

Charakterisierung der Polysialylierung in der Milch und dessen Veränderung während einer Mastitis

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades Dr. med.
im Fachbereich der Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Julia Hinterseher
aus Gießen

Gießen 2020

Aus dem Fachbereich Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: PD Dr. Galuska
Gutachter: Prof. Dr. Meinhold-Heerlein

Tag der Disputation: 26.05.2021

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Glykosylierung	1
1.2 Aufbau von Sialinsäure	1
1.3 Monosialinsäure.....	2
1.4 Oligo- und Polysialinsäure	4
1.4.1 PolySia im menschlichen Körper - NCAM.....	4
1.4.2 Weitere bekannte polysialylierte Glykoproteine und deren Funktion	5
1.4.3 Interaktion von PolySia mit Histonen und Laktoferrin.....	6
1.4.4 Weitere Beispiele für das Vorkommen von PolySia	9
1.5 Polysialyltransferase St8SialII und St8SialIV	10
1.6 Aufbau des bovinen Euters	11
1.6.1 Anatomie der laktierenden Milchdrüse.....	11
1.6.2 Stadien des Laktationszyklus	12
1.6.3 Veränderung des Gewebes unter infektiösen Bedingungen	12
1.6.4 Hausrinder im Vergleich	14
1.7 Mastitis	14
1.7.1 Humane Mastitis.....	14
1.7.2 Bovine Mastitis	15
1.7.3 Mastitismilch.....	15
1.7.4 Unterschiede zwischen Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien in der Milch.....	16
1.7.5 Erreger der Mastitis	17
1.7.6 Unterschiede zwischen humaner und boviner Mastitis	20
1.8 Sialinsäure in der humanen Ernährung	20
1.8.1 Interaktion von Pathogenen mit Oligosaccharidsequenzen.....	20
1.8.2 Unterschiede zwischen humaner Milch, boviner Milch und dem Muttermilchersatz.....	21
1.8.3 Sialinsäure in der Milch und die exogene Verabreichung von Sialinsäure (bei Ratten)	22
1.8.4 Sialinsäure während der humanen Schwangerschaft	23
1.9. Medizinische Bedeutung von Störungen im Sialinsäuremetabolismus	23
2. Zielsetzung.....	25
3. Materialien.....	26

3.1 Probenmaterialien.....	26
3.2 Biologische Materialien.....	26
3.3. Lösungen.....	28
3.4 Verbrauchsmaterialien und Geräte.....	30
3.5 Sonstiges.....	32
4. Methoden.....	34
4.1 Proteinanalytische Methoden.....	34
4.1.1 Probenaufarbeitung.....	34
4.1.2 Affinitätsaufreinigung mit Tosylaktivierten Dynabeads.....	34
4.1.3 Enzymatische Abspaltung von Sialinsäuren mittels EndoN.....	36
4.1.4 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	36
4.1.5 Western Blot.....	38
4.1.6 Chemolumineszenzreaktion mit ECL.....	40
4.2. Histologische Methoden.....	41
4.2.1 PolySia-Verdau mit aktivem EndoN.....	43
4.2.2 Weiteres gemeinsames Vorgehen.....	44
4.2.3 Detektion.....	45
4.2.4 Konservierung bzw. Vorbereitung der Schnitte zur mikroskopischen Beurteilung.....	45
4.3 Molekularbiologische Methoden.....	46
4.3.1 Nachweis der Genexpression von St8SialII und St8SialIV in Milchdrüsengewebe.....	46
5. Ergebnisse.....	51
5.1 Nachweis von PolySia aus der Milch von gesunden Kühen (ohne Infektion/Mastitis) mittels Western-Blot.....	51
5.1.1 Nachweis von PolySia in humaner Milch.....	51
5.1.2 Nachweis von PolySia in verschiedenen Milchsorten.....	52
5.1.3 PolySia-Verlauf in boviner Milch nach Kalbung.....	53
5.1.4 Nachweis von PolySia in reifer Dextermilch.....	54
5.2 Nachweis von PolySia in bovinen Milchdrüsengewebe mittels Immunhistochemie	55
5.2.1 Nachweis von PolySia in Milchdrüsenepithelzellen.....	55
5.3 Nachweis der Genexpression von St8SialII und St8SialIV im Milchdrüsengewebe	58
5.3.1 Sequenzierung.....	59
5.4 Histologische Unterschiede des PolySia-Gehalts in Milchdrüsenepithelzellen nach Infektion.....	61

5.4.1 Nachweis von PolySia zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion	62
5.4.2 Veränderungen der Expressionsrate der Polysialyltransferasen zu verschiedenen Zeitpunkten nach <i>E. coli</i> - Infektion.....	64
6. Diskussion.....	65
6.1 Nachweis von PolySia in der Milch	65
6.2 PolySia-Lokalisation im Milchdrüsengewebe – Untersuchung auf Zellebene	67
6.3 Nachweis der Polysialyltransferasen St8SialII und St8SialIV im bovinen Milchdrüsengewebe – Untersuchung auf RNA-Ebene	69
6.4 PolySia während einer Mastitis	70
7. Zusammenfassung.....	73
8. Abstract.....	74
9. Abbildungsverzeichnis.....	75
10. Tabellenverzeichnis.....	76
11. Abkürzungsverzeichnis.....	77
12. Literaturverzeichnis	79
13. Erklärung zur Dissertation	96
14. Danksagung	97

1. Einleitung

1.1 Glykosylierung

Durch die Glykosylierung entsteht eine hohe Anzahl von verschiedenen, hoch regulierten zellulären Glykanen, die an Proteinen oder Lipiden vorkommen können. Die Glykosidasen und Glykosyltransferasen, die für die Glykosylierung verantwortlich sind, erwiesen sich als essentiell in der Entwicklung und Physiologie von lebenden Organismen. Glykane sind beteiligt an vielen biologischen Schlüsselprozessen, wie zum Beispiel bei der Zelladhäsion, bei der Signaltransduktion, bei der Rezeptoraktivierung, der Endozytose und vielen weiteren Prozessen [Ohtsubo und Marth, 2006].

Ein Beispiel für ein glykosyliertes Protein ist das neurale Zelladhäsionsmolekül NCAM. An diesem Protein kann man Glykane finden, die mit dem sauren Polysaccharid Polysialinsäure (PolySia) modifiziert werden können [Galuska et al, 2017].

