

Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
Landwirtschaftliche Fakultät

Lehr- und Forschungsschwerpunkt
„Umweltverträgliche und Standortgerechte Landwirtschaft“



Forschungsbericht

Nr. 168

Antichlamydiale Wirkung mehrfach ungesättigter Fettsäuren

Verfasser:

Prof. Dr. Dr. Helga Sauerwein

Dr. Anke Jaudszus

Institut für Tierwissenschaften
Abteilung Physiologie & Hygiene

Herausgeber: Lehr- und Forschungsschwerpunkt „Umweltverträgliche und Standortgerechte Landwirtschaft“, Landwirtschaftliche Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Meckenheimer Allee 172, 53115 Bonn
Tel.: 0228 – 73 2285; Fax.: 0228 – 73 1776
www.usl.uni-bonn.de

Forschungsvorhaben im Auftrag des Ministeriums für Umwelt und Naturschutz, Landwirtschaft und Verbraucherschutz des Landes Nordrhein-Westfalen
Bonn, Januar 2012

ISSN 1610-2460

Projektleitung: Prof. Dr. Dr. Helga Sauerwein

Projektbearbeiter: Dr. Anke Jaudszus
Dr. Christian Degen

Institut für Tierwissenschaften
Abteilung Physiologie und Hygiene
Katzenburgweg 7-9
53115 Bonn

Zitiervorschlag:

JAUDSZUS, A. UND H. SAUERWEIN (2012): Antichlamydiale Wirkung mehrfach ungesättigter Fettsäuren. Landwirtschaftliche Fakultät der Universität Bonn, Schriftenreihe des Lehr- und Forschungsschwerpunktes USL, Nr. 168, 39 Seiten.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abkürzungsverzeichnis	3
1 Einleitung	4
1.1 Chlamydienerkrankungen in Rinderbeständen und Möglichkeiten der Kontrolle	4
1.2 Ungesättigte Fettsäuren als neuer Ansatzpunkt zur Therapie und Prävention von Chlamydieninfektionen	6
2 Untersuchung der antichlamydialen Wirkung von verschiedenen PUFA und CLA im Zellkulturmodell	11
2.1 Versuchsplan und methodische Ergebnisse	12
2.1.1 Optimale Einsaatdichte	12
2.1.2 Optimale Infektionsdosis	13
2.1.3 Toxizitätstest	14
2.1.4 Metabolismus der Fettsäuren	14
3 Wirksamkeit einzelner Fettsäuren im Hinblick auf die Chlamydieninfektionsrate	16
3.1 Wirksamkeit in humanen Zervixepithelzellen (HeLa-Zellen)	16
3.2 Wirksamkeit in humanen Lungenepithelzellen (A549-Zellen)	17
3.3 Wirksamkeit in bovinen Lungenepithelzellen (EBL-Zellen)	19
4 Wirksamkeit von CLA-Isomeregemischen auf die Chlamydieninfektionsrate	19
4.1 Wirksamkeit der kombinierten CLA-Isomere in humanen Zervixepithelzellen (HeLa-Zellen)	20
4.2 Wirksamkeit der kombinierten CLA-Isomere in humanen Lungenepithelzellen (A549-Zellen)	20
4.3 Wirksamkeit der kombinierten CLA-Isomere in bovinen Lungenepithelzellen (EBL)	21
5 Diskussion	22
6 Schlussfolgerungen	29
7 Literaturverzeichnis	30
8 Liste über Veröffentlichungen	38
9 Kurzfassung	39

Abkürzungsverzeichnis

AA	Arachidonsäure
ALA	α -Linolensäure
cfu	Colony forming unit
CLA	Conjugated linoleic acids
COX	Cyclooxygenase
DMSO	Dimethylsulfoxid
EPA	Eicosapentaensäure
FS	Fettsäure
HMEC	Human Mammary Epithelial Cells
IGF	Insulin-like Growth factor
LA	Linolsäure
γ LnA	γ -Linolensäure
MP6	Mannose-6-Phosphat
OA	Ölsäure
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDGF	Platelet-derived Growth Factor
PDI	Proteindisulfitisomerase
PPAR	Peroxisomen Proliferator-aktivierter Rezeptor
PTG γ	Proteinphosphatase gamma
PUFA	polyunsaturated fatty acids
SD	Standardabweichung
WAVE2	Wiskott-Aldrich syndrome protein family member 2

1 Einleitung

1.1 Chlamydienerkrankungen in Rinderbeständen und Möglichkeiten der Kontrolle

Chlamydien sind eine Gattung obligat-intrazellulärer Bakterien, die unter anderem die humanpathogene Art *Chlamydia trachomatis* und die zoonotischen Spezies *Chlamydophila pneumoniae* und *Chlamydophila psittaci* umfaßt. Die Erreger rufen beim Menschen vielfältige, schwere Erkrankungen hervor (z.B. Trachom, Infektionen des Urogenitaltraktes, Psittakose). Das Robert-Koch-Institut gibt die Zahl der *C. trachomatis*-Infektionen in Deutschland mit jährlich etwa 300.000 an und *Cp. pneumoniae* wird für 5 - 15 % der akuten Lungenentzündungen verantwortlich gemacht (RKI, 2001 a; RKI 2001b).

In der Tierhaltung kommt den Chlamydien große Bedeutung zu: Aktuelle Erhebungen ergaben positive Befunde (PCR-Erregernachweis) bei 61 % der untersuchten Kuhherden in NRW (Kemmerling et al. 2009). Die in den vergangenen 20 Jahren publizierten Daten deuten weltweit auf eine sehr hohe Seroprävalenz chlamydialer Infektionen hin: auf Herdenebene werden 45 bis 100% Seropositivität berichtet, wobei kein Unterschied zwischen zufällig ausgewählten Herden und solchen auf Basis spezifischer Gesundheitsprobleme vorselektierter Herden zu bestehen scheint. Die generell hohe Seroprävalenz hat zu der Annahme geführt, dass Chlamydieninfektionen bei Rindern ubiquitär vorkommen (Kaltenboeck et al., 2005).

Die mit Chlamydieninfektionen assoziierten Krankheitsbilder umfassen primär Fruchtbarkeitsstörungen, entzündliche Reaktionen der Atemwege und Polyarthritiden, auch Keratokonjunktivitiden, Encephalomyelitis und Wachstumsretraktion sind beschrieben (s. Übersicht bei Reinhold et al., 2011). Die Bedeutung von Chlamydieninfektionen erschien lange Zeit fraglich, weil kaum klinische Veränderungen beobachtet werden. In den letzten Jahren wurde aber deutlich, dass Chlamydieninfektionen in Rinderbeständen zwar meist latent und subklinisch verlaufen, aber dabei die Herdengesundheit in durchaus messbarer Weise beeinträchtigen. Die Fähigkeit der Chlamydien verschiedene Organe chronisch zu infizieren sowie ihre ubiquitäre Verteilung erleichtert andauernde, wenn auch geringgradige Infektionen des Euters und des Respirations- und Verdauungstrakts und beeinflusst damit die Milch-, Fruchtbarkeits- und Wachstumsleistung negativ. Die konkreten Auswirkungen solcher subklinischer Infektionen sind nur schwer festzumachen, weil es oftmals keine einfache Ursachen-Wirkungsbeziehung gibt. Oftmals können nur multivariate Ansätze Korrelationen zwischen Infektion und Krankheit bzw. „Störung“ aufdecken (Reinhold et al., 2011).

Chlamydien werden durch direkten oder indirekten Kontakt übertragen, als Hauptübertragungsmedium wird Kot betrachtet. Chlamydien können aber wahrscheinlich auch über vaginale, okulare und nasale Sekrete sowie über uterine Flüssigkeiten, Plazentagewebe, Urin und Sperma ausgeschieden werden. Der fäkal-orale Weg ist als der primäre Übertragungsweg anzusehen, daneben auch die Inhalation kontaminierter Luft (Longbottom & Coulter, 2003). Die venerische Übertragung über Sperma ist auch möglich (Storz et al., 1976; Armin et al., 1999), wohingegen eine vertikale Übertragung *in utero* bislang nicht berichtet wurde.

Weil die Antikörpertiter auch nach klinischer Erkrankung kaum ansteigen, wird davon ausgegangen, dass die dominierende Wirtsantwort auf die Infektion weniger die humorale als die zelluläre Abwehr betrifft (Stephens, 2003). Diese Hypothese wird auch durch den fehlenden Zusammenhang zwischen PCR und Antikörperdaten gestützt (Reinhold et al., 2011). Neben den diagnostischen Problemen im Hinblick auf die Serologie, muss dies auch bei der Konzeption von Strategien zur Kontrolle chlamydialer Infektionen berücksichtigt werden: Die primären Ansatzpunkte sind Herdenmanagement, Antibiose und Impfung. Hinsichtlich des Managements und der Haltung sind verschiedene kritische Punkte identifiziert worden: der Zukauf fremder Tiere in die Herde, das Fehlen von separaten Abkalbeboxen sowie der Gebrauch von Deckbullen bilden Risikofaktoren für Chlamydieninfektionen; in der Haltung sind verschmutzte Liegeboxen und Laufgänge und mangelnde Sauberkeit der Tiere, besonders im Vaginalbereich zu nennen (Kemmerling et al., 2009; Müller & Sauerwein, 2009); bei Kälbern wurden auch erhöhte Belegdichten als Risikofaktor identifiziert (Jee et al., 2004).

Zur Behandlung von Chlamydieninfektionen sind keine speziellen Antibiotika verfügbar, und die Wirksamkeit von Substanzen wie Makroliden, Tetrazyklinen und Quinolonen, die zur Therapie in verschiedenen Spezies getestet wurden, ist Gegenstand aktueller Diskussionen. Für *Chlamydia suis* ist eine genetische Resistenz gegenüber Tetrazyklinen bekannt (Dugan et al., 2004; 2007; Di Francesco et al., 2008). Aufgrund der überwiegend intrazellulär verlaufenden Entwicklung der Chlamydien mit dem Vermögen, in Anwesenheit von Inhibitoren nicht-replizierende und persistierende Formen anzunehmen, die nach Entfernen der Inhibitoren wieder zurück zur infektiösen Form differenzieren, liegt nahe, dass eine Antibiose die Ausbildung von persistenten, latenten Infektionen fördert (s. Übersicht bei Reinhold et al., 2011). Damit erscheint eine Behandlung mit Antibiotika zur Elimination von

Chlamydieninfektionen insgesamt ungeeignet, kann aber in bestimmten Situationen (Stress, nach Besamung) hilfreich sein, um die Infektion zu unterdrücken (Wang et al., 2009).

Nach bisherigen Erfahrungen sind Impfungen gegen Chlamydien beim Rind nicht geeignet, um eine sterile Immunität oder einen 100%-igen Schutz vor der Krankheit zu erzeugen (Stemke-Hale et al., 2005; Wang et al., 2008). Um die Auswirkungen von subklinischen Infektionen auf Herdenproduktionsparameter zu reduzieren und den Antibiotikaeinsatz zu minimieren, kann aber eine Impfung sinnvoll sein: „therapeutische“ Impfungen gegen Chlamydien können beträchtliche Vorteile für Tiergesundheit und Produktion bieten, indem sie die Beeinträchtigung durch Mastitis und reduzierter Fruchtbarkeit mildern (Stemke-Hale et al., 2005; Biesenkamp-Uhe et al., 2007). Zwar sind lebend-inaktivierte Vakzinen gegen *Chlamydia abortus*-verursachte Aborte bei kleinen Wiederkäuern verfügbar, jedoch ist eine nachhaltige Verfügbarkeit von geeigneten Vakzinen im Rinderbereich nicht gegeben und es stehen dazu aufgrund des geringen Interesses seitens der Industrie offenbar auch keine entsprechenden Entwicklungen an. Inwieweit eine unspezifische Stimulation des Immunsystems, z.B. über sogenannte Paraimmunitätsinducer, d.h. nichtimmunsierende, bioregulative Vakzinen, basierend auf Pockenviren zur Unterstützung geeignet sein könnten, ist offen; bei feline Chlamydiosen (eine der Ursachen von „Katzenschnupfen“) werden aus der Praxis derartige Pockeninducer therapieunterstützend empfohlen (s. z.B. http://home.wtal.de/benny/k_chlamydi.htm). Zur prophylaktischen Anwendung gibt es weder für die Pocken-Inducer noch für andere Formen der Immunstimulation Belege zur Wirksamkeit in Hinblick auf Chlamydien-Infektionen und deren Auswirkungen.

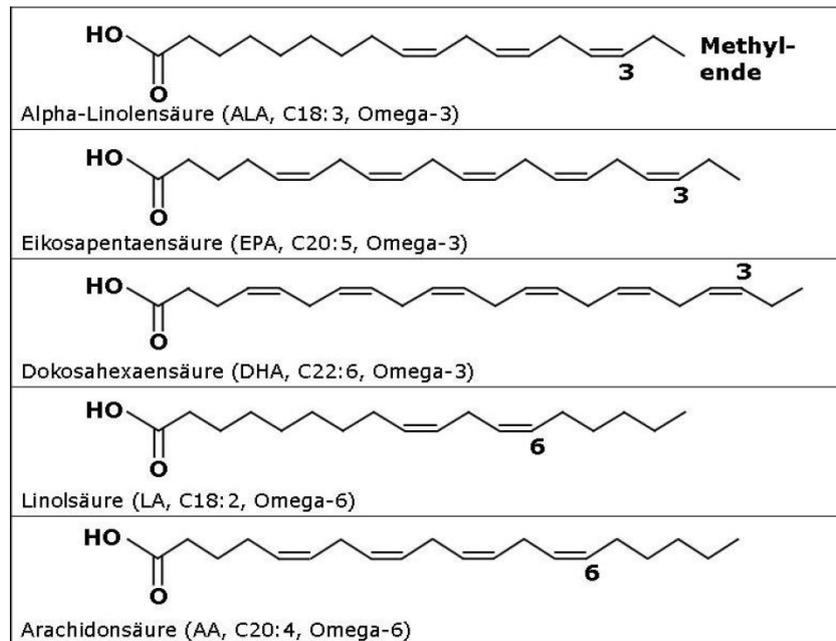
Insgesamt bleiben damit die Möglichkeiten der Kontrolle von Chlamydieninfektionen sehr beschränkt und sind im Wesentlichen in Hygienemaßnahmen in den Bereichen Haltung und Management im Sinne der Prävention und Übertragungsminimierung zu sehen.

1.2 Ungesättigte Fettsäuren als neuer Ansatzpunkt zur Therapie und Prävention von Chlamydieninfektionen

Aufgrund der eingangs beschriebenen weltweiten Infektionslage (ubiquitäres Vorkommen von Chlamydien), der mit der Infektion entstehenden Leistungseinbußen und der limitierten Therapie- und Präventionsmöglichkeiten besteht großes Interesse an einer Verbesserung der Situation. Sowohl im Infektionsschutz als auch bei Reduzierung der durch latente

Chlamydieninfektionen induzierten Beeinträchtigung von Tiergesundheit und -leistung sind unterstützende Maßnahmen interessant. In diesem Zusammenhang werden – wie auch für viele andere Krankheiten – mehrfach ungesättigte Fettsäuren (polyunsaturated fatty acids, PUFA) als aussichtsreiche Kandidaten betrachtet. Strukturelles Charakteristikum von PUFA sind die in der Regel durch eine Methylengruppe getrennten Doppelbindungen in der Acylkette. Je mehr Doppelbindungen sich im Molekül befinden, desto höher ungesättigt ist die Fettsäure, was ihre biochemischen Eigenschaften und damit ihre Funktion im Körper entscheidend beeinflusst. So dienen kurz- und mittelkettige Fettsäuren primär der Energiegewinnung, während längerkettige Fettsäuren verestert in zellulären Membranen strukturgebend sind. Langkettige PUFA übernehmen als Vorläufer bioaktiver Lipidmetabolite (den Eicosanoiden, Abb. 2), die maßgeblich an der Steuerung von Entzündungsprozessen und deren Auflösung beteiligt sind, immunmodulatorische Funktion. Hierbei werden prinzipiell die Omega-3 (auch n-3) von den Omega-6 (n-6) PUFA unterschieden, wobei der Begriff die Lage der ersten Doppelbindung vom Methylende aus gezählt bezeichnet (Abb. 1; daneben gibt es die „Delta“ Nomenklatur, die sich auf das Carboxylende bezieht).

