J. M. LEHMANN (1997):

Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma.

Proc Natl Acad Sci U S A 94, 4318-4323

KLOTZ, L., S. BURGDORF, I. DANI, K. SAIJO, J. FLOSSDORF, S. HUCKE, J. ALFERINK, N. NOVAK, M. BEYER, G. MAYER, B. LANGHANS, T. KLOCKGETHER, A. WAISMAN, G. EBERL, J. SCHULTZE, M. FAMULOK, W. KOLANUS, C. GLASS, C. KURTS u. P. A. KNOLLE (2009):

The nuclear receptor PPAR{gamma} selectively inhibits Th17 differentiation in a T cell-intrinsic fashion and suppresses CNS autoimmunity.
J. Exp. Med. 206, 2079-2089

KLOTZ, L., I. DANI, F. EDENHOFER, L. NOLDEN, B. EVERT, B. PAUL, W. KOLANUS, T. KLOCKGETHER, P. KNOLLE u. L. DIEHL (2007):
Peroxisome proliferator-activated receptor gamma control of dendritic cell function contributes to development of CD4+ T cell anergy.
J Immunol 178, 2122-2131

KODERA, Y., K. TAKEYAMA, A. MURAYAMA, M. SUZAWA, Y. MASUHIRO u. S. KATO (2000):
Ligand type-specific interactions of peroxisome proliferator-activated receptor gamma with transcriptional coactivators.
J Biol Chem 275, 33201-33204

KRAFT, J. (2003)
Incorporation von konjugierten Linolsäuren in Körperlipide unter besonderer Berücksichtigung der Isomerenverteilung.

KRAFT, J., M. COLLOMB, P. MOCKEL, R. SIEBER u. G. JAHREIS (2003):
Differences in CLA isomer distribution of cow's milk lipids.
Lipids 38, 657-664

KUCHEN, S., R. ROBBINS, G. P. SIMS, C. SHENG, T. M. PHILLIPS, P. E. LIPSKY u. R. ETTINGER (2007):
Essential role of IL-21 in B cell activation, expansion, and plasma cell generation during CD4+ T cell-B cell collaboration.
J Immunol 179, 5886-5896

KUHNT, K., J. KRAFT, H. VOGELSANG, K. EDER, J. KRATZSCH u. G. JAHREIS (2007):
Dietary supplementation with trans-11- and trans-12-18 : 1 increases cis-9, trans-11-conjugated linoleic acid in human immune cells, but without effects on biomarkers of immune function and inflammation.
Br J Nutr 97, 1196-1205

LASCELLES, A. K. (1979):
The immune system on the ruminant mammary gland and its role in the control of mastitis.
J Dairy Sci 62, 154-167

LAWSON, L. D., E. G. HILL u. R. T. HOLMAN (1983):
Suppression of arachidonic acid in lipids of rat tissues by dietary mixed isomeric cis and trans octadecenoates.
J Nutr 113, 1827-1835

LAZAR, M. A. (2005):
PPAR gamma, 10 years later.
Biochimie 87, 9-13

LE NAOUR, F., L. HOHENKIRK, A. GROLLEAU, D. E. MISEK, P. LESCURE, J. D. GEIGER, S. HANASH u. L. BERETTA (2001):
Profiling changes in gene expression during differentiation and maturation of monocyte-derived dendritic cells using both oligonucleotide microarrays and proteomics.
J Biol Chem 276, 17920-17931

LEE, C. H., A. CHAWLA, N. URBIZTONDO, D. LIAO, W. A. BOISVERT, R. M. EVANS u. L. K. CURTISS (2003a):
Transcriptional repression of atherogenic inflammation: modulation by PPARdelta.
Science 302, 453-457

LEE, J. W., M. J. PAAPE, T. H. ELSASSER u. X. ZHAO (2003b):
Recombinant soluble CD14 reduces severity of intramammary infection by *Escherichia coli*.
Infect Immun 71, 4034-4039

LEE, K. N., D. KRITCHEVSKY u. M. W. PARIZA (1994):
Conjugated linoleic acid and atherosclerosis in rabbits.
Atherosclerosis 108, 19-25

LEHRKE, M. u. M. A. LAZAR (2005):
The many faces of PPARgamma.
Cell 123, 993-999

LI, M., G. PASCUAL u. C. K. GLASS (2000):
Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent repression of the inducible nitric oxide synthase gene.
Mol Cell Biol 20, 4699-4707

LIEW, C., H. A. SCHUT, S. F. CHIN, M. W. PARIZA u. R. H. DASHWOOD (1995):
Protection of conjugated linoleic acids against 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline-induced colon carcinogenesis in the F344 rat: a study of inhibitory mechanisms.
Carcinogenesis 16, 3037-3043

LIU, L. F., A. PURUSHOTHAM, A. A. WENDEL u. M. A. BELURY (2007):
Combined effects of rosiglitazone and conjugated linoleic acid on adiposity, insulin sensitivity, and hepatic steatosis in high-fat-fed mice.
Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 292, G1671-1682

LLOYD, A. R. u. J. J. OPPENHEIM (1992):
Poly's lament: the neglected role of the polymorphonuclear neutrophil in the afferent limb of the immune response.