1.2 Aufbau von Sialinsäure

1930 haben einige Forscher, darunter Gunnar Blix und Ernst Klenk, erstmals Sialinsäure aus Glykolipiden und Speichelmuzinen isoliert. Die Struktur, Chemie und die Biosynthese dieser Verbindung wurde jedoch erst 1950 durch verschiedene Forschergruppen bestimmt [Varki und Schauer, 2009].

Sialinsäuren sind α -Ketosäuren und bilden eine große Familie von mehr als 50 verschiedenen, miteinander verwandten Derivaten von sauren Monosacchariden, die alle ein gemeinsames Kerngerüst, bestehend aus neun Kohlenstoffatomen, besitzen [Buschiazzo et al; 2008].

Die am häufigsten vorkommenden Sialinsäuren sind N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac), N-Glykolyneuraminsäure (Neu5Gc) und die Deaminoneuraminsäure (KDN), die in Abbildung 1 dargestellt sind.

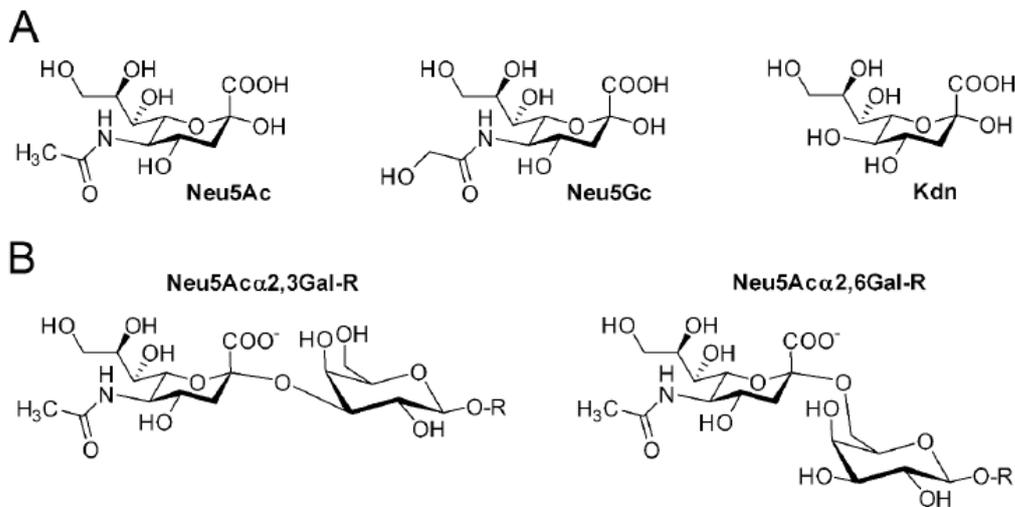


Abbildung 1. Die häufigsten Sialinsäuren bzw. sialylierten Moleküle: Gezeigt werden (A) die drei häufigsten Strukturen der Sialinsäure. Hier ist die N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac) zu sehen. Neu5Ac ist das wichtigste Sialinsäuremolekül, das in menschlichem Gewebe vorkommt. Andere häufig beschriebene Sialinsäuren in Wirbeltieren sind N-Glycolylneuraminsäure (Neu5Gc) und 2-Keto-3-desoxy-nonulosonsäure (Kdn); (B) Bei Wirbeltieren ist die Sialinsäure-Hydroxylgruppe an Position 2 am häufigsten glykosidisch mit entweder der 3- oder 6-Hydroxylgruppe von Galactose (Gal)-Resten verknüpft [Teppa et al, 2016]. Die Abbildung wurde aus [Teppa et al, 2016] entnommen; CC BY.

Durch eine mögliche Substitution der Hydroxylgruppen in Position C4, C7, C8 und C9 mit Methyl-, Sulfonyl-, Acetyl- und Phosphonylresten, existiert eine große Diversität von Sialinsäuren [Angata und Varki, 2002; Schauer, 2004].

Sialinsäuren wurden sowohl in höher entwickelten Wirbeltieren als auch in Wirbellosen und Mikroorganismen entdeckt und beschrieben [Schauer, 2009]. Aufgrund der negativen Ladung bei physiologischem pH, dienen Sialinsäuren als Mediatoren bei Zell-Zell-Interaktionen [Varki, 1997], Signalübertragung [Crocker et al, 2007] und vielen weiteren zellulären Mechanismen. Bei einem Versuch mit embryonalen Mäusen wurde die Bedeutung von Sialinsäuren erneut aufgezeigt. Durch einen „Knockout“ des Enzyms UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase, welches für die Biosynthese von Sialinsäure verantwortlich ist, starben die Mäuse [Schwarzkopf et al, 2002]. Dies zeigt die essentielle Bedeutung von Sialinsäure für die physiologischen Prozesse im Körper.

1.3 Monosialinsäure

Sialinsäuren existieren als Mono-, Di- (2 Sialinsäurereste), Oligo- (3-7 Sialinsäurereste), und Polysialinsäuren (≥ 8 Sialinsäurereste). In den meisten Fällen findet man die Sialinsäure als Monomer auf Glykoproteinen und Glykolipiden [Varki, 1997].