Es besteht ein vielschichtiges Wechselspiel zwischen den n-6- (z.B. Linolsäure, Arachidonsäure) und den n-3-Verbindungen (z.B. α -Linolensäure, Eicosapentaensäure). Erstere scheinen für eine effektive Entwicklung des Immunsystems bei Neugeborenen wesentlich zu sein, werden jedoch, bei überhöhter Aufnahme durch die Nahrung, auch mit der Entstehung von Allergien in Verbindung gebracht (Sausenthaler et al., 2006; Bolte et al., 2005; Harbige, 2003). Demgegenüber wurden n-3-PUFA bereits mit vielversprechenden Ergebnissen in klinischen Studien zur Linderung von Autoimmunerkrankungen eingesetzt (Das, 2000; Tulleken et al., 1990).



<http://www.eufic.org/upl/1/default/img/Omega%20fatty%20acids%20DE.jpg>

Abbildung 1: Strukturbeispiele einiger n-3 und n-6-Fettsäuren

Die Eicosanoidvorläufer Eicosapentaensäure und Arachidonsäure können endogen in einer hochentwickelten Kaskade aus Desaturations- (Einfügen von Doppelbindungen) und Elongationsschritten (Kettenverlängerung) aus den essentiellen Fettsäuren α -Linolensäure bzw. Linolsäure biosynthetisiert werden, wobei die n-3 und n-6-Fettsäuren dabei um die gleichen Enzyme konkurrieren (Abbildung 2).

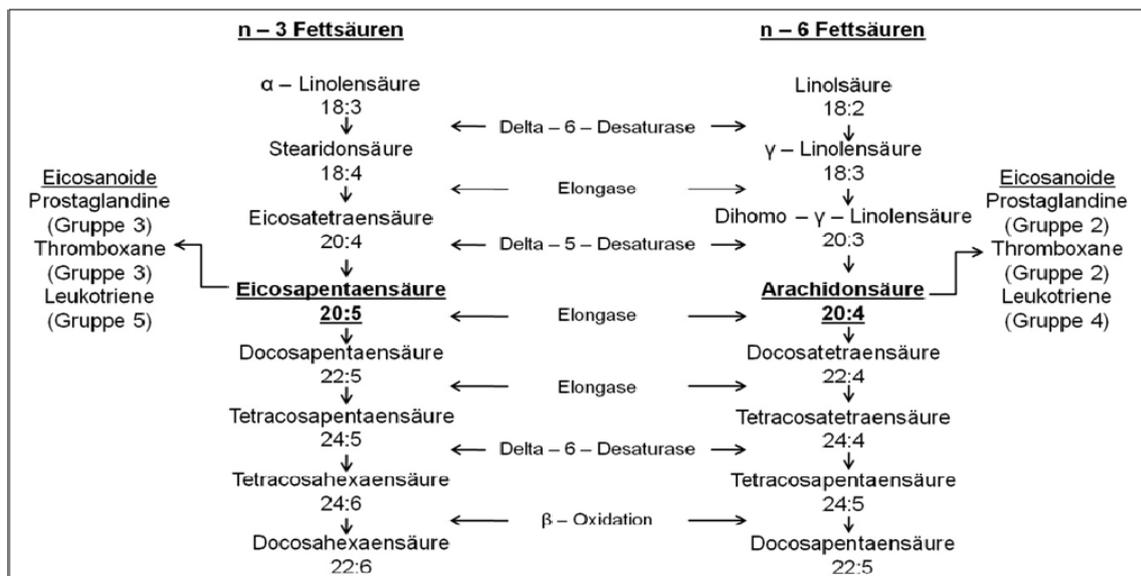


Abbildung 2: Biosynthese der n-3 und n-6 Fettsäuren (modifiziert nach Schmitz & Ecker, 2008)

Die aus n-3 Fettsäuren katalysierten Eicosanoide zeigen insgesamt eher antiinflammatorische, vasodilatatorische und antithrombogene Wirkungen; die aus n-6 Fettsäuren katalysierten Eicosanoide hingegen sind eher proinflammatorisch und zeigen gerinnungsfördernde und vasokonstriktorische Wirkungen (Horton et al., 2008).

Eine weitere PUFA-Familie mit immunmodulatorischen Eigenschaften sind die konjugierten Linolsäuren (engl. *conjugated linoleic acids* oder abgekürzt **CLA**). Unter dem Akronym CLA wird eine Gruppe von Octadecadiensäuren (C18:2) zusammengefasst, deren Doppelbindungen in konjugierter Form vorliegen. Bis heute sind 8 Positionsisomeren mit Doppelbindungen an den Positionen 6/8, 7/9, 8/10, 9/11, 10/12, 11/13, 12/14 oder 13/15 identifiziert worden (Delmonte et al., 2005). Da sich die Konjugation theoretisch an den Positionen 2/4 bis 15/17 befinden kann und für jede Doppelbindung *c*- (*cis*-, *Z*-) und *t*- (*trans*-, *E*-) Konfiguration möglich ist, sind 56 geometrische und Positionsisomeren denkbar. CLA entstehen natürlicherweise als Intermediate bei der Biohydrierung von (primär) Linolsäure unter dem Einfluss spezifischer Mikroorganismen (*Butyrivibrio fibrisolvens*; Polan et al., 1964) im Pansen von Wiederkäuern. Das gebildete Hauptisomere ist *c*9,*t*11-CLA. Reduktion liefert die *t*11-Octadecensäure (Vaccensäure, C18:1*t*11), die ins Gewebe und milchbildende Drüsen transportiert und dort erneut via delta-9-Desaturierung in *c*9,*t*11-CLA umgewandelt werden kann. Da die CLA-Synthese hauptsächlich endogen vonstattengeht (Corl et al., 2001; Piperova et al., 2002), ist *c*9,*t*11-CLA das dominierende natürlich vorkommende CLA-Isomere in Milch, Milchprodukten und Wiederkäuerfleisch. Heute werden vorwiegend chemisch hergestellte CLA-Präparate zu Forschungszwecken eingesetzt. Die industrielle Herstellung von CLA ist allerdings weitgehend auf die Positionsisomeren 9,11 und 10,12 (Abbildung 3) beschränkt, so auch die wissenschaftlichen Berichte über die Wirkungen von CLA (<http://fri.wisc.edu/cla.php>). Zahlreiche *in-vitro* und *in-vivo* Studien zum selektiven Effekt von *c*9,*t*11-CLA deuten auf ein entzündungshemmendes Potential dieser Fettsäure z.B. im Hinblick auf asthmatische Erkrankungen (Jaudszus et al., 2005 und 2008; Turpeinen et al., 2008), Arteriosklerose (Valeille et al., 2006; Tholstrup et al., 2008) oder Diabetes (Moloney et al., 2007) hin.

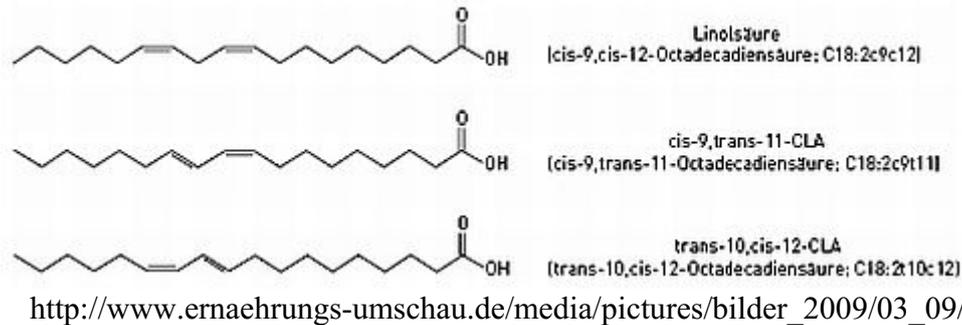


Abbildung 3: Struktur von Linolsäure und der beiden häufigsten CLA-Isomere

Einer der zahlreichen beschriebenen Effekte nach Gabe von Präparaten, die hauptanteilig das *t10,c12*-Isomere enthalten, ist die Depression der Milchfettsynthese laktierender Kühe (Baumgard et al., 2002; Peterson et al., 2003). Ziel der Gabe solcher *t10,c12*-CLA-haltiger Supplemente in der Milchviehfütterung ist die Verbesserung der Stoffwechselsituation in den ersten Wochen nach der Kalbung, weil in dieser Phase die Futterraufnahme in der Regel nicht den Energiebedarf für Erhaltung und Leistung deckt; in der Folge der entstehenden negativen Energiebilanz kann es zu exzessiver Fettmobilisation kommen und dies gilt wiederum als prädisponierend für verschiedene Stoffwechselkrankheiten aber auch wegen der damit einhergehenden Immunsuppression für Infektionskrankheiten. Das als Supplement zugelassene Präparat Lutrell (BASF) ist so formuliert, dass ein vorschneller Abbau im Pansen reduziert werden soll. Allerdings wurden in einigen (Human-)Studien, in denen die Sicherheitsaspekte einer Supplementation mit solchen CLA-Isomerengemischen beleuchtet wurden, bedenkliche metabolische Wirkungen offenbar, z.B. eine gesteigerte Insulinresistenz (Risérus et al., 2002a) verbunden mit erhöhtem oxidativen Stress und Entzündungsbiomarkern (Risérus et al., 2002b; Tholstrup et al., 2008). Proinflammatorische und prodiabetische Effekte, die eindeutig mit dem *t10,c12*-CLA-Isomeren in Verbindung gebracht werden konnten, wurden bereits in Tierstudien beschrieben und waren eng assoziiert mit einem lipodystrophischen Phänotyp (Tsuboyama-Kasaoka et al., 2000; Clément et al., 2002; Kelley et al., 2004; Poirier et al., 2006).

Als Effektormechanismen für die immunmodulatorischen Wirkungen von PUFA werden vorrangig unterschiedliche Wirkungen auf den Eicosanoidstoffwechsel und das Prostaglandin- und Leukotrienprofil von Körperzellen, die Beeinflussung verschiedener Transkriptionsfaktoren (z.B. der PPAR-Familie) und eine veränderte Fluidität der Zellmembran angesehen (Fan et al. 2004, Kinsella et al. 1990, Schmitz & Ecker 2008). CLA

sind Inhibitoren der Cyclooxygenasen (COX), der Schlüsselenzyme der Prostaglandinsynthese (Bulgarella et al. 2001, Yu et al. 2002, Ringseis et al. 2006). Darüber hinaus aktivieren CLA PPAR-Transkriptionsfaktoren (Belury et al. 2002) und könnten so die Expression mehrerer Proteine herabregulieren, darunter Cyclin D und IGF-Rezeptor 1 (Kemp et al. 2003, Cho et al. 2003). Diese Proteine sind für das Eindringen von Chlamydien in die Wirtszelle relevant, so vermindert z.B. eine Blockade der COX-2 und die dadurch verursachten niedrigeren Prostaglandin E₂-Spiegel eine Chlamydieninfektion *in vivo* (Liu et al. 2006). Chlamydien bewirken die vermehrte Bildung von Cyclin D (Mannonen et al. 2007), das Eindringen der Bakterien in die Wirtszelle erfordert den IGF-Rezeptor 2 (Puolakkainen et al. 2005).

Generell erscheinen im Hinblick auf Prävention und Metaphylaxe von durch Chlamydieninfektionen ausgelösten Gesundheitsstörungen und Leistungseinbußen primär die zelluläre Abwehr betreffenden Aspekte der PUFA und CLA interessant: Wie eingangs erwähnt, steigen die Antikörpertiter auch nach klinischer Erkrankung kaum an, weshalb die dominierende Wirtsantwort auf die Infektion offenbar weniger die humorale als die zelluläre Abwehr betrifft (Stephens, 2003). Dies wird auch durch den fehlenden Zusammenhang zwischen PCR und Antikörperdaten gestützt (Reinhold et al., 2011). Ausgehend von den oben dargestellten Daten waren die Ziele des Vorhabens:

1. die potenzielle antichlamydiale Wirkung verschiedener ungesättigter Fettsäuren im Zellkulturmodell quantitativ zu erfassen,
2. grundlegende Mechanismen herauszuarbeiten, deren Kenntnis eine gezielte weitere Optimierung der eingesetzten Fettsäuren erlaubt und
3. die prinzipielle Eignung der Fettsäuren als Nahrungs- und Futtermittelzusatz zu überprüfen.

2 Untersuchung der antichlamydiale Wirkung von verschiedenen PUFA und CLA im Zellkulturmodell

Der im ursprünglichen Projektantrag vorgesehenen Versuchsplan beinhaltete ein Screening von acht verschiedenen Fettsäuren (α -Linolensäure (C18:3n-3), γ -Linolensäure (C18:3n-6), Linolsäure (C18:2n-6), *c*9,*t*11-CLA, *t*10,*c*12-CLA, Ölsäure (C18:1n-9), Arachidonsäure (C20:4n-6), Eicosapentaensäure (C20:5n-3) und Docosahexaensäure (C22:6n-3) mit drei

verschiedenen Chlamydienstämmen (*C. trachomatis* DC10, *Cp. pneumoniae* DC40, *Cp. psittaci* DC15) an zwei verschiedenen humanen Zelllinien [Hela (Zervixepithel) und A549 (Lungenepithel)]. Die geplanten mechanistischen Studien zum Wirkungsmechanismus, in denen die mRNA Expression von Komponenten des Eicosanoidstoffwechsels, einzelner Oberflächenmoleküle der Zelle und von Transkriptionsfaktoren (PPAR, NFκB) gemessen werden sollte, wurden wie im Zwischenbericht dargelegt, nicht verfolgt, sondern es wurde das Spektrum der Zelllinien aufgrund des unmittelbaren Bezugs zur Milchwirtschaft um eine bovine Linie (EBL, Lungenepithel) erweitert. Hinsichtlich der getesteten Chlamydienstämme wurde der Schwerpunkt auf *C. psittaci* gelegt, weil dies aus der geplanten Auswahl der einzige Stamm mit Relevanz ist; in einer vorausgegangenen Studie zur Prävalenz von Chlamydieninfektionen in Milchviehbeständen in Nordrhein Westfalen haben wir *C. pecorum*, *C. abortus* und *C. psittaci* identifiziert (Kemmerling et al., 2009). Zudem wurde das dritte Ziel, die prinzipielle Eignung der Fettsäuren als Futtermittelzusatz zu prüfen, auf die CLA-Wirkungen fokussiert und dementsprechend das Isomerengemisch, das in dem kommerziell erhältlichen CLA-Supplement enthalten ist, in verschiedenen Kombinationen in der Zellkultur getestet. Die beschriebenen Änderungen im Versuchsplan erklären sich aus dem damit direkteren Bezug zur Zielspezies Rind sowie der praxisrelevant möglichen Supplementierungen.