Immunol Today 13, 169-172

LOSCHER, C. E., E. DRAPER, O. LEAVY, D. KELLEHER, K. H. MILLS u. H. M. ROCHE (2005):

Conjugated linoleic acid suppresses NF-kappa B activation and IL-12 production in dendritic cells through ERK-mediated IL-10 induction.

J Immunol 175, 4990-4998

LUONGO, D., P. BERGAMO u. M. ROSSI (2003):

Effects of conjugated linoleic acid on growth and cytokine expression in Jurkat T cells.

Immunology Letters 90, 195-201

MACHUGH, N. D., J. K. MBURU, M. J. CAROL, C. R. WYATT, J. A. ORDEN u. W. C. DAVIS (1997):

Identification of two distinct subsets of bovine gamma delta T cells with unique cell surface phenotype and tissue distribution.

Immunology 92, 340-345

MAJAI, G., Z. SARANG, K. CSOMOS, G. ZAHUCZKY u. L. FESUS (2007):

PPARgamma-dependent regulation of human macrophages in phagocytosis of apoptotic cells.

Eur J Immunol 37, 1343-1354

MALLARD, B. A., J. C. DEKKERS, M. J. IRELAND, K. E. LESLIE, S. SHARIF, C. L. VANKAMPEN, L. WAGTER u. B. N. WILKIE (1998):

Alteration in Immune Responsiveness During the Peripartum Period and Its Ramification on Dairy Cow and Calf Health.

J. Dairy Sci. 81, 585-595

MALOVRH, T., L. KOMPAN, P. JUNTES, B. WRABER, A. SPINDLER-VESEL u. D. KOMPAN (2009):

Influence of conjugated linoleic acid on the porcine immune response and morbidity: a randomized controlled trial.

Lipids Health Dis 8, 22

MARTINASSO, G., S. SARACINO, M. MAGGIORA, M. ORALDI, R. A. CANUTO u. G. MUZIO (2009):

Conjugated linoleic acid prevents cell growth and cytokine production induced by TPA in human keratinocytes NCTC 2544.

Cancer Lett

MARX, N., H. DUEZ, J. C. FRUCHART u. B. STAELS (2004):

Peroxisome proliferator-activated receptors and atherogenesis: regulators of gene expression in vascular cells.

Circ Res 94, 1168-1178

MARX, N., B. KEHRLE, K. KOHLHAMMER, M. GRUB, W. KOENIG, V. HOMBACH, P. LIBBY u. J. PLUTZKY (2002):

PPAR activators as antiinflammatory mediators in human T lymphocytes: implications for atherosclerosis and transplantation-associated arteriosclerosis.

Circ Res 90, 703-710

MAYER, B., M. DOLESCHALL, B. BENDER, J. BARTYIK, Z. BOSZE, L. V. FRENYO u. I. KACSKOVICS (2005):

Expression of the neonatal Fc receptor (FcRn) in the bovine mammary gland.

J Dairy Res 72 Spec No, 107-112

MCCLELLAND, S., C. COX, R. O'CONNOR, M. DE GAETANO, C. MCCARTHY, L. CRYAN, D. FITZGERALD u. O. BELTON (2010):

Conjugated linoleic acid suppresses the migratory and inflammatory phenotype of the monocyte/macrophage cell.

Atherosclerosis 211, 96-102

MEGLIA, G. E., A. JOHANNISSON, S. AGENAS, K. HOLTENIUS u. K. P. WALLER (2005):

Effects of feeding intensity during the dry period on leukocyte and lymphocyte sub-populations, neutrophil function and health in periparturient dairy cows.

Vet J 169, 376-384

MEHINDATE, K., J. THIBODEAU, M. DOHLSTEN, T. KALLAND, R. P. SEKALY u. W. MOURAD (1995):

Cross-linking of major histocompatibility complex class II molecules by staphylococcal enterotoxin A superantigen is a requirement for inflammatory cytokine gene expression.

J Exp Med 182, 1573-1577

MEHRZAD, J., H. DOSOGNE, E. MEYER, R. HEYNEMAN u. C. BURVENICH (2001):

Respiratory burst activity of blood and milk neutrophils in dairy cows during different stages of lactation.