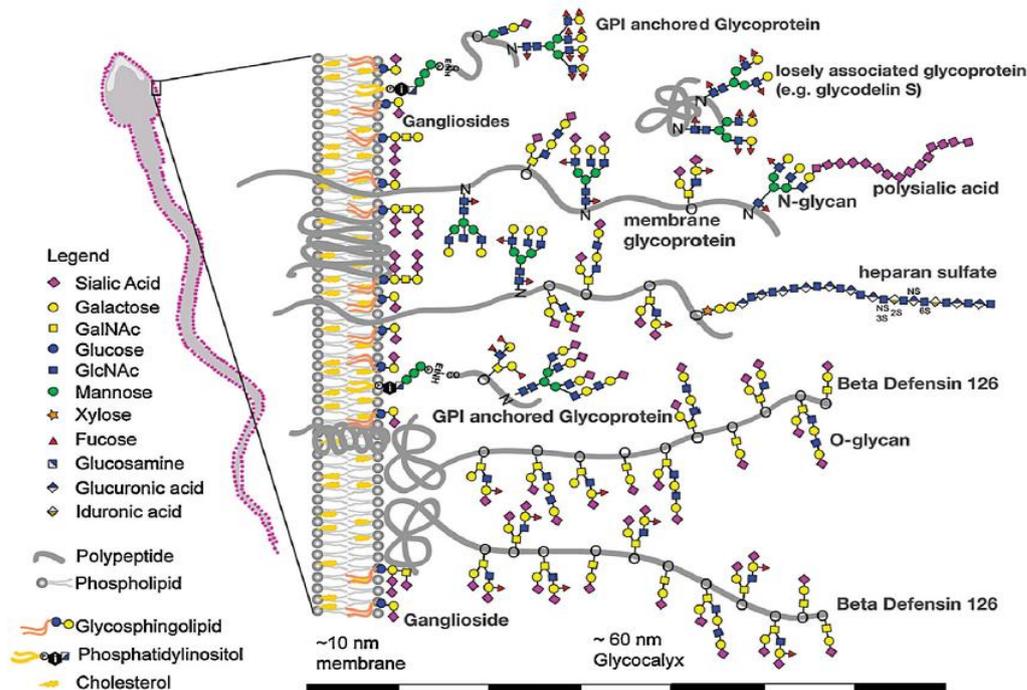


Abbildung 2. Aufbau der Glykokalyx am Beispiel eines Spermiums: Zu sehen sind die wichtigsten Glykan- und Glykokonjugat-Klassen, am Beispiel eines Spermiums. Monosaccharide werden durch farbige Symbole kodiert, die in der Legende erklärt werden. Ein typisches Monosaccharid stellt hier die Sialinsäure dar. Proteine und Lipide werden grau dargestellt, ausgenommen Cholesterin (gelb) und die Lipide der Glycosphingolipide (orange). Säugetiere synthetisieren die meisten Glykane mit vielen verschiedenen Monosaccharid-Bausteinen. Einige dieser Monosaccharide können durch Sulfatierung und/oder Acetylierung weiter modifiziert werden. Die Abbildung wurde entnommen aus [Teclé und Gagneux, 2015]; CC BY-NC-ND.

In Abbildung 2 wird der Aufbau einer Glykokalyx (einer "Zuckerhülle") dargestellt. Alle lebenden Zellen werden von einer Glykokalyx umhüllt, die aus einer Vielzahl verschiedener Glykokonjugate besteht. Die Glykokalyx kann bildlich als molekularer Wald beschrieben werden, in dem die Polypeptide der Glykoproteine die Baumstämme bilden und in einem Kronendach aus Glykanen enden [Cohen und Varki, 2010]. Einige dieser Glykane sind verzweigt und an ihren Enden mit Monosacchariden, wie zum Beispiel Sialinsäure, versehen. Andere bilden lange Polysaccharidketten, die verschiedene funktionelle Gruppen tragen [Teclé und Gagneux, 2015]. Sialinsäuren werden hauptsächlich an der terminalen Position von N- oder O-verknüpften Glykanen gefunden. Diese liegen an der Zelloberfläche gebunden vor oder sind Bestandteile von Glykoproteinen und Glykolipiden [Varki, 2007].

1.4 Oligo- und Polysialinsäure

Oligo- und Polysialinsäure unterscheiden sich nicht nur in der Länge der Kette, sondern auch in der Art der enthaltenen Sialinsäure-Moleküle und der Verknüpfung der einzelnen Bausteine. Im Gegensatz zu extrazellulären Proteinen, die fast alle monosialyliert vorliegen, gibt es nur eine sehr kleine Gruppe von polysialylierten Proteinen. PolySia ist ein stark negativ geladenes Zucker-Polymer, welches aus über 90 Sialinsäureresten bestehen kann [Galuska et al, 2017].

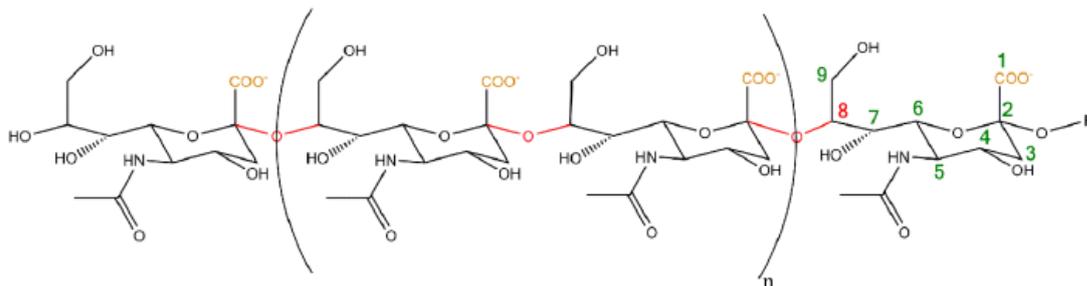


Abbildung 3. PolySia-Struktur: Bei Säugetieren besteht PolySia aus α -2,8-verknüpften N-Acetylneuraminsäureresten (Neu5Ac) (Verknüpfung in rot). Es handelt sich um eine α -Ketosäure mit einem neun-Kohlenstoff-Grundgerüst (Nummerierung in grün) und einem Carboxylat-Anion unter physiologischen Bedingungen (orange). R: N-Glykan oder O-Glykan [Galuska et al, 2017]; CC BY.

In Abbildung 3 ist die PolySia-Struktur bei Säugetieren zu sehen. Diese besteht aus mehreren α -2,8-verknüpften N-Acetylneuraminsäureresten (Neu5Ac), die entweder an N- oder O-Glykanen von Proteinen vorliegen [Galuska et al, 2017].

Wie schon für die Monosialinsäuren beschrieben, gibt es auch hier zusätzliche Veränderungen, die die Strukturvielfalt von Oligo- und Polysialinsäuren erhöhen. Hier kann an den Positionen C7 und C9 eine Laktionisierung bzw. O-Acetylierung durchgeführt werden [Sato et al, 1993; Kielczynski et al, 1994].

1.4.1 PolySia im menschlichen Körper - NCAM

Die stark negativ geladene PolySia ist in Vertebraten dafür bekannt, Einfluss auf die Regulation der Zell-Zell-Kontakte und die Abstoßung untereinander zu haben [Rutishauser 2008]. In Säugern besteht PolySia aus α -2,8-verlinkten N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac) -Resten, wobei die Kettenlänge der Polymere sehr variieren kann. Im Gegensatz zu den extrazellulär liegenden Glykoproteinen, die sehr häufig mit Monosialinsäureresten modifiziert vorliegen, existiert die Polysialylierung nur bei einer kleinen Anzahl von N- und O-glykosylierten Proteinen. Das bekannteste

Beispiel für die Polysialylierung von Proteinen ist das neurale Zelladhäsionsmolekül NCAM (*neural cell adhesion molecule*) [Galuska et al, 2017].