2.1 Versuchsplan und methodische Ergebnisse

Abbildung 4 zeigt eine grafische Zusammenfassung des Versuchsplans. Vor der eigentlichen Durchführung der Zell-Infektionsversuche mit den einzelnen Fettsäurezusätzen waren jedoch noch umfangreiche Optimierungs- und Validierungsarbeiten nötig:

2.1.1 Optimale Einsaatdichte

Zunächst war die optimale Einsaatdichte für die einzelnen Zelllinien zu bestimmen. Es sollte einerseits gewährleistet sein, dass die Zellen während der Präinfektionsphase (0-24 h) eine hinreichende Dichte erlangen, andererseits aber ausgeschlossen werden, dass die Vitalität über die Infektionsphase (24-72 h) durch zu dichten Bewuchs sinkt. Es wurden jeweils 1, 1,5 und 2×10^5 Zellen pro mL verglichen, die optimalen Ergebnisse wurden bei allen Zelllinien mit $1,5 \times 10^5$ Zellen pro mL erzielt, weshalb diese Dichte in allen Folgeversuchen zugrunde gelegt wurde.

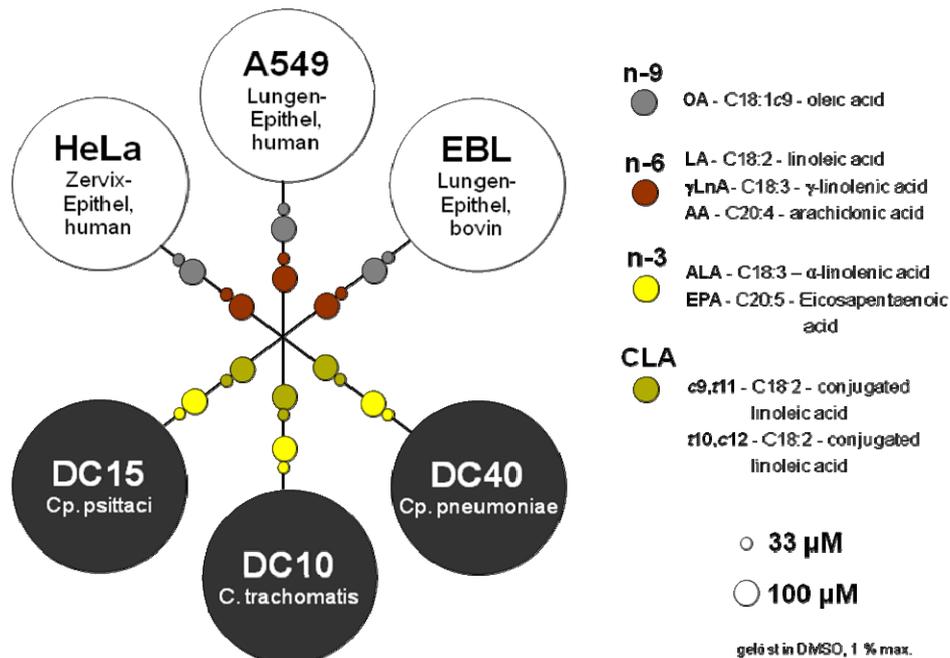


Abbildung 4: Grafische Darstellung des Versuchsdesigns zur Untersuchung der potentiellen, antichlamydialen Wirkung von verschiedenen Fettsäuren. Die drei untersuchten Wirtszelllinien sind als weiße Kreise in der oberen Bildhälfte symbolisiert (HeLa, A549 und EBL), die untersuchten Chlamydienstämme als schwarze Kreise in der unteren Bildhälfte (*C. trachomatis* DC10, *Cp. pneumoniae* DC40, *Cp. psittaci* DC15). Es sollte jede Zelllinie mit jedem Chlamydienstamm getestet werden (= Verbindungslinien zwischen den weißen und den schwarzen Kreisen) und dabei die einzelnen Fettsäuren in jeweils zwei verschiedenen Dosierungen (33 und 100 µM) untersucht werden. Die gewählten Fettsäurendosierungen sollten wiederum in sechs verschiedenen Ansätzen geprüft werden: Die Zelllinien und/oder die Chlamydiernstämme wurden jeweils separat mit oder ohne den Fettsäurezusatz vorinkubiert (24 h) und dann mit oder ohne Fettsäurezusatz für weitere 48 h kokultiviert.

2.1.2 Optimale Infektionsdosis

Auch für die Chlamydien, die in den Versuchen zur Infektion der Zelllinien eingesetzt wurden, war die entsprechend optimale Infektionsdosis zu finden. Zu geringe Infektionsraten sind schlecht quantifizierbar, bei zu hohen Raten gerät das System in eine Sättigung und lässt keine Zusammenhänge mehr zwischen Dosis und Wirkung erkennen. Der Anteil infizierter Zellen wurde durchflusszytometrisch (FACS-Analyse) bestimmt (Grün et al., 2009); zusätzlich wurden Fluoreszenz-mikroskopische Aufnahmen der Zellkulturen erstellt; dabei sind die Chlamydien wie in der FACS-Analyse durch Fluorochrom-gekoppelte Antikörper markiert und werden als leuchtende Punkte auf dem gegengefärbten Zellrasen sichtbar. Exemplarisch an den HeLa-Zellen getestet zeigte sich, dass beim Einsatz von 4 cfu/Zelle nach 48 h post infectionem (p.i.) etwa 30 % der Zellen infiziert waren. Diese 30 % waren gut reproduzierbar, weshalb diese Infektionsdosis durchgängig verwendet wurde.

2.1.3 Toxizitätstest

Für die Infektionsversuche in Gegenwart der einzelnen Fettsäuren musste vorab sichergestellt werden, dass die Fettsäuren nicht als solche toxisch auf die Zellen wirken. Dazu wurden die Zelllinien mit jeweils 100 μM (höchste eingesetzte Konzentration) der einzelnen zu testenden Fettsäuren über insgesamt 72 h (der Gesamtversuchsdauer entsprechend) inkubiert und Zellzahl und Vitalität (Propidiumiodidfärbung) in Vergleich zu unbehandelten, bzw. nur mit Lösungsmittel (DMSO) behandelten Kontrollen gesetzt: es zeigte sich für keine der einzelnen acht Fettsäuren eine Beeinflussung von Vitalität und Zellwachstum bei den Zelllinien. Abbildung 5 zeigt beispielhaft die Daten für die HeLa-Zelllinie.

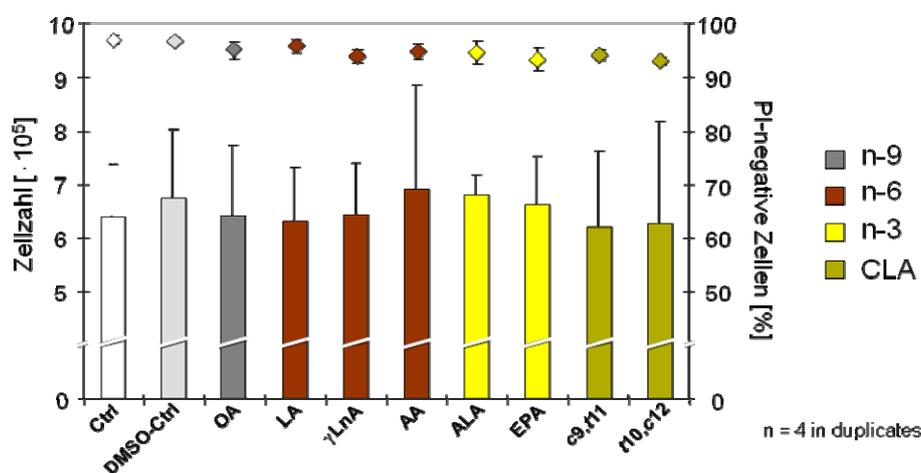


Abbildung 5: Wachstum (Balken, linke Achse) und Vitalität (Rhomben, rechte Achse) von HeLa-Zellen in Gegenwart von verschiedenen Fettsäuren im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen (Ctrl) und nur mit Lösungsmittel (DMSO-Ctrl) behandelten Kontrollen (Mittelwerte \pm SD). PI-negative Zellen: nicht mit Propidium-Iodid gefärbte Zellen, d.h. lebende Zellen. Nomenklatur der Fettsäuren s. Legende zu Abbildung. 4.

2.1.4 Metabolismus der Fettsäuren

Um eine Kausalität zwischen der jeweils getesteten Fettsäure und den (potentiellen) Effekten auf die Infektiosität der Chlamydien sichern zu können, musste vorab auch geklärt werden, ob die Fettsäuren in die Zellen überhaupt aufgenommen werden und dort möglicherweise verstoffwechselt werden. Nur mit Nachweis der Ausgangssubstanz als solcher in der Zelle ist auch von einer Wirkung auszugehen. Zur Analyse des Einbaus der Fettsäuren in die Zellen wurden die Gesamt-Lipide aus den Zellen extrahiert, die Fettsäuren methyliert und die resultierenden FAME (fatty acid methyl ester) gaschromatographisch gemessen (Abbildung 6). Im Medium zeigte sich auch ohne Fettsäurezusatz ein relativ hoher Ölsäureanteil, da das Medium bereits Ölsäure in relevanten Konzentrationen enthält. Für alle Fettsäuren konnte deren proportionaler Einbau in die Lipidfraktion der Zelllinien gezeigt werden, wobei nach 24

h die jeweils höchsten Werte erreicht wurden. Mit den gemessenen Konzentrationen können mögliche Effekte der Fettsäuren in den Zellen später korreliert werden.

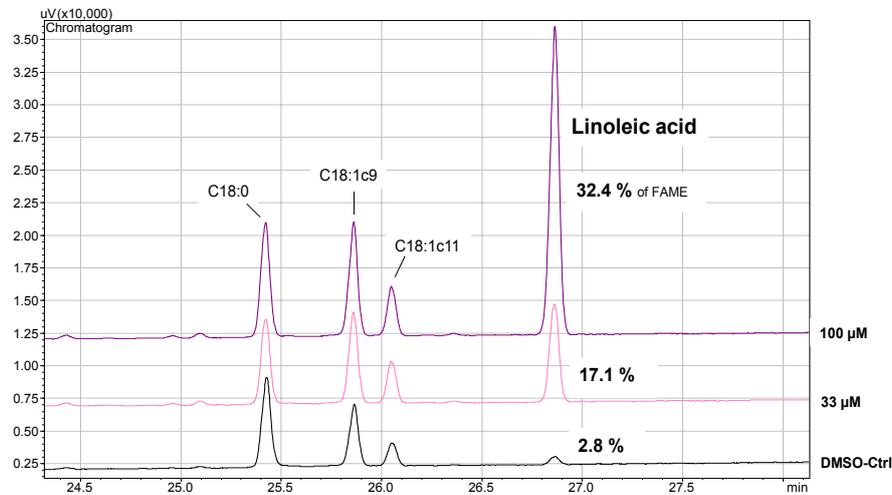


Abbildung 6: Partielles Chromatogramm der zellulären Lipidextrakte aus HeLa nach 24 h Inkubation mit 33 µM oder 100 µM Linolsäure (beispielhaft) im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Die Analyse erfolgte mittels GC-FID-Technik.

Bei detaillierter Betrachtung des Fettsäuremetabolismus in den verwendeten humanen Zelllinien fiel zudem auf, dass die durch das Enzym FADS2 (fatty acid desaturase-2) katalysierte Metabolisierung von Linolsäure nur in A549-Zellen, nicht aber in HeLa-Zellen erfolgte. Wird die Fettsäure, die der FADS2 nachgeschaltet ist, als Substrat zugegeben, entstehen auch in den HeLa-Zellen alle Folgeprodukte bis zum nächsten Schritt, für den die FADS2 benötigt wird. Das gleiche gilt für die n3-Fettsäuren, die auf dasselbe Enzymsystem zurückgreifen. Diese Befunde deuten auf einen Gendefekt in dieser Zelllinie und konnten mittels mRNA-Expression auch bestätigt werden; ein entsprechendes Manuskript zur Publikation ist in Vorbereitung.

3 Wirksamkeit einzelner Fettsäuren in Hinblick auf die Chlamydieninfektionsrate

3.1 Wirksamkeit in humanen Zervixepithelzellen (HeLa-Zellen)

In Zusammenfassung der Ergebnisse konnten für zwei der untersuchten Fettsäuren Veränderungen der Chlamydien-Infektionsrate festgestellt werden. In Abbildung 7 sind die Ergebnisse beispielhaft für die mit *C. psittaci* infizierten HeLa-Zellen für alle getesteten Fettsäuren im Einzelnen gezeigt. Für Arachidonsäure sowie für *c9,t11*-CLA wurden die

Infektionsrate senkende Effekte beobachtet, wenn sowohl die Zellen als auch die Chlamydien für 24 h mit den Fettsäuren vorinkubiert wurden: in Gegenwart von Arachidonsäure sank die Anzahl infizierter Zellen konzentrationsabhängig auf rund 60% der infizierten aber nicht mit den Fettsäuren behandelten Kontrolle. Bei 33 μM *c9,t11*-CLA war eine Reduktion der Infektionsraten auf rund 70% der Ausgangswerte zu sehen, die sich mit 100 μM nicht weiter steigern ließ.