J Dairy Res 68, 399-415

MOSMANN, T. R., H. CHERWINSKI, M. W. BOND, M. A. GIEDLIN u. R. L. COFFMAN (1986):

Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins.

J Immunol 136, 2348-2357

MULLEN, A., F. MOLONEY, A. P. NUGENT, L. DOYLE, K. D. CASHMAN u. H. M. ROCHE (2007):

Conjugated linoleic acid supplementation reduces peripheral blood mononuclear cell interleukin-2 production in healthy middle-aged males.

J Nutr Biochem 18, 658-666

- NAKAMURA, Y. K., N. FLINTOFF-DYE u. S. T. OMAYE (2008):
Conjugated linoleic acid modulation of risk factors associated with atherosclerosis.
Nutr Metab (Lond) 5, 22
- NAKAMURA, Y. K. u. S. T. OMAYE (2009):
Conjugated linoleic acid isomers' roles in the regulation of PPAR-gamma and NF-kappaB DNA binding and subsequent expression of antioxidant enzymes in human umbilical vein endothelial cells.
Nutrition 25, 800-811
- NENCIONI, A., F. GRUNEBACH, A. ZOBYWLASKI, C. DENZLINGER, W. BRUGGER u. P. BROSSART (2002):
Dendritic cell immunogenicity is regulated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma.
J Immunol 169, 1228-1235
- NENCIONI, A., K. LAUBER, F. GRUNEBACH, L. VAN PARIJS, C. DENZLINGER, S. WESSELBORG u. P. BROSSART (2003):
Cyclopentenone prostaglandins induce lymphocyte apoptosis by activating the mitochondrial apoptosis pathway independent of external death receptor signaling.
J Immunol 171, 5148-5156
- NEUVIANS, T. P., D. SCHAMS, B. BERISHA u. M. W. PFAFFL (2004):
Involvement of pro-inflammatory cytokines, mediators of inflammation, and basic fibroblast growth factor in prostaglandin F₂alpha-induced luteolysis in bovine corpus luteum.
Biol Reprod 70, 473-480
- NEWBY, T. J., C. R. STOKES u. F. J. BOURNE (1982):
Immunological activities of milk.
Vet Immunol Immunopathol 3, 67-94
- NICHOLSON, A. C., J. HAN, M. FEBBRAIO, R. L. SILVERSTERIN u. D. P. HAJJAR (2001):
Role of CD36, the macrophage class B scavenger receptor, in atherosclerosis.
Ann N Y Acad Sci 947, 224-228
- NOLTE, R. T., G. B. WISELY, S. WESTIN, J. E. COBB, M. H. LAMBERT, R. KUROKAWA, M. G. ROSENFELD, T. M. WILLSON, C. K. GLASS u. M. V. MILBURN (1998):
Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma.
Nature 395, 137-143
- NONNECKE, B. J., K. KIMURA, J. P. GOFF u. M. E. KEHRLI, JR. (2003):
Effects of the mammary gland on functional capacities of blood mononuclear leukocyte populations from periparturient cows.
J Dairy Sci 86, 2359-2368

NUGENT, A. P., H. M. ROCHE, E. J. NOONE, A. LONG, D. K. KELLEHER u. M. J. GIBNEY (2005):

The effects of conjugated linoleic acid supplementation on immune function in healthy volunteers.

Eur J Clin Nutr 59, 742-750

NUNES, E. A., S. J. BONATTO, H. H. DE OLIVEIRA, N. L. RIVERA, A. MAIORKA, E. L. KRABBE, R. A. TANHOFFER u. L. C. FERNANDES (2008):

The effect of dietary supplementation with 9-cis:12-trans and 10-trans:12-cis conjugated linoleic acid (CLA) for nine months on serum cholesterol, lymphocyte proliferation and polymorphonuclear cells function in Beagle dogs.

Res Vet Sci 84, 62-67

O'SHEA, M., J. BASSAGANYA-RIERA u. I. C. MOHEDE (2004):

Immunomodulatory properties of conjugated linoleic acid.

Am J Clin Nutr 79, 1199S-1206S

OGAWA, J., S. KISHINO, A. ANDO, S. SUGIMOTO, K. MIHARA u. S. SHIMIZU (2005):

Production of conjugated fatty acids by lactic acid bacteria.

J Biosci Bioeng 100, 355-364

OSTROWSKA, E., A. KNOWLES, M. MURALITHARAN, R. CROSS, D. BAUMAN u. F. DUNSHEA (2004):

Effects of dietary conjugated linoleic acid on haematological and humoral responses in the grower pig

PAAPE, M., J. MEHRZAD, X. ZHAO, J. DETILLEUX u. C. BURVENICH (2002):

Defense of the bovine mammary gland by polymorphonuclear neutrophil leukocytes.