Eine korrekte räumliche und zeitliche Kontrolle von zellulären Interaktionen ist essentiell für die neuronale Entwicklung und Plastizität. NCAM ist ein Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie und unmittelbar an diesen Prozessen beteiligt. Es ist ein Zelloberflächenprotein und liegt im stark glykosylierten Zustand vor. Außerdem ist es ein Teil der Glykokalyx, welche die äußere Grenze der tierischen Zellen darstellt und somit die Schnittstelle für zelluläre Interaktionen bildet [Hildebrandt et al, 2007].

Das bisherige Wissen über Zelloberflächenglykane ist sehr begrenzt. Die posttranslationale Modifikation von NCAM mit PolySia ist somit eine Besonderheit, da es eine der am besten untersuchten Glykanstrukturen im sich entwickelnden Nervensystem darstellt [Hildebrandt et al, 2007].

Die PolySia-Expression auf NCAM nimmt während der postnatalen Entwicklung bedeutend ab, und scheint somit hauptsächlich in der frühen Entwicklung eine Rolle zu spielen. Eine erhöhte PolySia-Expression steht in Korrelation zu neuronaler Plastizität. Dies beschreibt den Umbau neuronaler Strukturen in Abhängigkeit ihrer Verwendung. Die neuronale Plastizität kann einzelne Nervenzellen oder sogar ganze Hirnareale betreffen. Sie dient dazu, die Funktionen des Nervensystems zu erhalten, anzupassen oder bei Bedarf zu erweitern [Varki und Schauer, 2009].

1.4.2 Weitere bekannte polysialylierte Glykoproteine und deren Funktion

Studien geben Hinweise darauf, dass PolySia eine wichtige Rolle bei der Immunantwort spielt [Kiermaier et al, 2016]. Außer dem schon beschriebenen NCAM, welches hauptsächlich im embryonalem Hirn exprimiert vorliegt, gibt es weitere bekannte polysialylierte Proteine, die teilweise eine wichtige Rolle für das Immunsystem spielen.

Die Proteine CCR7 und Neuropilin2 sind polysialylierte Proteine, die unter anderem an der Oberfläche von dendritischen Zellen zu finden sind. CCR7 ist ein zentraler Chemokinrezeptor, der für die Immunzellwanderung von dendritischen Zellen zu ihren sekundär lymphatischen Organen verantwortlich ist [Kiermaier et al, 2016]. Die Modifikation von CCR7 mit PolySia ist essentiell für die Erkennung des CCR7-Liganden CCL21 (Chemokin). Ohne die Interaktion von CCR7 mit CCL21, zum Beispiel in einem Polysialyltransferase-defizienten Stamm, ist es den dendritischen Zellen nicht möglich, ihre sekundär lymphatischen Organe zu erreichen und auf vorliegende Entzündungen zu reagieren. Die Struktur-Funktions-Analyse von Chemokin-Rezeptor-Interaktionen konnte zeigen, dass CCL21 in einer autoinhibierten Konformation

vorliegt. Bei der Interaktion von CCL21 mit PolySia kommt es nun zu einer Konformationsänderung, die zu einer Aktivierung von CCL21 führt [Kiermaier et al, 2016].

Weiterhin ist bekannt, dass Neuropilin2 die chemotaktische Migration von humanen dendritischen Zellen in Richtung des Chemokins CCL21 fördert, eine Funktion, die zwingend auf die Anwesenheit von PolySia angewiesen ist. Es konnte gezeigt werden, dass Neuropilin2 nur von der Polysialyltransferase ST8SiaIV erkannt werden kann [Rollenhagen et al, 2013].

SynCAM1 (*synaptic cell adhesion molecule*), E-Selektin-Ligand1 und St8SiaII/IV stellen weitere bisher bekannte polysialylierte Proteine dar. SynCAM1 ist ein synaptisches Zelladhäsionsmolekül, welches außerdem die Synapsenbildung induziert [Galuska et al, 2010]. Bei E-Selektin-Ligand 1 wurde eine Freisetzung von PolySia nach Lipopolysaccharid (LPS) -Induktion in Makrophagen beobachtet. Das lösliche PolySia ist nun in der Lage, das durch LPS-Induktion entstandene Stickstoffmonoxid und die proinflammatorischen Zytokine zu reduzieren. Auch hier zeigt PolySia erneut einen großen Einfluss auf das Immunsystem [Werneburg et al, 2016].

St8SiaII und St8SiaIV sind die einzigen bereits bekannten Polysialyltransferasen. Diese sind zudem in der Lage sich selbst mit α -2,8-verlinkten Polysialinketten zu modifizieren (Autopolysialylierung). Dies ist jedoch nicht notwendig für ihre enzymatische Aktivität [Close et al, 2001].

2003 fanden Yabe *et al* ein neues PolySia-haltiges Glykoprotein in humaner Milch und identifizierten es als CD36. In weiteren Versuchen konnten sie zeigen, dass die Polysialylierung von CD36 nicht nur in humaner Milch zu finden ist, sondern auch in der Milch von Mäusen [Yabe et al, 2003]. Yabe *et al* beschrieben weiterhin, dass PolySia-CD36 in Milch in jedem Laktationsstadium sezerniert wird und seinen Höhepunkt einen Monat nach der Geburt erreicht. Es wird daher angenommen, dass PolySia-CD36 in Milch für die Entwicklung von Neugeborenen, im Hinblick auf Schutz und Ernährung, von Bedeutung ist [Yabe et al, 2003].

1.4.3 Interaktion von PolySia mit Histonen und Laktoferrin

Das Immunsystem dient auf vielfältige Art und Weise der Abwehr von Pathogenen. Ein großer Bestandteil des angeborenen Immunsystems sind die neutrophilen Granulozyten, die in der Lage sind, verschiedene Mechanismen zur Bekämpfung von Krankheitserregern zu nutzen. Die Phagozytose und Freisetzung antimikrobieller Komponenten durch Degranulation sind typische Aufgaben des Immunsystems. Weiterhin wird ein Mechanismus beschrieben, der durch eine „Selbstmordreaktion“ der

Neutrophilen ausgelöst wird und die Freisetzung von dekondensierter DNA beinhaltet, welche mit antimikrobiellen Molekülen assoziiert vorliegt. Die explosionsartige Freisetzung der geladenen DNA führt zu einem dreidimensionalen DNA-Netzwerk, welches vorkommende Krankheitserreger umgibt und bekämpft. Dieses molekulare Netz wird als NET (*neutrophil extracellular trap*) bezeichnet [Brinkmann, 2018]. Das netzartige DNA-Konstrukt ist zudem mit zahlreichen antimikrobiellen Proteinen wie Laktoferrin und Histonen assoziiert [Brinkmann, 2018].