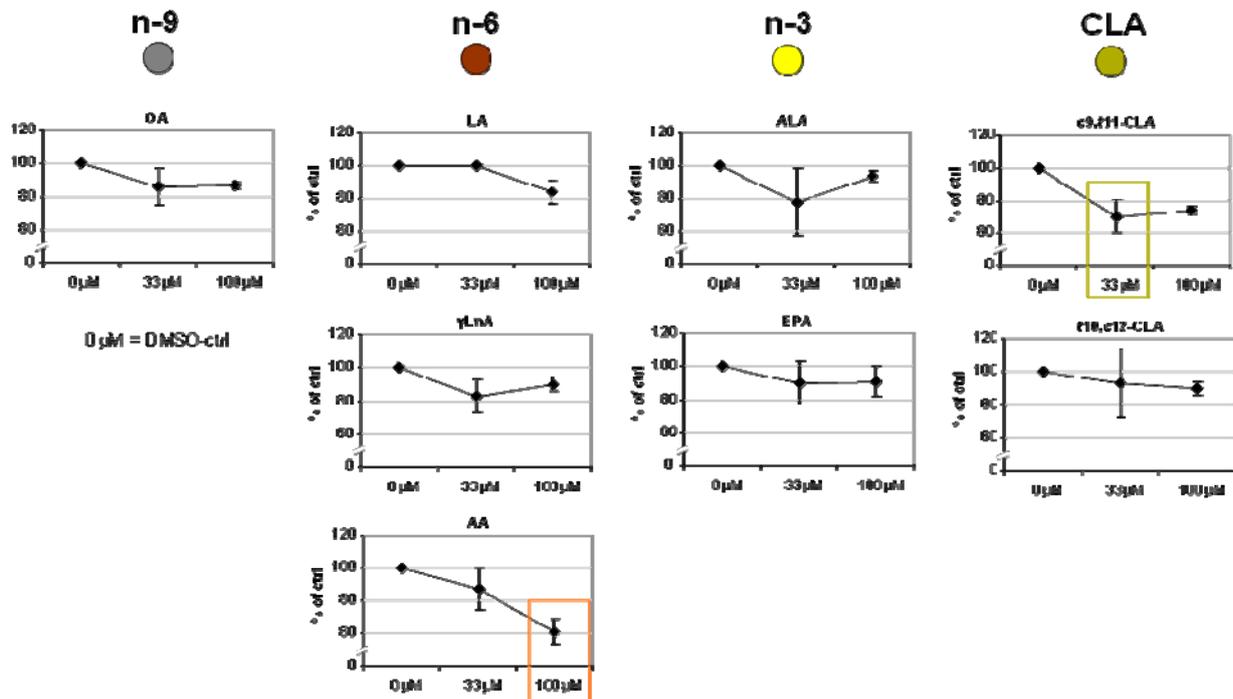


Abbildung 7: Infektionsrate (Mittelwerte \pm SD) von HeLa-Zellen (1.5×10^5 Zellen/mL, 72 h Inkubation) mit Chlamydien (*C. psittaci* DC15, MOI 4) in Gegenwart verschiedener Fettsäuren in zwei unterschiedlichen Dosierungen (33 und 100 μM). Die Infektionsraten sind als Prozentwert der Kontrollen (ohne Fettsäurezusatz, = 100%) dargestellt. Abkürzungen der einzelnen Fettsäuren: OA = C18:1c9 - Ölsäure, LA = C18:2 - Linolsäure, γ -LnA = C18:3 - γ -Linolensäure, AA = C20:4 - Arachidonsäure, ALA = C18:3 - α -Linolensäure, EPA = C20:5 - Eicosapentaensäure, *c9,t11*-CLA = C18:2 - *cis*-9,*trans*-11-CLA, *t10,c12*-CLA = C18:2 - *trans*-10, *cis*-12-CLA; CLA = Konjugierte Linolsäure

Der hemmende Effekt, der für *c9,t11*-CLA gesehen wurde, wenn die HeLa, nicht aber die Chlamydien, mit 33 μM der Fettsäure für 24 h vor der Infektion und über die Infektionsdauer behandelt wurden (Abbildung 8 A, links), konnte auf das Doppelte erhöht werden, wenn zusätzlich zu den HeLa auch die Chlamydien vorinkubiert wurden, ehe sie zu den Zellen gegeben wurden (Abbildung 8 A, rechts). D.h., dass *c9,t11*-CLA in den Chlamydien per se eine hemmende Wirkung zeigte. Durch Konzentrationserhöhung auf 100 μM wurde keine weitere Reduktion erzielt (Abbildung 8 B). Ähnlich verhielt es sich mit Arachidonsäure, nur dass hier der deutlichste Effekt erst bei 100 μM erreicht wurde (Abbildung 8 B).

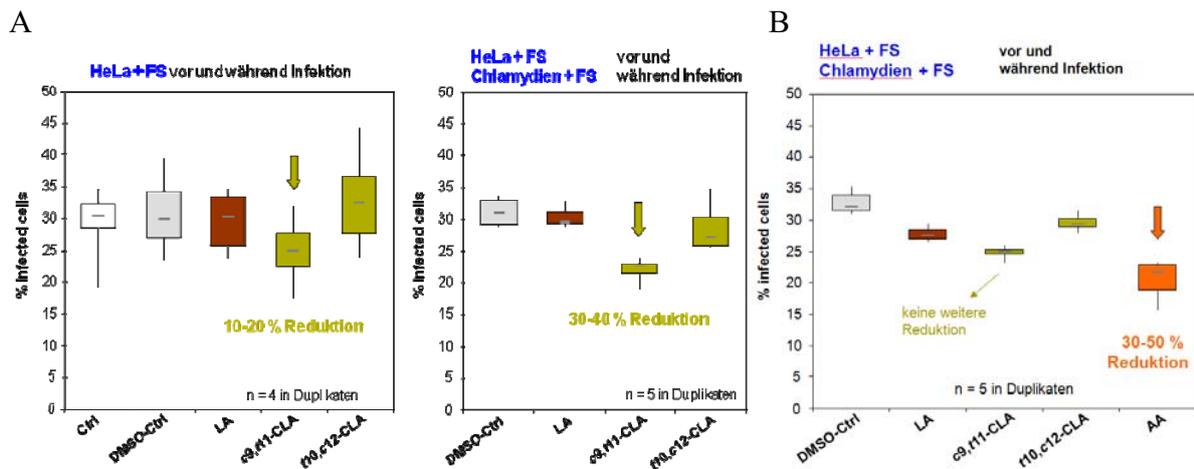


Abbildung 8: Infektionsrate (Mittelwerte \pm SD) von HeLa-Zellen (1.5×10^5 Zellen/mL, 72 h Inkubation) mit Chlamydien (*C. psittaci* DC15, MOI 4) in Gegenwart verschiedener Fettsäuren (A: 33 μ M; B: 100 μ M). Abkürzungen: FS = Fettsäure, Ctrl = Kontrolle, DMSO-Ctrl = Lösungsmittelkontrolle, LA = C18:2 -Linolsäure, c9,t11-CLA = C18:2 - cis-9,trans-11-CLA, t10,c12-CLA = C18:2 - trans-10, cis-12-CLA; CLA = Konjugierte Linolsäure

3.2 Wirksamkeit in humanen Lungenepithelzellen (A549-Zellen)

In Zusammenfassung der Ergebnisse für diese Zelllinie konnten ebenfalls für zwei Fettsäuren infektions-reduzierende Effekte beobachtet werden: wie bei den HeLa-Zellen erwiesen sich auch hier Arachidonsäure und c9,t11-CLA als die wirksamsten Komponenten (Abbildung 9). Mit 100 mM Arachidonsäure sank die Anzahl infizierter Zellen auf rund 70% der Werte, die ohne Fettsäurezusatz vorlagen. Bei c9,t11-CLA war nur bei 33 μ M eine Reduktion zu sehen, wohingegen sich die Werte bei 100 μ M nicht von den unbehandelten Kontrollen unterschieden. Der Vergleich der Effekte in den unterschiedlichen Versuchsansätzen (nur Chlamydien, oder nur Zelllinie mit Fettsäuren vorinkubiert, ergab auch hier für die kombinierte Behandlung die relativ stärkste Wirkung der beiden Fettsäuren. Um zu erfassen, wie stark der Fettsäureneffekt auf die Chlamydien ist, wurden nur sie, nicht aber die Zellen vorinkubiert und es erfolgte keine weitere Fettsäurenbehandlung während der Infektion. In diesem Ansatz sanken die Infektionsraten um 12% in Gegenwart von c9,t11-CLA und um 16% in Gegenwart von Arachidonsäure (Abbildung 10).

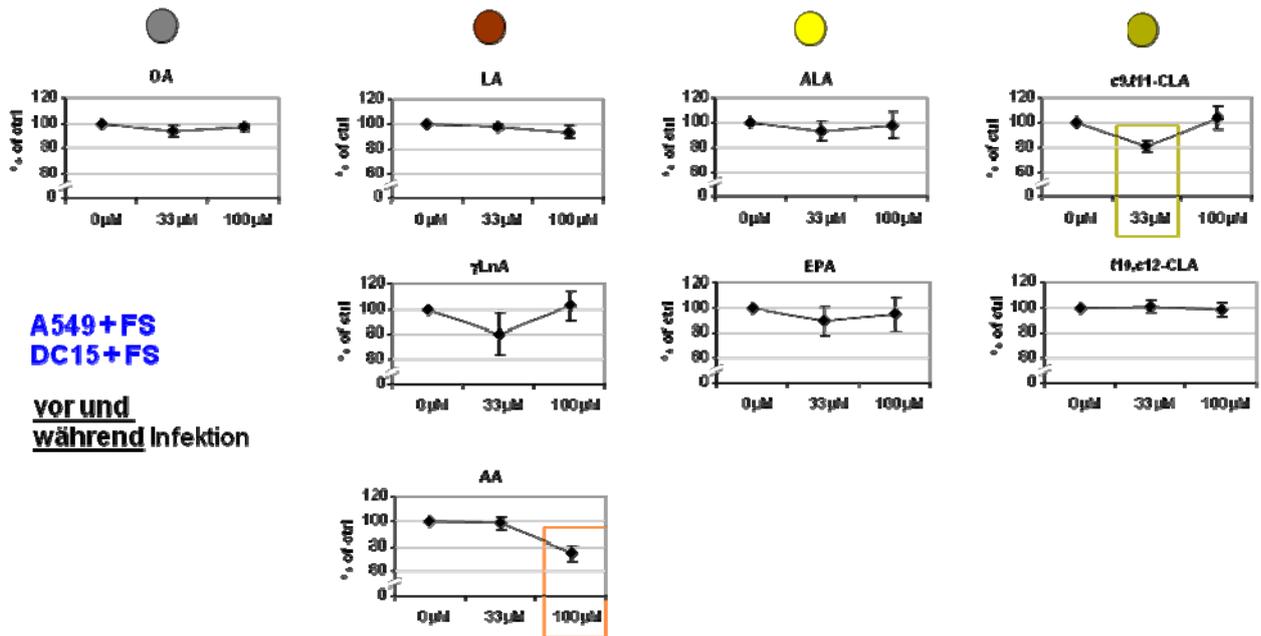


Abbildung 9: Infektionsrate (Mittelwerte \pm SD) von A549-Zellen (1.5×10^5 Zellen/mL, 72 h Inkubation) mit Chlamydien (*C. psittaci* DC15, MOI 4) in Gegenwart verschiedener Fettsäuren in zwei unterschiedlichen Dosierungen (33 und 100 μ M). Die Infektionsraten sind als Prozentwert der Kontrollen (ohne Fettsäurezusatz, = 100%) dargestellt. Abkürzungen der einzelnen Fettsäuren: OA = C18:1c9 - Ölsäure, LA = C18:2 - Linolsäure, γ -LnA = C18:3 - Linolensäure, AA = C20:4 - Arachidonsäure, ALA = C18:3 - α -Linolensäure, EPA = C20:5 - Eicosapentaensäure, c9,t11-CLA = C18:2 - *cis*-9,*trans*-11-CLA, t10,c12-CLA = C18:2 - *trans*-10, *cis*-12-CLA; CLA = Konjugierte Linolsäure

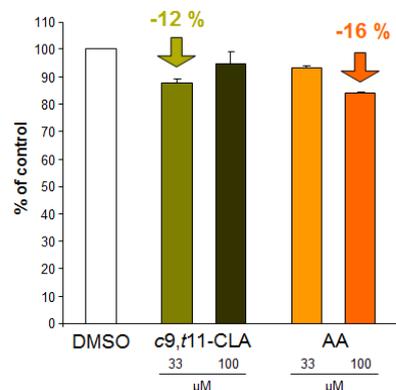


Abbildung 10: Infektionsrate (Mittelwerte \pm SD) von A549-Zellen (1.5×10^5 Zellen/mL, 72 h Inkubation) mit Chlamydien (*C. psittaci* DC15, MOI 4). Es wurden nur die Chlamydien mit c9,t11-CLA oder AA in zwei unterschiedlichen Dosierungen (33 und 100 μ M). Die Infektionsraten sind als Prozentwert der Kontrollen (ohne Fettsäurezusatz, = 100%) dargestellt. Abkürzungen der einzelnen Fettsäuren: AA = C20:4 - Arachidonsäure, c9,t11-CLA = C18:2 - *cis*-9,*trans*-11-CLA, CLA = Konjugierte Linolsäure

3.3 Wirksamkeit in bovinen Lungeneithelzellen (EBL-Zellen)

Die auf HeLa- und A549-Zellen im Sinne des Infektionsschutzes als wirksam identifizierten Fettsäuren (Arachidonsäure und *c9,t11*-CLA) erwiesen sich auch auf den bovinen Zellen als effektiv: Mit 100 μM Arachidonsäure wurden 42% weniger infizierte Zellen erreicht, mit 33 μM des CLA-Isomers knapp 30% weniger (Abbildung 11).

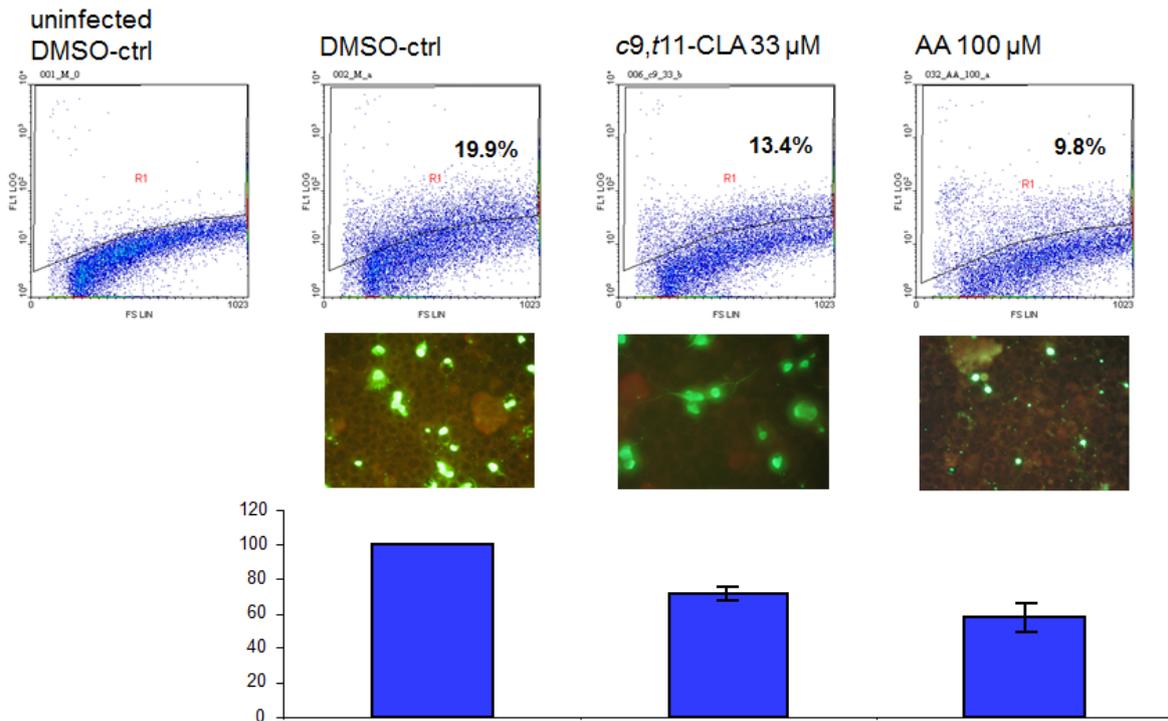


Abbildung 11: Durchflusszytometrischer (obere Bild-Serie) und fluoreszenzmikroskopischer Nachweis (mittlere Bilderserie) der Infektionsrate (untere Grafik; Mittelwerte \pm SD) von EBL-Zellen (1.5×10^5 Zellen/mL, 72 h Inkubation) mit Chlamydien (*C. psittaci* DC15, MOI 4) in Abwesenheit oder Gegenwart von 100 μM Arachidonsäure (AA) bzw. *c9,t11*-CLA. Die in den oberen Durchflusszytogrammen genannten Prozentwerte geben den Anteil insgesamt infizierter Zellen wider.