J Mammary Gland Biol Neoplasia 7, 109-121

PADILLA, J., E. LEUNG u. R. P. PHIPPS (2002):

Human B lymphocytes and B lymphomas express PPAR-gamma and are killed by PPAR-gamma agonists.

Clin Immunol 103, 22-33

PARIZA, M. W. u. W. HARGRAVES (1985):

A beef-derived mutagenesis modulator inhibits initiation of mouse epidermal tumors by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene Carcinogenesis 6, 591-593

PARIZA, M. W., Y. PARK u. M. E. COOK (2000):

Mechanisms of action of conjugated linoleic acid: evidence and speculation.

Proc Soc Exp Biol Med 223, 8-13

PARK, Y., K. J. ALBRIGHT, J. M. STORKSON, W. LIU u. M. W. PARIZA (2007):

Conjugated linoleic acid (CLA) prevents body fat accumulation and weight gain in an animal model.

J Food Sci 72, S612-617

PARK, Y. H., L. K. FOX, M. J. HAMILTON u. W. C. DAVIS (1992):

Bovine mononuclear leukocyte subpopulations in peripheral blood and mammary gland secretions during lactation.

J Dairy Sci 75, 998-1006

PECHHOLD, K., T. POHL u. D. KABELITZ (1994):

Rapid quantification of lymphocyte subsets in heterogeneous cell populations by flow cytometry. Cytometry 16, 152-159

PETERSON, K. M., M. O'SHEA, W. STAM, I. C. MOHEDE, J. T. PATRIE u. F. G. HAYDEN (2009):

Effects of dietary supplementation with conjugated linoleic acid on experimental human rhinovirus infection and illness.

Antivir Ther 14, 33-43

PETERSON, L. D., N. M. JEFFERY, F. THIES, P. SANDERSON, E. A. NEWSHOLME u. P. C. CALDER (1998):

Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids alter rat spleen leukocyte fatty acid composition and prostaglandin E2 production but have different effects on lymphocyte functions and cell-mediated immunity.

Lipids 33, 171-180

PETRI, A. u. P. WATSON (2006):

Statistics for Veterinary and Animal Science.

PICH, I., S. LOPEZ, L. VILA, C. LAGUNAS u. C. DE CASTELLARNAU (1993):

Influence of fatty acid anilides present in toxic oils on the metabolism of exogenous arachidonic acid in cultured human endothelial cells.

Toxicology 77, 51-63

PIERCE, S. K. (2002):

Lipid rafts and B-cell activation.

Nat Rev Immunol 2, 96-105

PIRZADA, Y., S. KHUDER u. H. DONABEDIAN (2006):

Predicting AIDS-related events using CD4 percentage or CD4 absolute counts.

AIDS Res Ther 3, 20

PLATTNER, B. L., R. T. DOYLE u. J. M. HOSTETTER (2009):

Gamma-delta T cell subsets are differentially associated with granuloma development and organization in a bovine model of mycobacterial disease.

Int J Exp Pathol 90, 587-597

POLIKANDRIOTIS, J. A., L. J. MAZZELLA, H. L. RUPNOW u. C. M. HART (2005):
Peroxisome Proliferator-Activated Receptor {gamma} Ligands Stimulate Endothelial Nitric
Oxide Production Through Distinct Peroxisome Proliferator-Activated Receptor {gamma}-
Dependent Mechanisms.
Arterioscler Thromb Vasc Biol 25, 1810-1816

PORTER, P. (1973):
The functional role of secretory antibody systems in early development of the pig and the calf.
Proc Nutr Soc 32, 217-222

PRICE, S. J. u. J. C. HOPE (2009):
Enhanced secretion of interferon-gamma by bovine gammadelta T cells induced by coculture
with Mycobacterium bovis-infected dendritic cells: evidence for reciprocal activating signals.
Immunology 126, 201-208

RAMIREZ-SANTANA, C., C. CASTELLOTE, M. CASTELL, M. RIVERO, M. RODRIGUEZ-
PALMERO, A. FRANCH u. F. J. PEREZ-CANO (2009):
Long-term feeding of the cis-9,trans-11 isomer of conjugated linoleic acid reinforces the specific
immune response in rats.
J Nutr 139, 76-81

RAZZAQ, T. M., P. OZEGBE, E. C. JURY, P. SEMBI, N. M. BLACKWELL u. P. S.
KABOURIDIS (2004):
Regulation of T-cell receptor signalling by membrane microdomains.
Immunology 113, 413-426