Letztere stellen nicht nur organisierende und regulierende Elemente des Genoms dar, sondern erfüllen auch Aufgaben außerhalb der Zelle. Neben der Organisation der DNA, sind Histone ebenfalls an der Genregulation durch andere Proteine und Enzyme beteiligt. Sie können in Kernhistone (H2A, H2B, H3 und H4) und verknüpfende Histone (H1) eingeteilt werden [Zlatina und Galuska, 2019]. Histone erfüllen viele unterschiedliche Aufgaben im Zytosol, an der Zelloberfläche und jenseits der Zellmembran in der Extrazellulärflüssigkeit. Ihr Vorkommen in der Extrazellulärflüssigkeit kann durch Nekrose, Apoptose oder NETose bedingt sein [Zlatina und Galuska, 2019].

Histone besitzen, wie viele andere antimikrobielle Proteine, eine positive Ladung und sind in der Lage, mit negativ geladenen Zellmembranen zu interagieren. Mit diesen Eigenschaften erkennen und zerstören sie pathogene Mikroorganismen, wie Bakterien. Sie sind jedoch nicht nur toxisch für Krankheitserreger, sondern auch für körpereigene Zellen und sind eventuell durch ihre zytotoxischen Eigenschaften an der Entstehung von verschiedenen Krankheiten, wie Autoimmunerkrankungen (systemische Lupus erythematoses), Thrombose oder Sepsis, beteiligt [Saffarzadeh und Preissner, 2013].

Ein weiterer wichtiger Faktor bei der NETose ist das genannte Laktoferrin [Okubo et al, 2016]. Laktoferrin ist ein multifunktionelles, antimikrobiell wirkendes, eisenbindendes Glykoprotein, welches das Immunsystem reguliert und unterstützt [Zlatina und Galuska, 2020]. Durch die starke Eisenbindung schafft Laktoferrin eine eisenarme Umgebung und reduziert somit das Bakterienwachstum. Laktoferrin konnte sowohl in Körperflüssigkeiten wie Blut und Samen als auch in hoher Konzentration in Rindermilch nachgewiesen werden [Kühnle et al, 2019a]. Neben den Epithelzellen, gehören die neutrophilen Granulozyten zu den Hauptproduzenten von Laktoferrin. Daher können hohe Laktoferrinkonzentrationen an entzündlichen Hotspots gefunden werden [Kühnle et al, 2019a; Kühnle et al, 2019b].

PolySia wiederum ist ein Interaktionspartner sowohl von Laktoferrin als auch von Histonen [Kühnle et al, 2019b; Zlatina et al, 2018]. PolySia kann, wie auch Laktoferrin, ebenfalls in Milch, Blut und Samen gefunden werden [Kühnle et al, 2019a]. In weiteren Versuchen konnte nachgewiesen werden, dass nicht nur das intakte Protein Laktoferrin

mit PolySia interagiert, sondern auch dessen antimikrobielles Spaltprodukt Laktoferricin. Dies zeigt eine breite antimikrobielle Wirkung gegen Krankheitserreger, wie enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) [Yin et al, 2014]. Die Laktoferricin beinhaltende Domäne von Laktoferrin vermittelt auch die Interaktion mit PolySia. Aus diesem Grund wurde die Auswirkung von PolySia auf die antimikrobielle Aktivität von bovinem Laktoferricin untersucht [Kühnle et al, 2019a]. Interessanterweise hat die Bindung von PolySia, unabhängig von der Kettenlänge, keine Auswirkung auf die antimikrobielle Wirkung von Laktoferricin gezeigt. Somit bindet Laktoferricin PolySia ohne inaktiviert zu werden und behält seine schützende Wirkung als antimikrobielles Peptid. Die Fähigkeit von PolySia, Laktoferricin zu binden und nicht zu inaktivieren, könnte die Entwicklung neuartiger endogener und biologisch abbaubarer polysialylierter Oberflächen und/oder Hydrogele erlauben, die mit dem antimikrobiellen Peptid Laktoferricin, beladen werden können. Dies könnte für biomedizinische Anwendungen in der Veterinär- und Humanmedizin relevant sein [Kühnle et al, 2019a]. In weiteren Versuchen konnte gezeigt werden, dass im Menschen die Freisetzung von NET durch Laktoferrin gehemmt werden kann. Es wurde beschrieben, dass Laktoferrin eine „Hülle“ um aktivierte Neutrophile bilden und somit die Freisetzung von NETs unterdrücken kann. Dieser Effekt kann durch PolySia unterstützt werden [Kühnle et al, 2019b].

Weiterhin scheint PolySia die Bindung von Laktoferrin an die DNA bei bereits freigesetzten NET-Filamenten modulieren zu können. Dies scheint möglich, da sowohl die DNA als auch PolySia hauptsächlich mit der N-terminalen Domäne von Laktoferrin interagieren [Kühnle et al, 2019a].

Zusätzlich interagiert PolySia, wie bereits erwähnt, ebenfalls mit Histonen. Ihre antimikrobielle Fähigkeit konnte nicht nur in Säugetieren, sondern auch in Insekten, Fischen, Amphibien und Vögeln nachgewiesen werden [Kühnle et al, 2019a].

Hohe Konzentrationen von extrazellulären Histonen sind, wie bereits beschrieben, an der Entstehung von verschiedenen Erkrankungen beteiligt und stellen somit negative Eigenschaften der Immunreaktion dar [Saffarzadeh et al, 2012]. PolySia scheint in der Lage, Interaktionen von Histonen untereinander und/ oder die Aktivität der Histone, in einer Kettenlängen-abhängigen Art und Weise, zu beeinflussen [Zlatina et al, 2017]. Interessanterweise scheint PolySia die zytotoxischen Eigenschaften der Immunreaktion, wie die Zerstörung körpereigener Zellen, zu reduzieren. Weiterhin zeigen alle Histone in der Abwesenheit von PolySia antimikrobielle Eigenschaften [Zlatina und Galuska, 2019]. Bemerkenswerterweise, hat die Anwesenheit von PolySia nur bei einigen Histonen Einfluss auf deren antimikrobiellen Eigenschaften. Bei den Histonen H1, H2A und H2B konnte in Gegenwart von PolySia

keine Aufhebung der antimikrobiellen Eigenschaften erkannt werden. Lediglich die antimikrobielle Aktivität von Histon H3 konnte durch PolySia vollständig gehemmt werden. Dies ist jedoch höchstwahrscheinlich im Kontext von NET zu vernachlässigen, da H2A und H2B hier die Hauptfraktion, mit ca. 70%, stellen und die Menge von H3 nur einen geringen Anteil ausmacht [Kühnle et al, 2019a; Zlatina und Galuska, 2019].