4 Wirksamkeit von CLA-Isomergemischen auf die Chlamydieninfektionsrate

Bei der Austestung einzelner Fettsäuren hatte sich das *c9,t11*-CLA-Isomere als wirksam in allen drei untersuchten Zelllinien erwiesen. Dies ist im Hinblick auf die Praxis der Milchviehhaltung besonders bemerkenswert: CLA hat beim Wiederkäuer physiologisch gesehen aufgrund der Synthese im Pansen bzw. der endogenen Synthese in peripheren Geweben aus Vaccensäure (s.o.) besondere Bedeutung; zudem finden CLA-Supplemente

auch bereits in der Milchviehfütterung Verwendung. Vor diesem Hintergrund wurde der Versuchsplan insoweit verändert als dass zusätzlich verschiedene Kombinationen der CLA-Hauptisomere getestet wurden. Dabei wurde zum einen das Mischungsverhältnis der CLA-Isomere in synthetischen, kommerziell verfügbaren Supplementen untersucht; dabei liegen das *c9,t11*-CLA-Isomer und das *t10,c12*-CLA-Isomer im Verhältnis 1:1 vor. Zum anderen wurde ein den intermediären Verhältnissen nach CLA-Supplementation nahekommendes Gemisch von 80% *c9,t11*-CLA und 20% *t10,c12*-CLA untersucht. Diese Kombinationen wurden aus zeitlich/technischen Gründen ausschließlich anhand der Fluoreszenzmikroskopie untersucht.

4.1 Wirksamkeit der kombinierten CLA-Isomere in humanen Zervixepithelzellen (HeLa-Zellen)

Bei Einsatz beider Isomere ergaben sich überraschenderweise für keines der getesteten infektionsreduzierende Effekte – im Gegenteil schien die Anfälligkeit der Wirtszellen gegenüber der Chlamydieninfektion erhöht zu sein (Abbildung 12).

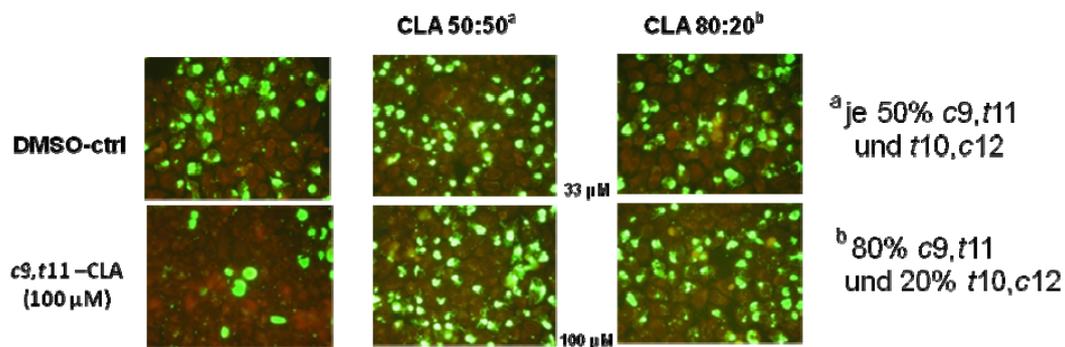


Abbildung 12: Fluoreszenz-Mikrographie von HeLa-Zellen (1.5×10^5 Zellen/mL, 72 h Inkubation) mit Chlamydien (*C. psittaci* DC15, MOI 4) in Gegenwart von *c9,t11*-CLA (Bild links unten) oder verschiedenen Kombinationen von *c9,t11*- und *t10,c12*-CLA in zwei verschiedenen Dosierungen (33 und 100 μ M) infiziert. Die nur mit Lösungsmittel (DMSO) behandelte Kontrolle ist oben links im Bild gezeigt.

4.2 Wirksamkeit der kombinierten CLA-Isomere in humanen Lungeneithelzellen (A549-Zellen)

In den A549-Zellen bestätigte sich, dass die CLA-Isomerengemische die Infektionsrate eher steigern (Abbildung 13).

4.3 Wirksamkeit der kombinierten CLA-Isomere in bovinen Lungeneithelzellen (EBL)

Auch in der bovinen Zelllinie ergaben sich analoge Befunde: in Gegenwart der CLA-Isomerengemische waren die Infektionsraten augenscheinlich erhöht, wobei die 1 :1 Mischung in 33 μ M aber keine gegenüber der Lösungsmittel-Kontrolle erhöhte Infektionsrate erkennen lässt (Abbildung 14).

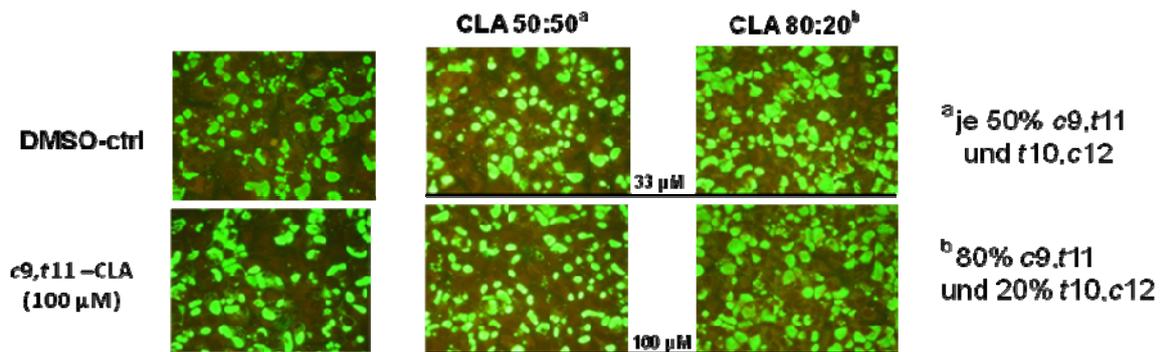


Abbildung 13: Fluoreszenz-Mikrographie von A549-Zellen (1.5×10^5 Zellen/mL, 72 h Inkubation) mit Chlamydien (*C. psittaci* DC15, MOI 4) in Gegenwart von *c9,t11*-CLA (Bild links unten) oder verschiedenen Kombinationen von *c9,t11*- und *t10,c12*-CLA in zwei verschiedenen Dosierungen (33 und 100 μ M) infiziert. Die nur mit Lösungsmittel (DMSO) behandelte Kontrolle ist oben links im Bild gezeigt.

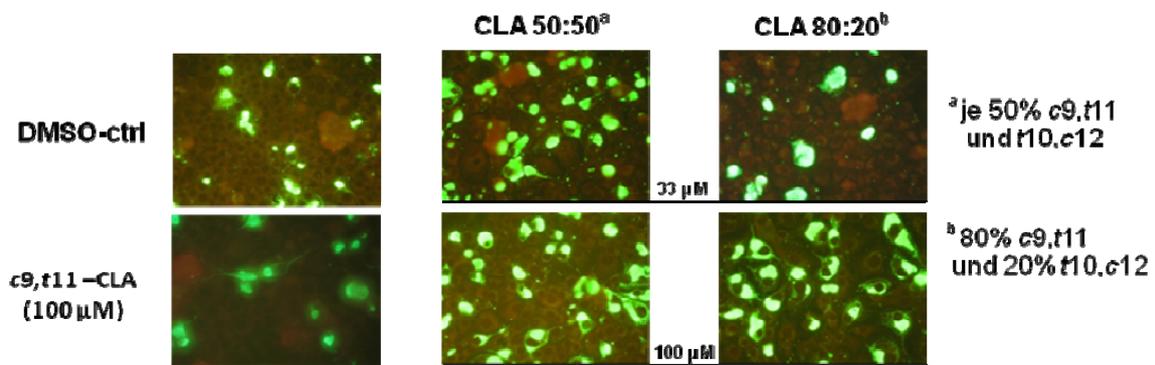


Abbildung 14: Fluoreszenz-Mikrographie von EBL-Zellen (1.5×10^5 Zellen/mL, 72 h Inkubation) mit Chlamydien (*C. psittaci* DC15, MOI 4) in Gegenwart von *c9,t11*-CLA (Bild links unten) oder verschiedenen Kombinationen von *c9,t11*- und *t10,c12*-CLA in zwei verschiedenen Dosierungen (33 und 100 μ M) infiziert. Die nur mit Lösungsmittel (DMSO) behandelte Kontrolle ist oben links im Bild gezeigt.

5 Diskussion

Gezielte Untersuchungen zur Wirkung von PUFA und CLA in Hinblick auf die Infektiosität von Chlamydien sind in der Literatur nicht zu finden, es gibt aber eine Reihe von Studien, die für verschiedene Komponenten der Wirtszelle, die bekanntlich eine Rolle bei der Infektion mit Chlamydien spielen, PUFA-induzierte Veränderungen berichten. Die genannten Komponenten sind:

- der PDGF-R (Platelet Derived Growth Factor-Rezeptor),
- der M6P/IGF-2 Rezeptor (Mannose-6-Phosphat/Insulin-like Growth Factor-2-Rezeptor),
- der Östrogenrezeptor,
- Glycoaminoglycane sowie
- die Lipidrafts, das sind Cholesterin-reiche Mikrodomänen in Zellmembranen, in denen sich Cholesterin, Glycolipide und Sphingolipide anreichern (Thomas et al., 2004; Korade 2008). Diese Domänen erhielten ihren Namen, weil sie wie Flöße (Rafts) auf der zweidimensionalen Flüssigkeit der Lipidmembran schwimmen.

PDGFR: Elwell et al. (2008) untersuchten, in wie weit PDGFR *C. trachomatis* als Rezeptor dient. Sie konnten feststellen, dass PDGFR während der Infektion phosphoryliert war. Diese Phosphorylierung spielt eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung des Rezeptors; wird dieser nicht phosphoryliert können nachgeschaltete Prozesse der Signaltransduktion nicht vollständig ablaufen. Jedoch zeigten Elwell et al. (2008) auch, dass eine Entfernung des Rezeptors von der Kultur (HeLa Zellen und *C. trachomatis*) zwar zu einer verminderten Wirtszellassoziation führte, aber die Internalisierung von *C. trachomatis* in die Wirtszelle nicht vermindert wurde. Das lässt darauf schließen, dass PDGFR zwar eine entscheidende und wichtige Rolle bei der Adhäsion spielt, aber nicht alleine dafür verantwortlich ist. Es scheint ferner möglich, dass PDGF einen anderen Rezeptor aktiviert, welcher dann die erfolgreiche Adhäsion und Internalisierung vermittelt. Interessanterweise zeigten Tomaska & Resnick (1993), dass Ölsäure, Linolsäure, Linolensäure und Arachidonsäure die Tyrosinkinase Aktivität, Dimerisierung und Autophosphorylierung um ca. 80% hemmen. Ebenso zeigten Nitta et al. (1998), dass die Eicosapentaensäure die Bindung von PDGF an PDGFR um rund 33% hemmt. Da die Bindung von PDGF an dessen Rezeptor, die darauf folgende Tyrosinkinase Aktivität, Dimerisierung und Autophosphorylierung essentiell für eine erfolgreiche Aktivierung des Rezeptors und auf die nachgeschalteten Signalkaskaden sind, wird durch die genannten PUFA's die Interaktion mit PDGFR unterbunden. Nach der Phosphorylierung von PDGFR werden auch die Proteine WAVE2 und Cortactin aktiviert, welche eine Aktinpolymerisierung des Zytoskeletts bedingen. Durch diese Polymerisierung wird den Chlamydien die Internalisierung erleichtert, da sie durch diese strukturellen Veränderungen des Zytoskeletts besser adhäreren können. Diese

Polymerisierung würde aber ebenfalls vermindert werden, wenn die PUFA's bereits die Aktivierung von PDGFR unterdrücken.

M6P/IGF II Rezeptor ist nachweislich an der Adhäsion und Internalisierung von *C. pneumoniae* und *C. trachomatis* beteiligt. So konnten Puolakkainen et al. (2005) zeigen, dass der multifunktionale Rezeptor M6P/IGF II, *C. pneumoniae* als Rezeptor dient. Durch Inkubation von HMEC-Zellen mit *C. pneumoniae* und M6P konnte eine ca. 80%ige Reduktion der Infektiosität und eine ca. 60%ige Verminderung der Adhäsion und Internalisierung beobachtet werden. Jedoch zeigte *C. trachomatis* unter Inkubation mit M6P keine Effekte. Dafür reagierte *C. trachomatis* mit Mannan, einem Liganden des Mannoserezeptors. Das deutet auf eine Spezies-spezifische Nutzung der Rezeptoren hin. *C. pneumoniae* nutzt den M6P/IGF II Rezeptor und *C. trachomatis* den Mannoserezeptor. Da jedoch die Entfernung, sowohl des M6P/IGF II Rezeptor als auch des Mannoserezeptors, von der Kultur, keine 100%ige Hemmung der Adhäsion, Internalisierung noch Infektiosität mit sich brachte, ist es ebenso wie bei PDGFR möglich, dass noch andere Rezeptoren an der Adhäsion und Internalisierung der Chlamydien an die Wirtszelle beteiligt sind. Trotzdem kann davon ausgegangen werden, dass M6P/IGF II als Rezeptor agieren kann, da bereits Brunetti et al. (1995) und Zhu et al. (1995) belegen konnten, dass das *Varicella zoster* Virus und *Herpes simplex* Virus M6P/IGF II als Rezeptor für deren Internalisierung nutzen. Die Verbindung von PUFA's zu dem M6P/IGF II Rezeptor stellen Kun et al. (2008) sowie Cho et al. (2003) her: Kun et al. (2008) zeigten, dass Eicosapentaensäure und Docosahexaensäure die Expression des Rezeptors in Epithelzellen hemmen. Cho et al. (2003) zeigten Unterschiede in der Interaktion von den CLA Isomeren, *t10,c12* und *c9,t11*: während das *t10,c12* CLA Isomer die Sekretion von IGF II in Kolonepithelzellen um rund 30% senkt, erhöht das *c9,t11* CLA Isomer die Sekretion von IGF II sogar um rund 30%. Da anscheinend nur *C. pneumoniae* M6P/IGF II als Rezeptor nutzt, kann die Wirkung der PUFA's hier auch nur diese Chlamydien-Spezies modulieren. Eicosapentaensäure, Docosahexaensäure und das *t10,c12* CLA Isomer zeigen hemmende Wirkungen auf die Expression des Rezeptors, jedoch in geringeren Umfang, als bei PDGFR. Dennoch würden die Interaktionen von *C. trachomatis* mit der Wirtszelle über M6P/IGF II deutlich gestört werden. Besonders kritisch ist dennoch zu betrachten, dass das *c9,t11* CLA Isomer die Expression von IGF II erhöht hat. Dadurch könnte eine Supplementierung dieses CLA-Isomers, sogar in einer gesteigerten Interaktion, von *C. pneumoniae* und dem M6P/IGF II Rezeptor, resultieren und statt des gewünschten Effekts der verminderten Adhäsion, Internalisierung und Infektiosität, die Interaktion mit der Wirtszelle noch forcieren.