REERS, M., S. T. SMILEY, C. MOTTOLA-HARTSHORN, A. CHEN, M. LIN u. L. B. CHEN
(1995):
Mitochondrial membrane potential monitored by JC-1 dye.
Methods Enzymol 260, 406-417

RENNER, L., J. PAPPRITZ, R. KRAMER, S. DOLL, G. JAHREIS u. S. DANICKE (2012):
Fatty acid profile and proliferation of bovine blood mononuclear cells after conjugated linoleic
acid supplementation.
Lipids Health Dis 11, 63

RESCH, K., E. W. GELFAND, K. HANSEN u. E. FERBER (1972):
Lymphocyte activation: rapid changes in the phospholipid metabolism of plasma membranes
during stimulation.
Eur J Immunol 2, 598-601

REYNOLDS, C. M., E. DRAPER, B. KEOGH, A. RAHMAN, A. P. MOLONEY, K. H. G.
MILLS, C. E. LOSCHER u. H. M. ROCHE (2009):

A Conjugated Linoleic Acid-Enriched Beef Diet Attenuates Lipopolysaccharide-Induced Inflammation in Mice in Part through PPAR γ -Mediated Suppression of Toll-Like Receptor 4.

J. Nutr. jn.109.113035

RICOTE, M., A. C. LI, T. M. WILLSON, C. J. KELLY u. C. K. GLASS (1998):

The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation.

Nature 391, 79-82

RINGSEIS, R., A. MULLER, K. DUSTERLOH, S. SCHLESER, K. EDER u. H. STEINHART (2006):

Formation of conjugated linoleic acid metabolites in human vascular endothelial cells.

Biochim Biophys Acta 1761, 377-383

RIOLLET, C., D. MUTUEL, M. DUONOR-CERUTTI u. P. RAINARD (2006):

Determination and characterization of bovine interleukin-17 cDNA.

J Interferon Cytokine Res 26, 141-149

RITZENTHALER, K. L., M. K. MCGUIRE, M. A. MCGUIRE, T. D. SHULTZ, A. E. KOEPP, L. O. LUEDECKE, T. W. HANSON, N. DASGUPTA u. B. P. CHEW (2005):

Consumption of conjugated linoleic acid (CLA) from CLA-enriched cheese does not alter milk fat or immunity in lactating women.

J Nutr 135, 422-430

ROMAGNANI, S. (1997):

The Th1/Th2 paradigm.

Immunol Today 18, 263-266

ROMAGNANI, S. (2006):

Regulation of the T cell response.

Clin Exp Allergy 36, 1357-1366

ROMEO, D., B. SKERLAVAJ, M. BOLOGNESI u. R. GENNARO (1988):

Structure and bactericidal activity of an antibiotic dodecapeptide purified from bovine neutrophils.

J Biol Chem 263, 9573-9575

SAAD, A. M., C. CONCHA u. G. ASTROM (1989):

Alterations in neutrophil phagocytosis and lymphocyte blastogenesis in dairy cows around parturition.

Zentralbl Veterinarmed B 36, 337-345

SANDERSON, P., G. G. MACPHERSON, C. H. JENKINS u. P. C. CALDER (1997):

Dietary fish oil diminishes the antigen presentation activity of rat dendritic cells.

J Leukoc Biol 62, 771-777

SAVINO, W., M. C. POSTEL-VINAY, S. SMANIOTTO u. M. DARDENNE (2002):
The Thymus Gland: a Target Organ for Growth Hormone.
Scandinavian Journal of Immunology 55, 442-452

SCHMIDT, C., D. KIM, G. C. IPPOLITO, H. R. NAQVI, L. PROBST, S. MATHUR, G. ROSAS-ACOSTA, V. G. WILSON, A. L. OLDHAM, M. POENIE, C. F. WEBB u. P. W. TUCKER (2009):
Signalling of the BCR is regulated by a lipid rafts-localised transcription factor, Bright.
EMBO J 28, 711-724

SCHOONJANS, K., B. STAELS u. J. AUWERX (1996):
Role of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in mediating the effects of fibrates and fatty acids on gene expression.
J Lipid Res 37, 907-925

SCHUBERTH, H. J., C. KRUEGER, H. ZERBE, E. BLECKMANN u. W. LEIBOLD (2001):
Characterization of leukocytotoxic and superantigen-like factors produced by Staphylococcus aureus isolates from milk of cows with mastitis.
Vet Microbiol 82, 187-199

SETOGUCHI, K., Y. MISAKI, Y. TERAUCHI, T. YAMAUCHI, K. KAWAHATA, T. KADOWAKI u. K. YAMAMOTO (2001):
Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma haploinsufficiency enhances B cell proliferative responses and exacerbates experimentally induced arthritis.
J Clin Invest 108, 1667-1675