Zusammenfassend bedeutet das, dass PolySia die Histon-vermittelte Zellschädigung bei eukaryotischen Zellen vermindern kann, ohne die antimikrobielle Aktivität der Histone zu beeinflussen [Zlatina und Galuska, 2019].

1.4.4 Weitere Beispiele für das Vorkommen von PolySia

PolySia ist nicht nur dafür bekannt, eine wichtige Rolle bei der Hirnentwicklung von Wirbeltieren zu spielen und die Plastizität des Nervensystems in Vertebraten zu kontrollieren, bzw. Zell-Zell und Zell-Matrix-Adhäsionen zu modulieren, [Schnaar et al, 2014] sondern PolySia ist auch dafür bekannt, Tumorwachstum und Metastasenbildung zu fördern [Falconer et al, 2012; Harduin-Lepers et al, 2012; Kiermaier et al, 2016]. Beim Umbau zu malignen Zellen sind diese in der Lage, die Expression der Sialyltransferase zu erhöhen. Dies resultiert in der Akkumulation von Sialinsäuren auf ihrer Zelloberfläche. Durch die stark negative Ladung der Sialinsäure auf der Zelloberfläche, stoßen sich nun die Zellen stärker ab und lösen sich aus dem Zellverband. Dies führt zu einer erleichterten Metastasierung [Büll et al, 2015].

PolySia ist außerdem in der Glykokalyx einiger pathogenen Bakterien (*E. coli*) zu finden [Varki und Schauer, 2009]. Durch dieses Homopolymer sind sie in der Lage in den Menschen einzudringen, ohne dabei erkannt zu werden, da sie vorgeben, körpereigene PolySia-besetzte Zellen zu sein. PolySia-positive Pathogene können zu invasiven Krankheiten, wie zum Beispiel Meningitis oder schwerwiegenden Harnwegsinfektionen, führen [Ferrero und Aparicio, 2010].

Bislang wurden drei verschiedene PolySia-Strukturen in Bakterien gefunden. Zuerst die α -2,8-verknüpfte Neu5Ac, die zum Beispiel vom Gram-negativen Bakterium *Escherichia coli* (*E.coli*) K1 gebildet wird. Als zweites existiert die α -2,9-verknüpfte PolySia, die von dem neuroinvasiven Bakterienstamm *Neisseria meningitidis* produziert wird. Die dritte Gruppe wird vom *E. coli* K92-Stamm gebildet und hat eine abwechselnde α -2,8-/ α -2,9-verknüpfte Struktur. Das Homopolymer aus α -2,9-verknüpften Neu5Ac-Resten wurde als hoch wirksames Immunogen beschrieben. Somit kann dieses Polymer, was während des Bakterienwachstums generiert wird, als effektiver Impfstoff zum Schutz gegen Meningokokken-Infektionen verwendet werden [Ferrero und Aparicio, 2010]. Im Gegensatz dazu sind die α -2,8-verknüpften PolySia-

Strukturen auf den Bakterienoberflächen so gut wie gar nicht immunogen und können nicht vom menschlichen Körper erkannt werden. Diese besitzen eine hohe Ähnlichkeit zum menschlich synthetisierten NCAM [Ferrero und Aparicio, 2010].

1.5 Polysialyltransferase St8SialII und St8SialIV

Humane Sialyltransferasen sind eine Familie von mindestens 18 verschiedenen intrazellulär liegenden, Golgi-Membran-gebundenen, Glykosyltransferasen, die an der Synthese von PolySia beteiligt sind [Harduin-Lepers et al, 2001].

Die Polysialylierung ist eine seltene posttranslationale Modifikation. Wie bereits erwähnt, wird in Säugetieren PolySia von zwei bekannten α -2,8-Polysialyltransferasen, St8SialII und St8SialIV, synthetisiert [Angata et al, 2004]. Beide Enzyme katalysieren den Transfer von Sialinsäure über eine α -2,8-Verbindung an andere Sialinsäurereste und elongieren den PolySia-Strang mit dem CMP-Sia als Donorsubstrat [Sato und Kitajima, 2013, Galuska et al, 2006; Kiermaier et al, 2016].

Von den Monosialyltransferasen unterscheiden sich St8SialII und St8SialIV deutlich [Troy, 2004]. Beide Polysialyltransferasen enthalten eine spezifische Aminosäuredomäne, bestehend aus 32 Resten, mit einer angrenzenden Sialylmotif-S-Domäne. Diese kationische Domäne ist essentiell für die Polysialylierung und kann für therapeutische Zwecke verwendet werden, um die PolySia-Synthese zu inhibieren. Dies ist wichtig, da die PolySia-Expression unter anderem für die Metastasierung von Tumorzellen, erforderlich ist [Nakata et al, 2006; Wang, 2009].

Anhand eines Mausmodels konnte gezeigt werden, dass bei St8SialII oder St8SialIV negativen Tieren ein Teilverlust von PolySia zu sehen war. Bei einem Knockout von beiden Polysialyltransferase-Genen (*st8sialII* und *st8sialIV*), war jedoch bei den Mäusen kein PolySia mehr nachweisbar. Diese Doppel-Knockout-Mäuse zeigten postnatale Wachstumsstörungen, einen Hydrozephalus, Hirndefekte und einen frühzeitigen Tod. 80% aller Doppel-Knockout-Mäuse starben in den ersten vier Wochen nach Geburt [Weinhold et al, 2005].

Ein weiteres Mausmodel zeigte, dass St8SialII im embryonalen und postnatalen Stadium das dominante Enzym darstellt. Im adulten Stadium hingegen wurde überwiegend St8SialIV exprimiert [Hildebrandt et al, 1998; Wang, 2009].