Östrogenrezeptor: auch dieser Sexualhormonrezeptor wird mit der chlamydialen Wirtszellinteraktion in Verbindung gebracht. Der Östrogenrezeptor ist intrazellulär lokalisiert,

einer seiner Bestandteile ist Proteindisulfitisomerase (PDI; Landel et al., 1995). CHO (Chinese Hamster Ovary) -Zellen, die gegen die Adhäsion von *C. trachomatis*, *C. pneumoniae* und *C. psittaci* resistent sind, weisen einen Defekt im Prozessieren der Leader Sequenz von PDI auf (Conant & Stephens 2001). Mittels „Knockdown“ von PDI in HeLa Zellen, konnten Abromaitis & Stephens (2009) eine bis zu 90%ige Reduktion der PDI Expression feststellen. Das könnte darauf hinweisen, dass PDI ein Wirtszellrezeptor ist. Da jedoch PDI kein integrales Membranprotein ist, scheint es eher möglich, dass PDI Bestandteil eines Multiproteinkomplexes ist, welcher der eigentliche Rezeptor ist. Zumal PDI Bestandteil des Östrogenrezeptor-Komplexes ist und Chlamydien unter anderem in Geweben hoch exprimiert sind (z.B. Genitaltrakt), in denen auch der Östrogenrezeptor lokalisiert ist, scheint eine Beteiligung des Östrogenrezeptors an der Adhäsion und Internalisierung in die Wirtszelle wahrscheinlich. Eine Interaktion von PUFA's und dem Östrogenrezeptor ist nur bedingt gegeben. Levine (2002) konnte zeigen, dass 17 β -Estradiol, ein Ligand des Östrogenrezeptors, die Arachidonsäure-Freisetzung in Leberzellen stimuliert. Jedoch war diese Stimulation, nicht auf die Aktivierung des Östrogenrezeptors durch 17 β -Estradiol zurückzuführen, sondern auf einen Membraneffekt: Fluvestrant, ein Östrogenrezeptorantagonist, welcher die Bindung von 17 β -Estradiol an den Östrogenrezeptor verhindert, hatte keinen Effekt auf die Arachidonsäure-Freisetzung. Eine weitere indirekte Interaktion von PUFA's mit dem Östrogenrezeptor wird durch Wang et al. (2006) beschrieben. 17 β -Estradiol stimuliert PTP γ (Proteinphosphatase gamma), die an der Tumorgenese von Mammakarzinomen beteiligt zu sein scheint. Da CLA *in vivo* als auch *in vitro* antikarzinogene Wirkungen zugesprochen werden, untersuchten Wang et al. (2006), ob CLA die PTP γ -Expression in Brustepithelzellen reguliert. Sie konnten zeigen, dass die Expression von PTP γ durch die CLA-Isomere, *c9,t11* und *t10,c12*, erhöht wurde, jedoch das *t10,c12* CLA Isomere insgesamt aktiver war. Besonders in Östrogenrezeptor-positiven Zellen zeigte das *t10,c12* CLA-Isomere eine stärkere Regulation von PTP γ . Da die Interaktionen von Chlamydien mit dem Östrogenrezeptor, sowie die Interaktionen von PUFA's und dem Östrogenrezeptor nicht eindeutig belegt sind, ist es derzeit nur eine Vermutung, dass PUFA's, hier im speziellen CLA, die Interaktionen der Chlamydien mit der Wirtszelle via den Östrogenrezeptor beeinflussen können und die Adhäsion und Internalisierung vermindern.

Glycosaminoglycane: Aus dieser Familie von linear aus sich wiederholenden Disacchariden aufgebauten, sauren Polysacchariden spielen besonders Heparin und Heparansulfat eine wichtige Rolle bei der Adhäsion von *C. trachomatis*, *C. pneumoniae* und *C. psittaci*. In Anwesenheit der oben genannten Glycosaminoglycane konnte die Adhäsion der Chlamydien um rund 90% vermindert werden (Zhang & Stephens, 1992; Gutierrez-Martin et al., 1997; Wuppermann et al., 2001). Da hier, ebenso wie bei PDGFR und dem M6P/IGF II Rezeptor, keine 100%ige Inhibierung der Adhäsion erreicht werden konnte, ist es

wahrscheinlich, dass Chlamydien mehrere Adhäsionspfade nutzen, um in die Wirtszelle einzudringen. Dies erscheint auch biologisch sinnvoll, da sonst z.B. bei Wegfall einer Interaktionsmöglichkeit mit der Wirtszelle keine Adhäsion mehr möglich wäre und es zu keiner Interaktion der Chlamydien mit der Wirtszelle kommen würde. Auch wenn die Interaktion der Chlamydien mit der Wirtszelle über Glycosaminoglycane belegt ist, wurde bislang keine Verbindung von Glycosaminoglycanen zu PUFA's hergestellt.

Lipid Rafts: diese besonderen Strukturen der Wirtszellmembran sind am „Sortieren“ und Transport von Membranen zwischen Zellkompartimenten, sowie vielen Signaltransduktionsprozessen beteiligt (Doenecke et al. 2005). Stuart et al. (2003) zeigten, dass *C. trachomatis*, *C. pneumoniae* und *C. psittaci* Lipid Rafts für die Adhäsion und Internalisierung nutzen. Allerdings zeigte sich, dass nicht alle getesteten Serovare der Chlamydien Lipid Rafts nutzen. So hatten Filipin und Nystatin, welche die Funktionen von Lipid Rafts stören indem sie die Permeabilität der Zellmembran erhöhen, keinen Effekt auf die *C. trachomatis* Serovare A, B, C, MoPn und LGV. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Lipid Raft-vermittelte Internalisierung nicht auf eine Chlamydien-Spezies limitiert ist, es aber trotzdem Serovar-spezifische Unterschiede in der Nutzung der Lipid Rafts gibt. Stillwell & Wassall (2003) zeigten, dass Docosahexaensäure die Eigenschaften der Lipid Rafts verändert, indem sie die Fluidität, das Phasenverhalten sowie die Ionenpermeabilität moduliert. Chapkin et al. (2008) stützen diese Beobachtungen, indem sie zeigen konnten, dass Docosahexaensäure das Cluster der Membranproteine verändert ~~haben~~. Durch die geringe Bindungsstärke der Docosahexaensäure gegenüber Cholesterin in den Lipid Rafts, kam es zur verminderten Größe und Stabilität der Lipid Rafts. Ferner konnte Yaqoob (2009) die Verdrängung der Signalproteine in den Lipid Rafts durch Docosahexaensäure mit in der Folge unzureichender Signaltransduktion belegen. Durch die eingeschränkte Signaltransduktion können keine Signale an die Wirtszellrezeptoren weitergeleitet werden, welche dann die Adhäsion und Internalisierung vermitteln. Daher scheint es möglich, dass durch die Docosahexaensäure induzierte, strukturelle Veränderung der Lipid Rafts, die Interaktion der Chlamydien mit der Wirtszelle gestört wird. Durch die Verdrängung der Signalproteine können die Rezeptoren, die in den Lipid Rafts lokalisiert sind, z.B. PDGFR, die Adhäsion und Internalisierung von Chlamydien nur mehr unzureichend vermitteln.

Die Interaktion von PUFA und Zellen ist in Hinblick auf die Chlamydieninfektion nicht nur über die o.g. Komponenten relevant, sondern auch über die generelle Aktivierung des Epithels zur Abwehr: So reduziert Docosahexaensäure die Expression von Adhäsionsmolekülen und Interleukinen, welche für die Aktivierung des Endothels benötigt werden (De Caterina et al. 2000). Durch die Aktivierung des Endothels können Leukozyten an diese Zellen binden, um dann in das Zielgewebe zu emigrieren und daraufhin Abwehr- und Reparaturprozesse bei

Entzündungsreaktionen zu unterstützen (Prichard et al., 1995). Per se wäre die Interaktion zwischen Docosahexaensäure und dem Endothel eher negativ zu bewerten, da Leukozyten, wie bereits erwähnt, für Abwehr- und Reparaturprozesse benötigt werden. In Versuchen der Dissertation von Hippenstiel (2003) wurden Effekte von *C. pneumoniae* auf die Interaktion mit Endothelzellen untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass *C. pneumoniae* die Oberflächenexpression endothelialer Adhäsionsmoleküle induzierte, was *in vitro* in einer hocheffizienten Rekrutierung von Leukozyten resultierte. „Ob diese Aktivierung auch *in vivo* nachweisbar ist und ob sie nur in der ersten, akuten Phase besteht, oder aber persistiert“ bedarf aber noch weiterer Klärung (Hippenstiel, 2003). Zusammengenommen weist das darauf hin, dass *C. pneumoniae* die Fähigkeit besitzt, durch vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen, die Interaktion von Entzündungszellen mit dem Endothel zu verstärken. Bedingt durch die verminderte Expression der Adhäsionsmoleküle und Interleukine durch die Docosahexaensäure, würde die Supplementierung dieser Fettsäure bei einer Infektion mit *C. pneumoniae* die starke Expression der Adhäsionsmoleküle hemmen und in einem verminderten Entzündungsgeschehen resultieren.

Daneben bestehen Hinweise auf die modulierenden Wirkungen von PUFA, die diese auf die Proliferation und Apoptose (programmierter Zelltod) von Epithelzellen haben, und die wiederum relevant für die Infektionsprozesse von Chlamydien sind. Die möglichen Interaktionen von Chlamydien mit der Wirtszelle sind unter Berücksichtigung der Wirkung von mehrfach ungesättigten Fettsäuren in Abbildung 15 zusammengefasst.

Zwar sind die dargestellten Interaktionen in der Literatur nicht durch direkte Nachweise belegt, sondern basieren primär auf schlussfolgernden Interpretationen der gefunden Zusammenhänge zwischen den an der Infektion beteiligten Faktoren und deren Modulation durch PUFA. Dennoch deuten viele Faktoren darauf hin, dass PUFA, besonders die Eicosapentaensäure, Docosahexaensäure und CLA, Wirkmechanismen besitzen, die zu einer deutlichen Verminderung der Adhäsion und Internalisierung der Chlamydien führen. Die dargestellten Wirkungen von PUFA auf eine Infektion mit Chlamydien, sind demnach nicht Chlamydien-spezifisch. PUFA können ebenso die Infektion durch andere Mikroorganismen reduzieren, die ähnliche Interaktionen mit den Wirtszellen haben wie Chlamydien. Zur Wirkung von Docosahexaensäure kann aus der vorliegenden Studie nicht geschlossen werden, allerdings könnten entsprechende in der Literatur beschriebene Wirkungsweisen einen noch zu prüfenden Hinweis auf den hier gesehenen Arachidonsäureeffekt geben, da diese endogen auf ähnliche Weise wie Eicosapentaensäure und Docosahexaensäure verstoffwechselt wird.

In unseren Untersuchungen wurde gezielt der Effekt verschiedener PUFA auf die Infektionsanfälligkeit von verschiedenen Epithelzelllinien gegenüber verschiedenen Chlamydienspezies untersucht. Die Infektionsmodelle waren anhand umfangreicher

Validierungsarbeiten soweit optimiert, dass belastbare Aussagen über einen möglichen Infektionsschutz der Zellen durch diese PUFA getroffen werden konnten.

Von den hier untersuchten acht Fettsäuren zeigten zwei deutliche Effekte im Sinne einer Infektionsreduktion; alle anderen geprüften Fettsäuren veränderten die Infektionsraten nicht. Für Arachidonsäure wurden bei einer Dosierung von 100 µM in allen drei der untersuchten Epithelzelllinien Verminderungen der Infektionsraten zwischen 26 und 42% gefunden. Für das *c9,t11*-CLA Isomer waren Werte zwischen -20 bis -30% zu verzeichnen.

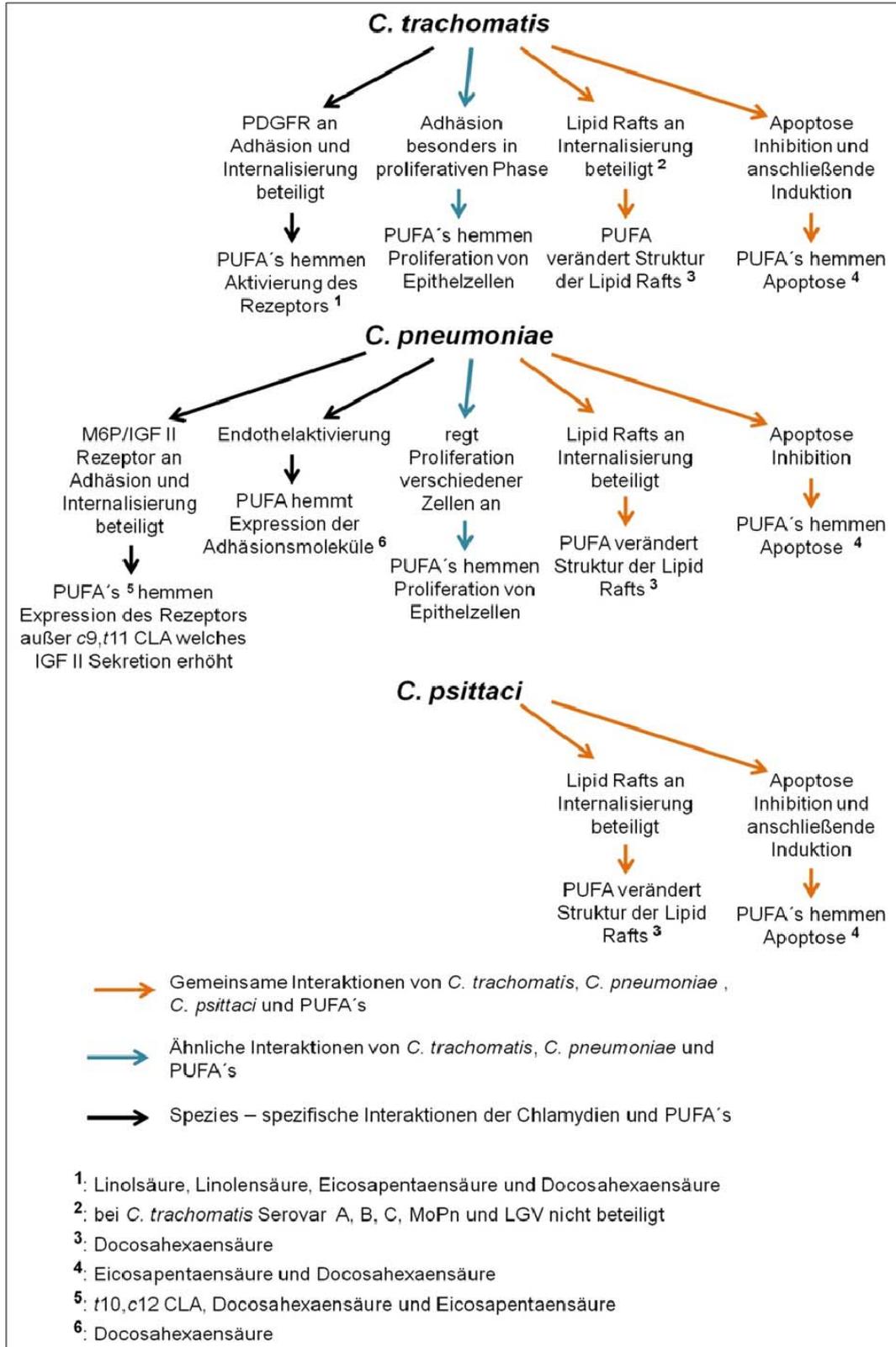


Abbildung 15: Zusammenfassende Darstellung der Interaktionen von Chlamydien mit der Wirtszelle unter Berücksichtigung der Wirkung von mehrfach ungesättigten Fettsäuren.