SHAFER-WEAVER, K. A. u. L. M. SORDILLO (1997):
Bovine CD8+ suppressor lymphocytes alter immune responsiveness during the postpartum period.
Vet Immunol Immunopathol 56, 53-64

SHAIKH, S. R. u. M. EDIDIN (2007):
Immunosuppressive effects of polyunsaturated fatty acids on antigen presentation by human leukocyte antigen class I molecules.
J Lipid Res 48, 127-138

SHEIBANIE, A. F., J. H. YEN, T. KHAYRULLINA, F. EMIG, M. ZHANG, R. TUMA u. D. GANEA (2007):
The proinflammatory effect of prostaglandin E2 in experimental inflammatory bowel disease is mediated through the IL-23-->IL-17 axis.
J Immunol 178, 8138-8147

SIMON, O., K. MÄNNER, K. SCHÄFER, A. SAGREDOS u. K. EDER (2000):

Effects of conjugated linoleic acids on protein to fat proportions, fatty acids, and plasma lipids in broilers.

Eur. J. Lipid Sci. Technol 102, 402-410

SIMONS, K. u. D. TOOMRE (2000):

Lipid rafts and signal transduction.

Nat Rev Mol Cell Biol 1, 31-39

SIPKA, A. (2007)

Charakterisierung der immunmodulatorischen Wirkung des Neuromediators Substanz P auf bovine Immunzellen.

SOLTYS, J. u. M. T. QUINN (1999):

Selective recruitment of T-cell subsets to the udder during staphylococcal and streptococcal mastitis: analysis of lymphocyte subsets and adhesion molecule expression.

Infect Immun 67, 6293-6302

SONG, D. H., J. H. KANG, G. S. LEE, E. B. JEUNG u. M. P. YANG (2007):

Upregulation of tumor necrosis factor-alpha expression by trans10-cis12 conjugated linoleic acid enhances phagocytosis of RAW macrophages via a peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent pathway.

Cytokine 37, 227-235

SONG, H. J., I. GRANT, D. ROTONDO, I. MOHEDE, N. SATTAR, S. D. HEYS u. K. W. WAHLE (2005):

Effect of CLA supplementation on immune function in young healthy volunteers.

Eur J Clin Nutr 59, 508-517

SPRECHER, H. (1981):

Biochemistry of essential fatty acids.

Prog Lipid Res 20, 13-22

STACHOWSKA, E., M. BASKIEWICZ-MASIUK, V. DZIEDZIEJKO, I. GUTOWSKA, I. BARANOWSKA-BOSIACKA, M. MARCHLEWICZ, B. DOLEGOWSKA, B. WISZNIEWSKA, B. MACHALINSKI u. D. CHLUBEK (2008):

Conjugated linoleic acid increases intracellular ROS synthesis and oxygenation of arachidonic acid in macrophages.

Nutrition 24, 187-199

STANGL, G. I. (2000):

High dietary levels of a conjugated linoleic acid mixture alter hepatic glycerophospholipid class profile and cholesterol-carrying serum lipoproteins of rats.

J Nutr Biochem 11, 184-191

STEINHART, C. (1996):

Conjugated linoleic acid. The good news about animal fat.
J Chem Educ 73, A302

STUBBS, C. D. u. A. D. SMITH (1984):

The modification of mammalian membrane polyunsaturated fatty acid composition in relation to membrane fluidity and function.

Biochim. Biophys. Acta 921, 378-391

SUGANO, M., A. TSUJITA, M. YAMASAKI, M. NOGUCHI u. K. YAMADA (1998):

Conjugated linoleic acid modulates tissue levels of chemical mediators and immunoglobulins in rats.

Lipids 33, 521-527

SZATMARI, I. u. L. NAGY (2008):

Nuclear receptor signalling in dendritic cells connects lipids, the genome and immune function.

EMBO J 27, 2353-2362

SZATMARI, I., E. RAJNAVOLGYI u. L. NAGY (2006):

PPARgamma, a lipid-activated transcription factor as a regulator of dendritic cell function.

Ann N Y Acad Sci 1088, 207-218

SZATMARI, I., D. TOROCSIK, M. AGOSTINI, T. NAGY, M. GURNELL, E. BARTA, K. CHATTERJEE u. L. NAGY (2007):

PPARgamma regulates the function of human dendritic cells primarily by altering lipid metabolism.

Blood 110, 3271-3280

TARGOWSKI, S. P. (1983):

Role of immune factors in protection of mammary gland.

J Dairy Sci 66, 1781-1789

TAUTENHAHN, A., B. BRUNE u. A. VON KNETHEN (2003):

Activation-induced PPARgamma expression sensitizes primary human T cells toward apoptosis.