Das *st8sialIV*-Gen liegt stark exprimiert in der Lunge, dem Hirn, dem Herzen und der Milz vor [Yoshida et al, 1995; Krocher et al, 2015]. Die Expression von St8SialII hingegen wurde, außer in der Lunge, dem Hirn, dem Herz und der Milz, auch im Thymus und im Dünndarm beschrieben [Krocher et al, 2015; Tanaka et al, 2000].

Vor meinen Studien ist nicht bekannt gewesen, ob in Milchdrüsenzellen Polysialyltransferasen exprimiert werden und somit den Ursprung von PolySia in der Milch darstellen oder ob PolySia aus dem Blut über das Milchdrüsenepithel nur transferiert wird.

1.6 Aufbau des bovinen Euters

1.6.1 Anatomie der laktierenden Milchdrüse

Die laktierende Milchdrüse besteht aus einem verzweigten Netzwerk von Gängen, die in großen Clustern, den Alveoli, enden, wo die Milchsekretion stattfindet. Eine einzige Schicht aus sekretorischen Epithelzellen umgibt jeden Alveolus innerhalb dieser Cluster [McManaman und Neville, 2003]. In Abbildung 4 ist der Verlauf der Milchsekretion schematisch dargestellt.

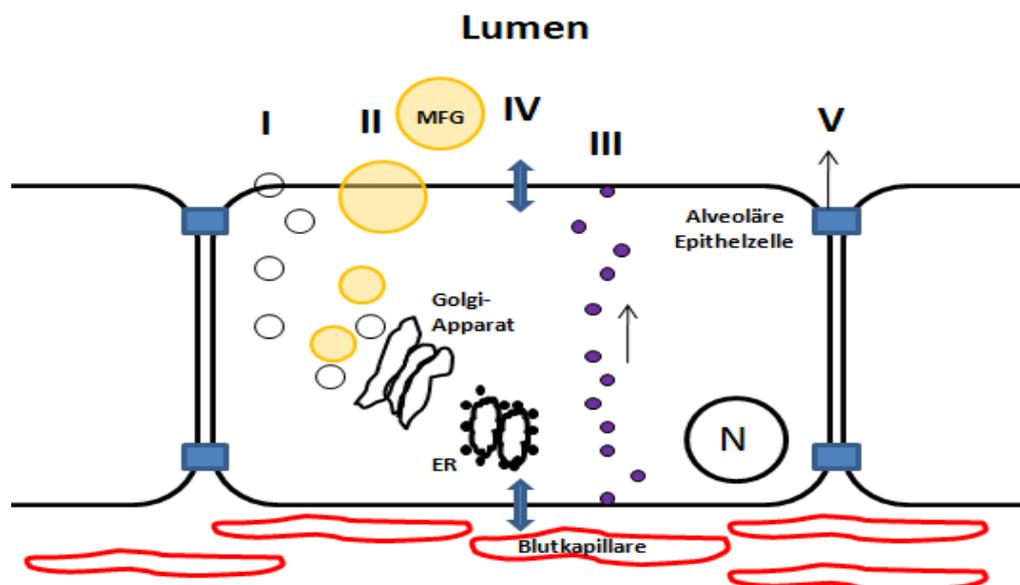


Abbildung 4. Milchsekretion: Dieses Diagramm zeigt den Verlauf der Milchsekretion. Die Milch wird durch die alveolären Epithelzellen in das Lumen sekretiert und anschließend mit Hilfe der Myoepithelzellen durch die Milchgänge geleitet. Pfad (I) zeigt die Exozytose von Milchproteinen, Calcium, Laktose und anderen Komponenten ins Lumen. Pfad (II) zeigt die Fettsekretion ins Lumen (MFG: milk-fat-globule). Pfad (III) zeigt die Transzytose von z.B. Immunglobulinen aus dem interstitiellen Raum. Pfad (IV) zeigt Transporter, die dafür verantwortlich sind, dass Wasser, Ionen und Glukose sowohl die apikale als auch die basale Membran überwinden können. Pfad (V) zeigt den parazellulären Transport für Plasmakomponenten und Leukozyten. Die Zellen sind untereinander mit Zell-Haftstrukturen, wie „Tight- und Adhärenz- Haftstrukturen“, verbunden (blaue Vierecke). Der parazelluläre Pfad ist nur während der Schwangerschaft und bei Entzündungen (wie der Mastitis) geöffnet. Bilderklärung: ER: Endoplasmatisches Retikulum, N: Nucleus; Blaue Vierecke: Zell-Haftstrukturen bestehend aus „Tight- und Adhärenz-Haftstrukturen“. Abbildung selbst erstellt anlehnend an [McManaman und Neville, 2003].

Die Alveoli, mit ihren sekretierenden Epithelzellen, sind von Myoepithelzellen umgeben. Deren Aufgabe ist es, die Milchejektion aus den Alveoli und Gängen in Richtung der Papillae mammae (Zitze/Brustwarze) voranzubringen. Dies wird durch Oxytozin, was aus dem Hypophysenhinterlappen durch den sauginduzierten neurokrinen Reflex freigesetzt wird, ausgelöst [McManaman und Neville, 2003].

Das drüsenhaltige Gewebe, welches hauptsächlich aus tubuloalveolären Drüsen besteht, setzt sich aus zwei Hauptkomponenten zusammen. Erstens das Parenchym, welches aus Epithel- und Myoepithelzellen besteht und zweitens das Stroma, welches unter anderem Kollagen, Elastin, glatte Muskelzellen, Gefäße und das Drüsensystem, enthält [Nickel et al, 1981; Lérias et al, 2014].

Gesunde, nicht-infizierte Milch von Milchkühen besteht zu 12-14% aus Feststoffen. Davon sind 2,5-4% Proteine, 3-5% Fette und ca. 5% Laktose [Osorio et al, 2016].

1.6.2 Stadien des Laktationszyklus

Die Brust- bzw. Milchdrüse verändert sich während des Laktationszyklus. Dies ist hauptsächlich durch das neuroendokrine System bedingt. Es gibt drei Abschnitte, die den Laktationszyklus charakterisieren: Proliferation, Sekretion und Involution [Knight & Peaker, 1984].

Zu Beginn der Schwangerschaft kommt es zur Proliferation von Sekretionsgewebe. In der Sekretionsphase kommt es zum Säugen des Kalbes und die Involution findet am Ende der Sekretionsphase statt bzw. dann, wenn das Kalb nicht mehr gesäugt wird [Knight & Peaker, 1984; Lérias et al, 2014].