Für beide Fettsäuren war der Effekt jeweils am größten, wenn sowohl die Chlamydien als auch die Zelllinien mit der jeweiligen Fettsäure vorinkubiert wurden und auch die darauf folgenden Infektionsphase in Anwesenheit der Fettsäure erfolgte. Unter natürlichen Verhältnissen liegen im Blut und in Geweben diese Fettsäuren nicht einzeln, sondern in komplexen Mischungen vor, wobei das Verhältnis der einzelnen Fettsäuren untereinander in Abhängigkeit der mit der Nahrung zugeführten Mengen, dem Metabolismus und der Tierart schwanken. Eine selektive Erhöhung der Arachidonsäurewerte über die Nahrung ist wenig realistisch, jedoch ist generell von günstigen Effekten einer Linolsäure-reichen Nahrung in Kombination mit der Vermeidung von klassischen Risikofaktoren wie z.B. Alkohol (Nakamura et al., 1992) auszugehen. Die Situation beim Wiederkäuer dürfte sich hinsichtlich der in der Zirkulation ankommenden PUFA aufgrund der mikrobiellen Desaturase im Pansen quantitativ etwas unterscheiden, jedoch gelten grundsätzlich die gleichen Funktionszusammenhänge wie beim Monogaster. Die Wirkung des *c9,t11*-CLA -Isomers dürfte wiederum unter natürlichen Bedingungen gerade beim Wiederkäuer vorteilhaft sein, weil aufgrund der mikrobiellen Synthese dieses Isomers im Pansen sowie der ebenfalls dort gebildeten Vorstufe diesen Spezies intermediär höhere Mengen zur Verfügung stehen. In der Humanernährung ist die Zufuhr dieses Isomers über Milch und Fleisch von Wiederkäuern, die über das Futter gut mit den nötigen Vorstufen (gute Weide, linolsäurereiche Futterpflanzen) versorgt waren, eine entsprechende Aufnahme gewährleistet. Nicht uneingeschränkt positiv sind die CLA-Wirkungen in Hinblick auf die Chlamydien-Infektiosität zu sehen, wenn Kombinationen von *c9,t11*-CLA mit *t10,c12*-CLA vorliegen; dies entspricht der Situation bei Supplementierung mit synthetischen CLA.

6 Schlussfolgerungen

Insgesamt lassen sich aus den Zellkulturversuchen zwar infektionsreduzierende Eigenschaften einzelner PUFA (Arachidonsäure, *c9,t11*-CLA) ableiten, jedoch sind die Effekte erwartungsgemäß nicht im Sinne eines hundertprozentigen Infektionsschutzes zu werten. Die Beobachtung, wonach Kombinationen der beiden wichtigsten CLA, *c9,t11*-CLA und *t10,c12*-CLA, im Gegensatz dazu offenbar auch eher die Chlamydieninfektiosität begünstigende Effekte zeigten, ist derzeit nur als Hinweis auf potentiell adverse Wirkungen im Sinne der zellulären Empfänglichkeit gegenüber Chlamydieninfektionen zu werten. Eine Übertragung der *in vitro* erzielten Ergebnisse auf die *in vivo* Situation ist umfänglich nicht möglich, auch weil das Immunsystem in der *in vitro* Betrachtung naturgemäß unberücksichtigt bleibt. In Hinblick auf den Arachidonsäurebedarf von Milchkühen gilt, dass die Versorgung zu etwa gleichen Teilen einerseits aus der Versorgung mit Linolsäure über das Futter und zum anderen aus der *de novo*-Synthese aus Acetat und β -Hydroxybutyrat über Fettsäuresynthetasen erfolgt

(Holman, 1978; Burr et al., 1989). Eine gezielte Steigerung der Aufnahme von Linolsäure ist über entsprechend Linolsäure-reiche Futtermittel oder auch die gezielte Supplementierung von Linolsäure-reichen Fetten (z.B. Calcium-Salze von Distelöl) erreichbar. Derartige Futtermittel bzw. Supplemente wirken auch steigernd auf die Bildung von *c9,t11*-CLA, wobei aber nicht nur dieses sondern auch das *t10,c12*-CLA Isomere gebildet wird, sodass in Fetten von Wiederkäuern (Körper- und Milchfett) das *c9,t11*-CLA Isomere etwa 90% der dort enthaltenen CLA ausmacht (Mc Guire et al., 1999; Parodi et al., 2003) und die übrigen 10% auf Minorisomeren entfallen, wobei *t10,c12*-CLA nur in Spuren nachweisbar ist. Das hier verwendete 80:20-Verhältnis entspricht annähernd der (organspezifischen) Verteilung *in vivo* nach Gabe eines 50:50-CLA-Mischpräparates (Jaudszus Dissertation 2008). Damit ist also auch unter natürlichen Gegebenheiten eine Kombination der CLA-Isomere ähnlich der in den Zellkultur-Versuchen geprüften Verhältnissen gegeben. Daraus aber auf eine generell die Gefahr einer Chlamydieninfektion erhöhende Wirkung zu schließen, erscheint extrem unrealistisch. Um hier weiterführende Erkenntnisse zu gewinnen, müssten auch andere Kombinationen der einzelnen Fettsäuren getestet werden. Insgesamt ist eine Praxisempfehlung zur Fütterung bzw. Supplementierung mit PUFA zur unterstützenden Prävention und Therapie von Chlamydieninfektionen nicht möglich. Es bleiben die gesicherten Zusammenhänge mit Management- und Hygienemaßnahmen, um die aus der Infektion resultierenden Gesundheitsstörungen und Leistungseinbußen zu mildern.

7 Literaturverzeichnis

- Amin AS, Darwish GM, Ziada MS, Hassan MS (1999): Trial to control *Chlamydia psittaci* in processed buffalo semen. *Assiut Veterinary Medical Journal*, 40: 319-31.
- Abromaitis S, Stephens RS (2009): Attachment and entry of *Chlamydia* have distinct requirements for host protein disulfide isomerase. *PLoS Pathog*, 5: e1000357.
- Baumgard LH, Matitashvili E, Corl BA, Dwyer DA, Bauman DE (2002): *Trans*-10, *cis*-12 conjugated linoleic acid decreases lipogenic rates and expression of genes involved in milk lipid synthesis. *J Dairy Sci*, 85: 2155-63.
- Belury MA, Moya-Camarena SY, Lu M, Shi L, Leesnitzer LM, Blanchard SG (2002): Conjugated linoleic acid is an activator and ligand for peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR γ). *Nutr Res*, 22: 817-24.
- Biesenkamp-Uhe C, Li Y, Hehnen HR, Sachs K, Kaltenboeck B (2007): Therapeutic *Chlamydia abortus* and *C. pecorum* vaccination transiently reduces bovine mastitis associated with *Chlamydia* infection. *Infect Immun*, 75: 870-7.

- Bolte G, Winkler G, Hölscher B, Thefeld W, Weiland SK, Heinrich J (2005): Margarine consumption, asthma, and allergy in young adults: results of the German National Health Survey 1998. *Ann Epidemiol*, 15: 207-13.
- Brunetti CR, Burke RL, Hoflack B, Ludwig T, Dingwell K, Johnson DC (1995): Role of mannose-6-phosphate receptors in Herpes simplex virus entry into cells and cell-to-cell transmission. *J Virol*, 69: 3517-28.
- Bulgarella JA, Patton D, Bull AW (2001): Modulation of prostaglandin H synthase activity by conjugated linoleic acid (CLA) and specific CLA isomers. *Lipids*, 36: 407-12.
- Burr ML, Fehily AM, Gilbert JF, Welsby K, King S, Sandham S (1989): Effects of changes in fat, fish, and fibre intakes on death and myocardial reinfarction: diet and reinfarction trial (DART). *Lancet*, 2: 757-61.
- Chapkin RS, Wang N, Fan YY, Lupton JR, Prior IA (2008): Docosahexaenoic acid alters the size and distribution of cell surface microdomains. *Biochim Biophys Acta*, 1778: 466-71.
- Cho HJ, Lee HS, Chung CK, Kang YH, Ha YL, Park HS, Park JH (2003): Trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid reduces insulin-like growth factor-II secretion in HT-29 human colon cancer cells. *J Med Food*, 6: 193-9.
- Clément L, Poirier H, Niot I, Bocher V, Guere-Millo M, Krief S, Staels B, Besnard P (2002): Dietary *trans*-10,*cis*-12 conjugated linoleic acid induces hyperinsulinemia and fatty liver in the mouse. *J Lipid Res*, 43: 1400-9.
- Conant CG, Stephens RS (2007): Chlamydia attachment to mammalian cells requires protein disulfide isomerase. *Cell Microbiol*, 9: 222-32.
- Corl BA, Baumgard LH, Dwyer DA, Griinari JM, Phillips BS, Bauman DE (2001): The role of Δ^9 -desaturase in the production of cis-9,trans-11 CLA. *J Nutr Biochem*, 12: 622-30.
- Das UN (2000): Beneficial effect(s) of n-3 fatty acids in cardiovascular diseases: but why and how? *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 63: 351-62.
- De Caterina R, Liao JK, Libby P (2000): Fatty acid modulation of endothelial activation. *Am J Clin Nutr*, 71: 213-23.
- Delmonte P, Kataoka A, Corl BA, Bauman DE, Yurawecz MP (2005). Relative retention order of all cis/trans conjugated linoleic acid FAME from the 6,8- to 13,15-positions using silver ion HPLC with two elution systems. *Lipids*, 40: 509-14.
- Di Francesco A, Donati M, Rossi M, Pignanelli S, Shurdhi A, Balzelli R, Cevenini R (2008): Tetracycline-resistant *Chlamydia suis* isolates in Italy. *Vet Rec*, 163: 251-2.
- Doenecke D, Koolman J, Fuchs G, Gerok W (2005): *Karlsons Biochemie und Pathochemie*. 15. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart · New York.

- Dugan J, Rockey DD, Jones L, Andersen AA (2004): Tetracycline resistance in *Chlamydia suis* mediated by genomic islands inserted into the chlamydial *inv*-like gene. *Antimicrob Agents Chemother*, 48: 3989-95.
- Dugan J, Andersen AA, Rockey DD (2007): Functional characterization of IScs605, an insertion element carried by tetracycline-resistant *Chlamydia suis*. *Microbiology*, 153: 71-9.
- Elwell CA, Ceesay A, Kim JH, Kalman D, Engel JN (2008): RNA interference screen identifies Abl kinase and PDGFR signaling in *Chlamydia trachomatis* entry. *PLoS Pathog*, 4: e1000021.
- Fan YY, Ly LH, Barhoumi R, McMurray DN, Chapkin RS (2004): Dietary docosahexaenoic acid suppresses T cell protein kinase C theta lipid raft recruitment and IL-2 production. *J Immunol*, 173: 6151-60.
- Grün M, Liebisch M, Sauerwein H, Jahreis G, Sachse K (2009): Flow cytometric quantification of chlamydial infection in cell culture. *J Microbiol Methods*, 78: 360-2.
- Gutiérrez – Martín CB, Ojcius DM, Hsia RC, Hellioa R, Bavoil PM, Dautry-Varsat A (1997): Heparin – mediated inhibition of *Chlamydia psittaci* adherence to HeLa cells. *Microb Pathog*, 22: 47-57.
- Harbige LS (2003): Fatty acids, the immune response, and autoimmunity: a question of n-6 essentiality and the balance between n-6 and n-3. *Lipids*, 38: 323-41.
- Hippenstiel S (2003): Endothel und Entzündung: Pathomechanismen der bakteriellen Endothelaktivierung. Diss. med., Berlin.
- Holman RT (1978): Essential fatty acid deficiency in animal. In: Rechigl JrM., (Ed). *Handbook Series in Nutrition and Food, Section E: Nutritional Disorders. Volume 2*, CRC. Boca Raton: CRC Press, 1978: 491-514.
- Holtmann H, Shemer-Avni Y, Wessel K, Sarov I, Wallach D (1990): Inhibition of growth of *Chlamydia trachomatis* by tumor necrosis factor is accompanied by increased prostaglandin synthesis. *Infect Immun*, 58: 3168-72.
- Horton HR, Moran LA, Scrimgeour KG, Perry MD, Rawn JD (2008): *Biochemie. 4. Auflage*, Pearson Studium, München.
- Jaudszus A, Foerster M, Kroegel C, Wolf I, Jahreis G (2005): Cis-9,trans-11-CLA exerts anti-inflammatory effects in human bronchial epithelial cells and eosinophils: comparison to trans-10,cis-12-CLA and to linoleic acid. *Biochim Biophys Acta*, 1737: 111-8.
- Jaudszus A (2008): Cis-9,trans-11-konjugierte Linolsäure hemmt entzündliche Prozesse in Asthmamodellen in vitro und in vivo. Diss. rer. nat., Jena
- Jaudszus A, Krokowski M, Moeckel P, Darcan Y, Avagyan A, Matricardi P, Jahreis G, Hamelmann E (2008): Cis-9,trans-11-conjugated linoleic acid inhibits allergic

- sensitization and airway inflammation via a PPAR γ -related mechanism in mice. *J Nutr*, 138: 1336-42.
- Jee J, Degraives FJ, Kim T, Kaltenboeck B (2004): High prevalence of natural *Chlamydophila* species infection in calves. *J Clin Microbiol*, 42: 5664-72.
- Kaltenboeck B, Hehnen HR, Vaglenov A (2005): Bovine *Chlamydophila* spp. infection: do we underestimate the impact on fertility? *Vet Res Commun*, 29: Suppl 1, 1-15.
- Kelley DS, Bartolini GL, Warren JM, Simon VA, Mackey BE, Erickson KL (2004): Contrasting effects of t10,c12- and c9,t11-conjugated linoleic acid isomers on the fatty acid profiles of mouse liver lipids. *Lipids*, 39: 135-41.
- Kemmerling K, Müller U, Mielenz M, Sauerwein H (2009): *Chlamydophila* species in dairy farms: polymerase chain reaction prevalence, disease association, and risk factors identified in a cross-sectional study in western Germany. *J Dairy Sci*, 92: 4347-54.
- Kemp MQ, Jeffy BD, Romagnolo DF (2003): Conjugated linoleic acid inhibits cell proliferation through a p53-dependent mechanism: effects on the expression of G1-restriction points in breast and colon cancer cells. *J Nutr*, 133: 3670-7.
- Kinsella JE, Broughton KS, Whelan JW (1990): Dietary unsaturated fatty acids: interactions and possible needs in relation to eicosanoid synthesis. *J Nutr Biochem*, 1: 123-41.
- Korade Z, Kenworthy AK (2008): Lipid rafts, cholesterol, and the brain. *Neuropharmacology*, 55: 1265-73.
- Kun Z, Haiyun Z, Meng W, Li N, Li Y, Li J (2008): Dietary ω -3 polyunsaturated fatty acids can inhibit expression of granzyme B, perforin, and cation-independent mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor receptor in rat model of small bowel transplant chronic rejection. *J Parenter Enteral Nutr*, 32: 12-7.
- Landel CC, Kushner PJ, Greene GL (1995): Estrogen receptor accessory proteins: effects on receptor-DNA interactions. *Environ. Health Perspect*, 103: Suppl 7, 23-28.
- Levine L (2002): Nuclear receptor agonists stimulate release of arachidonic acid from rat liver cells. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 67: 453 – 459.
- Liu W, Dubinett S, Patterson SL, Kelly KA (2006): COX-2 inhibition affects growth rate of *Chlamydia muridarum* within epithelial cells. *Microbes Infect*, 8: 478-486.
- Longbottom D, Coulter LJ (2003): Animal chlamydioses and zoonotic implications. *J Comp Pathol*, 128: 217-244.
- Mannonen L, Nikula T, Haveri A, Reinikainen A, Vuola JM, Lahesmaa R, Puolakkainen M (2007): Up-regulation of host cell genes during interferon-gamma-induced persistent *Chlamydia pneumoniae* infection in HL cells. *J Infect Dis*, 195: 212-219.
- McGuire MK, McGuire MA, Ritzenthaler, Shultz TD (1999): Dietary sources and intakes of conjugated linoleic acid intake in humans. In: M.P. Yurawecz, M.M. Mossoba, M.W.