J Leukoc Biol 73, 665-672

TIZARD, I. R. (2008a):

Veterinary Immunology: An Introduction.

TOOMEY, S., H. ROCHE, D. FITZGERALD u. O. BELTON (2003):

Regression of pre-established atherosclerosis in the apoE^{-/-} mouse by conjugated linoleic acid.

Biochem Soc Trans 31, 1075-1079

TRICON, S., G. C. BURDGE, S. KEW, T. BANERJEE, J. J. RUSSELL, R. F. GRIMBLE, C. M. WILLIAMS, P. C. CALDER u. P. YAQOUB (2004):

Effects of cis-9,trans-11 and trans-10,cis-12 conjugated linoleic acid on immune cell function in healthy humans.

Am J Clin Nutr 80, 1626-1633

TRIGONA, W. L., A. HIRANO, W. C. BROWN u. D. M. ESTES (1999):

Immunoregulatory roles of interleukin-13 in cattle.

J Interferon Cytokine Res 19, 1317-1324

TRINCHIERI, G. (1997):

Cytokines acting on or secreted by macrophages during intracellular infection (IL-10, IL-12, IFN-gamma).

Curr Opin Immunol 9, 17-23

TRUITT , A., G. MCNEILL u. J. Y. VANDERHOEK (1999):

Antiplatelet effects of conjugated linoleic acid isomers.

Biochim. Biophys. Acta 1438, 239-246

TURPEINEN, A. M., N. YLONEN, E. VON WILLEBRAND, S. BASU u. A. ARO (2008):

Immunological and metabolic effects of cis-9, trans-11-conjugated linoleic acid in subjects with birch pollen allergy.

Br J Nutr 100, 112-119

ULEVITCH, R. J. u. P. S. TOBIAS (1995):

Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin.

Annu Rev Immunol 13, 437-457

VAN KAMPEN, C. u. B. A. MALLARD (1997):

Effects of peripartum stress and health on circulating bovine lymphocyte subsets.

Vet Immunol Immunopathol 59, 79-91

VAN KAMPEN, C., B. A. MALLARD u. B. N. WILKIE (1999):

Adhesion molecules and lymphocyte subsets in milk and blood of periparturient Holstein cows.

Veterinary Immunology and Immunopathology 69, 23-32

VON KNETHEN, A., M. SOLLER u. B. BRUNE (2007):

Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma) and sepsis.

Arch Immunol Ther Exp (Warsz) 55, 19-25

WAHLE, K. W., S. D. HEYS u. D. ROTONDO (2004):

Conjugated linoleic acids: are they beneficial or detrimental to health?

Prog Lipid Res 43, 553-587

WALLACE, R. J., N. MCKAIN, K. J. SHINGFIELD u. E. DEVILLARD (2007):

Isomers of conjugated linoleic acids are synthesized via different mechanisms in ruminal digesta and bacteria.

J Lipid Res 48, 2247-2254

WANG, P., P. O. ANDERSON, S. CHEN, K. M. PAULSSON, H. O. SJOGREN u. S. LI (2001):
Inhibition of the transcription factors AP-1 and NF-kappaB in CD4 T cells by peroxisome
proliferator-activated receptor gamma ligands.
Int Immunopharmacol 1, 803-812

WARTHA, F., K. BEITER, S. NORMARK u. B. HENRIQUES-NORMARK (2007):
Neutrophil extracellular traps: casting the NET over pathogenesis.
Curr Opin Microbiol 10, 52-56

WHIGHAM, L. D., E. B. COOK, J. L. STAHL, R. SABAN, D. E. BJORLING, M. W. PARIZA
u. M. E. COOK (2001):
CLA reduces antigen-induced histamine and PGE(2) release from sensitized guinea pig tracheae.
Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 280, R908-912

WHIGHAM, L. D., A. HIGBEE, D. BJORLING, M. W. PARIZA u. M. E. COOK (2000):
Conjugated linoleic acid decreases antigen-induced release of lipid-derived mediators
in guinea pig airways.
Fed Am Soc Exp Biol J 14, 728

WILSON, E., J. F. HEDGES, E. C. BUTCHER, M. BRISKIN u. M. A. JUTILA (2002):
Bovine gamma delta T cell subsets express distinct patterns of chemokine responsiveness and
adhesion molecules: a mechanism for tissue-specific gamma delta T cell subset accumulation.
J Immunol 169, 4970-4975

WONG, M. W., B. P. CHEW, T. S. WONG, H. L. HOSICK, T. D. BOYLSTON u. T. D.
SCHULTZ (1997):
Effects of Dietary Conjugated Linoleic Acid on Lymphocyte Function and Growth of Mammary
Tumors in Mice.
Anticancer Res 17, 987-994