- Pariza, and G.J. Nelson (ed) *Advances in Conjugated Linoleic Acid Research*. Vol. 1. pp 369-377. AOCS Press, Champaign, IL.
- Moloney F, Toomey S, Noone E, Nugent A, Allan B, Loscher CE, Roche HM (2007): Antidiabetic effects of cis-9, trans-11-conjugated linoleic acid may be mediated via anti-inflammatory effects in white adipose tissue. *Diabetes*, 56: 574-82.
- Müller U, Sauerwein H (2010): Blauzungenkrankheit bei Rind und Schaf: Art und Umfang der entstehenden Verluste in der Produktion anhand von Beispielbetrieben in Nordrhein-Westfalen sowie Monitoring der Impferfolge. Forschungsbericht Nr. 162. Hrsg.: Lehr- und Forschungsschwerpunkt "Umweltverträgliche und Standortgerechte Landwirtschaft", Landwirtschaftliche Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, ISSN 1610-2460.
- Nakamura MT, Tang AB, Villanueva J, Halsted CH, Phinney SD (1992): Reduced tissue arachidonic acid concentration with chronic ethanol feeding in miniature pigs. *Am J Clin Nutr*, 56: 467-74.
- Nitta K, Ucida K, Tsutusi T, Honda K, Kawashima A, Yumara W, Nihei H (1998): Eicosapentaenoic acid inhibits mitogen-induced endothelin-1 production and DNA synthesis in cultured bovine mesangial cells. *Am J Nephrol*, 18: 164-70.
- Parodi P (2003): Conjugated linoleic acid in food. In J. Sebedio, W.W. Christie and R. Adolf (ed) *Advances in Conjugated Linoleic Acid Research*, Vol. 2, pp: 101-21. AOCS Press, Champaign, IL.
- Peterson DG, Matitashvili E, Bauman DE (2003): Diet-induced milk fat depression in dairy cows results in increased trans-10, cis-12 CLA in milk fat and coordinate suppression of mRNA abundance for mammary enzymes involved in milk fat synthesis. *J Nutr*, 133: 3098-102.
- Piperova LS, Sampugna J, Teter BB, Kalscheur KF, Yurawecz MP, Ku Y, Morehouse KM, Erdman RA (2002): Duodenal and milk trans octadecenoic acid and conjugated linoleic acid (CLA) isomers indicate that postabsorptive synthesis is the predominant source of cis-9-containing CLA in lactating dairy cows. *J Nutr*, 132: 1235-41.
- Poirier H, Shapiro JS, Kim RJ, Lazar MA (2006): Nutritional supplementation with *trans*-10,*cis*-12-conjugated linoleic acid induces inflammation of white adipose tissue. *Diabetes*, 55: 1634-41.
- Polan CE, McNeill JJ, Tove SB (1964): Biohydrogenation of Unsaturated Fatty Acids by Rumen Bacteria. *J Bacteriol*, 88:1056-64.
- Prichard BN, Smith CC, Ling KL, Betteridge DJ (1995): Fish oils and cardiovascular disease. *BMJ*, 310: 819-20.
- Puolakkainen M, Kuo CC, Campbell LA (2005): *Chlamydia pneumoniae* uses the mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor 2 receptor for infection of endothelial cells. *Infect Immun*, 73: 4620-5.

- Reinhold P, Sachse K, Kaltenboeck B (2011): Chlamydiaceae in cattle: commensals, trigger organisms, or pathogens? *Vet J*, 189: 257-67.
- Ringseis R, Müller A, Herter C, Gahler S, Steinhart H, Eder K (2006): CLA isomers inhibit TNF α -induced eicosanoid release from human vascular smooth muscle cells via a PPAR γ ligand-like action. *Biochim Biophys Acta*, 1760: 290-300
- Risérus U, Arner P, Brismar K, Vessby B (2002a): Treatment with trans10cis12 conjugated linoleic acid causes isomer-specific insulin resistance in obese men with the metabolic syndrome. *Diabetes Care*, 25: 1516-21.
- Risérus U, Basu S, Jovinge S, Fredrikson GN, Arnlöv J, Vessby B (2002b): Supplementation with conjugated linoleic acid causes isomer-dependent oxidative stress and elevated C-reactive protein: a potential link to fatty acid-induced insulin resistance. *Circulation*, 106: 1925-9.
- Robert-Koch-Institut (2001): *Epidemiologisches Bulletin* 12.
- Robert-Koch-Institut (2001): *Epidemiologisches Bulletin* 14.
- Sausenthaler S, Kompauer I, Borte M, Herbarth O, Schaaf B, Berg A, Zutavern A, Heinrich J (2006): Margarine and butter consumption, eczema and allergic sensitization in children. The LISA birth cohort study. *Pediatr Allergy Immunol*, 17: 85-93.
- Schmitz G, Ecker J (2008): The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids. *Prog Lipid Res*, 47: 147-55.
- Stemke-Hale K, Kaltenboeck B, DeGraves FJ, Sykes KF, Huang J, Bu CH, Johnston SA (2005): Screening the whole genome of a pathogen in vivo for individual protective antigens. *Vaccine*, 23: 3016-25.
- Stephens RS (2003): The cellular paradigm of chlamydial pathogenesis. *Trends Microbiol*, 11: 44-51.
- Stillwell W, Wassall SR (2003): Docosahexaenoic acid: membrane properties of a unique fatty acid. *Chem Phys Lipids*, 126: 1-27.
- Storz J, Carroll EJ, Stephenson EH, Ball L, Eugster AK (1976): Urogenital infection and seminal excretion after inoculation of bulls and rams with chlamydiae. *Am J Vet Res*, 37: 517-20.
- Stuart ES, Webley WC, Norkin LC (2003): Lipid rafts, caveolae, caveolin-1, and entry by Chlamydiae into host cells. *Exp Cell Res*, 287: 67-78.
- Tholstrup T, Raff M, Straarup EM, Lund P, Basu S, Bruun JM (2008): An oil mixture with trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid increases markers of inflammation and in vivo lipid peroxidation compared with cis-9, trans-11 conjugated linoleic acid in postmenopausal women. *J Nutr*, 138: 1445-51.

- Thomas S, Preda-Pais A, Casares S, Brumeanu TD (2004): Analysis of lipid rafts in T cells. *Mol Immunol*, 41: 399-409.
- Tomáška L, Resnick RJ (1993): Suppression of platelet-derived growth factor receptor tyrosine kinase activity by unsaturated fatty acids. *J Biol Chem*, 268: 5317-22.
- Tulleken JE, Limburg PC, Muskiet FA, van Rijswijk MH (1990): Vitamin E status during dietary fish oil supplementation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 33: 1416-9.
- Turpeinen AM, Ylönen N, von Willebrand E, Basu S, Aro A (2008): Immunological and metabolic effects of cis-9, trans-11-conjugated linoleic acid in subjects with birch pollen allergy. *Br J Nutr*, 100: 112-9.
- Tsuboyama-Kasaoka N, Takahashi M, Tanemura K, Kim HJ, Tange T, Okuyama H, Kasai M, Ikemoto S, Ezaki O (2000): Conjugated linoleic acid supplementation reduces adipose tissue by apoptosis and develops lipodystrophy in mice. *Diabetes*, 49: 1534-42.
- Vaille K, Férézou J, Parquet M, Amsler G, Grippois D, Quignard-Boulangé A, Martin JC (2006): The natural concentration of the conjugated linoleic acid, cis-9,trans-11, in milk fat has anti-atherogenic effects in hyperlipidemic hamsters. *J Nutr*, 136: 1305-10.
- Wang LS, Huang YW, Sugimoto Y, Liu S, Chang HL, Ye W, Shu S, Lin YC (2006): Conjugated linoleic acid (CLA) up – regulates the estrogen – regulated cancer suppressor gene, protein tyrosine phosphatase γ (PTP γ), in human breast cells. *Anticancer Res*, 26: 27-34.
- Wang C, van Ginkel FW, Kim T, Li D, Li Y, Dennis JC, Kaltenboeck B (2008): Temporal delay of peak T-cell immunity determines *Chlamydia pneumoniae* pulmonary disease in mice. *Infect Immun*, 76: 4913-23.
- Wang C, Gao D, Kaltenboeck B (2009): Acute *Chlamydia pneumoniae* reinfection accelerates the development of insulin resistance and diabetes in obese C57BL/6 mice. *J Infect Dis*, 200: 279-87.
- Wuppermann FN, Hegemann JH, Jantos CA (2001): Heparan sulfate-like Glycosaminoglycan is a cellular receptor for *Chlamydia trachomatis*. *J Infect Dis*, 184: 181-7.
- Yaqoob P (2009): The Nutritional Significance of Lipid Rafts. *Annu Rev Nutr*, 29: 257-82.
- Yu Y, Correll PH, Vanden Heuvel JP (2002): Conjugated linoleic acid decreases production of pro-inflammatory products in macrophages: evidence for a PPAR γ -dependent mechanism. *Biochim Biophys Acta*, 1581: 89-99
- Zhang JP, Stephens RS (1992): Mechanism of *C. trachomatis* attachment to eukaryotic host cells. *Cell*, 69: 861-9.
- Zhu Z, Gerhon MD, Ambron R, Gabel C, Gershon AA (1995): Infection of cells by Varicella zoster virus: inhibition of viral entry by mannose 6 – phosphate and heparin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92: 3546-50.

8 Liste über Veröffentlichungen

- Vortrag anlässlich der 5. Arbeitstagung des nationalen Referenzlabors für Psittakose. „Chlamydien- und Coxielleninfektionen der Nutztiere - von Apathogen bis Zoonotisch“. 19.-20.05.2011, Jena:
Anke Jaudszus, Michael Grün, Helga Sauerwein, Gerhard Jahreis & Konrad Sachse: Antichlamydiale Effekte von langkettigen Fettsäuren (Referentin A. Jaudszus)
- Vortrag anlässlich des Expertenworkshops „Chlamydieninfektionen bei Milchkühen – Prävalenz, Prävention und zoonotisches Potential“ im MKUNLV NRW, Düsseldorf am 16.11.2011:
Anke Jaudszus, Michael Grün, Helga Sauerwein, Gerhard Jahreis & Konrad Sachse : Antichlamydiale Wirkung mehrfach ungesättigter Fettsäuren (Referentin H. Sauerwein)
- Poster bei ADSA-AMPA-ASAS-CSAS-WSASAS Joint Meeting (15. – 19. Juli 2012 in Phoenix, Arizona, USA); Kurzfassung angenommen, erscheint im Juli 2012 in einem Sonderband von Journal of Animal Science und Journal of Dairy Science:
A Jaudszus^{1,2}, M Grün^{1,3}, G Jahreis¹, K Sachse⁴, H Sauerwein: Effect of polyunsaturated fatty acids (PUFA) on the infection of bovine epithelial cells with *Chlamydia psittaci* (Präsentation: H. Sauerwein)

9 Kurzfassung

Ziel des vorliegenden Forschungsvorhabens war eine potentiell Chlamydien-infektionsmindernde Wirkung von mehrfach ungesättigten Fettsäuren an zwei humanen und einer bovinen Epithelzelllinie zu untersuchen. Die Zellkultur bietet eine erste Möglichkeit derartigen Wirkungen, für die aus der Literatur indirekte Hinweise bestanden, näher nach zu gehen, ohne dabei schon Tier- und Infektionsversuche durchführen zu müssen. Am lebenden Tier, d.h. mit Kühen oder zumindest Rindern, wäre ein derartiger Testversuch allein aus Kostengründen, aber auch wegen des gezielten Umgangs mit dem Pathogen nicht vertretbar. Der Versuchsplan beinhaltete ein Screening von acht verschiedenen Fettsäuren (α -Linolensäure (C18:3n-3), γ -Linolensäure (C18:3n-6), Linolsäure (C18:2n-6), *c*9,*t*11-CLA, *t*10,*c*12-CLA, Ölsäure (C18:1n-9), Arachidonsäure (C20:4n-6) und Eicosapentaensäure (C20:5n-3) in zwei verschiedenen Dosierungen (33 und 100 μ M) mit drei verschiedenen Chlamydienstämmen (*C. trachomatis* DC10, *C. pneumoniae* DC40, *Cp. psittaci* DC15) an zwei verschiedenen humanen Zelllinien [Hela (Zervixepithel) und A549 (Lungenepithel)] und einer bovinen Zelllinie (EBL; Lungenepithel). Hinsichtlich der getesteten Chlamydienstämme wurde der Schwerpunkt auf *C. psittaci* gelegt, weil dies aus der geplanten Auswahl der einzige Stamm mit Relevanz für Milchviehbestände ist. Zudem wurden die beiden o.g. CLA-Isomere auch in Kombination (zwei unterschiedlichen Mischanteile: *c*9,*t*11-CLA:*t*10,*c*12-CLA = 1:1 und 8: 2) geprüft. Die Versuchsbedingungen waren hinsichtlich Einsaatdichte der Zellen, und Chlamydieninfektionsdosis vorab optimiert worden. Zudem wurde nachgewiesen, dass die einzelnen Fettsäuren auf die Zellen nicht toxisch wirken und dass die einzelnen Fettsäuren auch in die Zellen aufgenommen werden. Die Infektionsraten aus den einzelnen Versuchsansätzen wurden durchflusszytometrisch und/oder über Fluoreszenzmikroskopie quantifiziert.

Aus den geprüften acht Fettsäuren zeigten zwei eine Wirkung auf die Infektionsraten: Arachidonsäure (100 μ M) führte in allen drei untersuchten Zelllinien zu einer Reduktion der Infektionsraten (zwischen 26 und 42% weniger infizierte Zellen). Mit *c*9,*t*11-CLA (33 μ M) war ebenfalls die Infektionsrate vermindert (zwischen 20 und 30%). Auch wenn jeweils nur die Zellen oder nur die Chlamydien mit den Fettsäuren vorinkubiert wurden, zeigten sich diese Effekte, waren aber jeweils dann am stärksten, wenn sowohl die Vorinkubation als auch die Infektionsphase in Gegenwart der Fettsäure liefen. Für die Kombinationen der beiden hauptsächlich vorkommenden CLA-Isomere deutete sich hingegen an, dass diese zu einer

Steigerung der Infektionsrate führen; auch dieser Effekt war in allen drei Zelllinien zu beobachten.

Die hier aufgebaute Zellkulturmodell erwies sich insgesamt als geeignet, die Wirkung einzelner Fettsäuren sowie, wie im Fall von CLA, Kombinationen von Fettsäuren hinsichtlich ihrer antichlamydialen Wirkung zu testen. Die Ergebnisse zwischen den einzelnen Zelllinien sowie den verwendeten Chlamydienstämmen stimmten gut überein, sodass für weitere Fragestellungen auf ein einfacheres Modell, bestehend aus nur einer Zelllinien x Chlamydien-Kombination, zurückgegriffen werden könnte.

Für die Praxis lassen sich aus den Befunden erwartungsgemäß noch keine Empfehlungen ableiten, insgesamt bleiben damit die Möglichkeiten der Kontrolle von Chlamydieninfektionen zunächst beschränkt und sind im Wesentlichen in Hygienemaßnahmen in den Bereichen Haltung und Management im Sinne der Prävention und Übertragungsminimierung zu sehen.

ISSN 1610-2460