YAMASAKI, M., H. CHUJO, A. HIRAO, N. KOYANAGI, T. OKAMOTO, N. TOJO, A.
OISHI, T. IWATA, Y. YAMAUCHI-SATO, T. YAMAMOTO, K. TSUTSUMI, H.
TACHIBANA u. K. YAMADA (2003):
Immunoglobulin and cytokine production from spleen lymphocytes is modulated in C57BL/6J
mice by dietary cis-9, trans-11 and trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid.
J Nutr 133, 784-788

YANG, M. u. M. E. COOK (2003):
Dietary conjugated linoleic acid decreased cachexia, macrophage tumor necrosis factor- α
production, and modifies splenocyte cytokines production.
Experimental Biology and Medicine 228 51-58

YANG, M., M. PARIZA u. M. COOK (2000):

Dietary conjugated linoleic acid protects against end stage disease of systemic lupus erythematosus in the NZB/W F1 mouse.

Immunopharmacol Immunotoxicol 22, 433- 449

YANG, Z., C. D. CARTER, M. S. MILLER u. P. N. BOCHSLER (1995):

CD14 and tissue factor expression by bacterial lipopolysaccharide-stimulated bovine alveolar macrophages in vitro.

Infect Immun 63, 51-56

YAQOOB, P. u. P. C. CALDER (2007):

Fatty acids and immune function: new insights into mechanisms.

Br J Nutr 98 Suppl 1, S41-45

YOSHINO, N., Y. AMI, K. TERAU, F. TASHIRO u. M. HONDA (2000):

Upgrading of flow cytometric analysis for absolute counts, cytokines and other antigenic molecules of cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) by using anti-human cross-reactive antibodies.

Exp Anim 49, 97-110

YU, Y., P. H. CORRELL u. J. P. VANDEN HEUVEL (2002):

Conjugated linoleic acid decreases production of pro-inflammatory products in macrophages: evidence for a PPAR gamma-dependent mechanism.

Biochim Biophys Acta 1581, 89-99

ZHANG, H. J., Y. M. GUO, Y. YANG u. J. M. YUAN (2006):

Dietary conjugated linoleic acid enhances spleen PPAR-gamma mRNA expression in broiler chicks.

Br Poult Sci 47, 726-733

ZHANG, X. u. H. A. YOUNG (2002):

PPAR and immune system--what do we know?

Int Immunopharmacol 2, 1029-1044

Danksagung

An erster Stelle möchte ich Herren Apl. Prof. Dr. H.-J. Schubert für die Überlassung des Themas und die hervorragende Betreuung herzlich danken. Jederzeit war er bereit für alle möglichen Fragen und Probleme. Sein Optimismus und seine motivierende Worte haben mir immer wieder neue Hoffnungstüre geöffnet.

Der Veterinärfakultät in Hama/Syrien danke ich für die Finanzierung meines Stipendiums.

Herren Prof. Dr. W. Leibold danke ich für die Betreuung während meiner Anfangszeit in der Arbeitsgruppe sowie die herzliche Sorge um mich und meine Familie in Hannover.

Ein großer Dank auch für die Mitarbeiter aus dem Labor der Arbeitsgruppe Immunologie: Silke Schöneberg, Sonja Kordex, Udo Rabe und Dr. Jens Rohwer. Sie standen jederzeit mit ihrem Wissen und Hilfsbereitschaft zur Seite beim Lösen von allen praktischen Problemen.

All meinen ehemaligen und derzeitigen Kollegen der Arbeitsgruppe Immunologie ein herzliches Dankeschön. Das freundschaftliche Klima und die gegenseitige Hilfsbereitschaft waren eine große Unterstützung für mich.

Ein ganz großer Dank geht an meine Eltern, meine Frau Asma und meine Kinder Ahmad, Aiman und Iman für ihre Unterstützung.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die Dissertation mit dem Titel *Einfluss von konjugierten Linolsäuren (CLA) auf das bovine Immunsystem* selbstständig verfasst habe.

Zur Anfertigung dieser Dissertation wurden folgende Hilfsmittel und Hilfen Dritter in Anspruch genommen:

- Materialien und Geräte wurden von der Arbeitsgruppe Immunologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover zur Verfügung gestellt.

Ich habe die Dissertation an folgenden wissenschaftlichen Einrichtungen angefertigt:

- Arbeitsgruppe Immunologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover.

Die Dissertation wurde bisher nicht für eine Prüfung oder Promotion oder für einen ähnlichen Zweck zur Beurteilung eingereicht.

Ich versichere, dass ich die vorstehenden Angaben nach bestem Wissen vollständig und der Wahrheit entsprechend gemacht habe.

Eigenhändige Unterschrift