Die erste Milch, die bei Säugetieren von der Brustdrüse in den ersten 24-48 Stunden nach der Geburt produziert wird, wird Kolostrum genannt [Tokuyama, 1990; Stelwagen et al, 2009]. Da im Kolostrum außer Lipiden und Proteinen viele zusätzliche Inhaltsstoffe, wie z.B. Immunglobuline und Laktoferrin, vorhanden sind, erhöht sie die Immunität des Neugeborenen. Sowohl das humane als auch das bovine Kolostrum ist eine dickflüssige, klebrige, gelbliche Masse, welches Antikörper in einer höheren Konzentration enthält als reife humane oder bovine Milch [Shah, 2000; Bagwe et al, 2015].

1.6.3 Veränderung des Gewebes unter infektiösen Bedingungen

Ein Kuheuter wird anatomisch in vier Viertel eingeteilt. Jedes dieser Viertel besitzt eine Milchdrüse und mindestens eine Zitze [Gill et al, 2006].

Der mikroskopische Aufbau einer menschlichen Brust ist dem Aufbau des bovinen Euters ähnlich. Normalerweise ist der Zitzenkanal fest durch sogenannte Sphinktermuskeln, die das Eindringen der Pathogene verhindern, verschlossen. Dieser Kanal ist ausgekleidet mit Keratin, welcher das Eindringen von Mikroorganismen, wie Bakterien, verhindert. Weiterhin enthält Keratin antimikrobielle Stoffe (wie zum Beispiel langkettige Fettsäuren), die zur Bekämpfung von Infektionen beitragen [Viguier et al, 2009]. Trotzdem ist die Wirksamkeit von Keratin, als Barriere, beschränkt [Capuco et al, 1992; Craven und Williams, 1985; Paulrud, 2005]. Flüssigkeit akkumuliert in der Milchdrüse kurz vor dem Gebären eines Kalbes. Hierdurch entsteht ein zunehmender intramammärer Druck, was dazu führt, dass sich der Zitzenkanal weitet. Somit haben es Mikroorganismen deutlich leichter das Euter zu infizieren und unter Umständen stark zu beschädigen [Paulrud, 2005; Sordillo und Streicher, 2002]. Während des Melkvorganges wird zusätzlich das Keratin hinausgespült und es kommt zu einer Dehnung des Zitzenkanals. Der Sphinkter benötigt anschließend ca. zwei Stunden, um in seinen ursprünglichen kontrahierten Zustand zurückzukehren [Capuco et al, 1992; Rainard und Riollet, 2006; Viguier et al, 2009].

Nach dem Eindringen der Bakterien müssen diese den Immunmechanismen im Euter entkommen [Sordillo und Streicher, 2002]. Wenn ihnen dies gelingt, sind sie in der Lage, sich sehr schnell in der Milchdrüse zu vermehren. Sie setzen Toxine frei und veranlassen Leukozyten und Epithelzellen wiederum dazu, Chemoattraktantien freizusetzen. Diese beinhalten Zytokine, verschiedene Interleukine, Sauerstoffradikale und Akute-Phase-Proteine (zum Beispiel Haptoglobin). Diese wiederum locken Immunzellen, wie zum Beispiel polymorphkernige Neutrophile (PMNs), an den Infektionsort [Zhao und Lacasse, 2008; Viguier et al, 2009].

PMNs zerstören die Bakterien durch sauerstoffabhängige und –nichtabhängige Vorgänge. Intrazellulär besitzen sie Granula, die bakterizide Peptide, Proteine und Enzyme beinhalten und bei Bedarf freigesetzt werden können [Owen und Campbell, 1999; Viguier et al, 2009]. Diese zerstören nicht nur die Bakterien, sondern auch, nach Freisetzung ihrer Granula, einige der umgebenden Epithelzellen. Dies wiederum führt zu einer geringeren Milchproduktion in dem infizierten Drüsenbereich. Die toten Milchdrüsenepithelzellen und Leukozyten werden anschließend in die Milch abgegeben und können je nach Infektionsgrad mit bloßem Auge zu sehen sein [Viguier et al, 2009].

Bei längerer Infektion kann es zur Schwellung des Milchdrüsenepithels kommen. Die Milchdrüsenalveolen werden beschädigt und verlieren ihre anatomische Integrität. Weiterhin kann bei schlimmeren Infektionen die Blut-Milch-Barriere durchbrochen werden und somit Blut in der Milch gefunden werden [Zhao und Lacasse, 2008].

Spätestens zu diesem Infektionszeitpunkt wird die Entzündung in der Milch makroskopisch sichtbar. Auch sind zu diesem Zeitpunkt andere Milchveränderungen nachweisbar, wie zum Beispiel ein erhöhter pH, eine Zunahme des Wassergehaltes in der Milch, oder sichtbare Eiterflocken. Wenn diese Infektion nicht behandelt wird, kann es bis zum Tod des Tieres führen [Zhao und Lacasse, 2008; Viguier et al, 2009].

1.6.4 Hausrinder im Vergleich

Das Holstein Friesian, wie auch das Dexter-Rind, gehört zur Rasse des Hausrindes. Das Holstein Friesian, welches in Deutschland die bekannteste und am häufigsten gehaltene Rinderrasse ist, gehört zu den Hochleistungskühen. Diese sind in der Lage 50 Liter Milch pro Tag, oder mehr, zu produzieren [Arbeitsgemeinschaft Süddeutscher Rinderzucht- und Besamungsorganisationen]. Im Gegensatz zu der bedeutend kleineren Dexter-Rasse, die ursprünglich aus Irland stammt und in Deutschland eher unbekannt ist, wird das Holstein Friesian hauptsächlich für die Milchproduktion gehalten [Arbeitsgemeinschaft Süddeutscher Rinderzucht- und Besamungsorganisationen]. Das Dexter-Rind wird im Gegensatz dazu hauptsächlich als Fleischkuh gehalten und gilt als kleinste Rinderrasse Europas (ca. einen Meter groß). Weiterhin wird ihre Milch in den meisten Fällen für die Aufzucht der Jungtiere verwendet. Demnach werden sie, im Gegensatz zum Holstein Friesian, nicht von ihrem Nachwuchs getrennt. Die Milchleistung pro Tag wird auf ca. 6-10 Liter geschätzt. Dies ist ca. 1/5 der Milchproduktion des Holstein Friesians [Dexter Verband Deutschland e.V.; Bundesrasseverband Deutscher Dexter-Züchter und -Halter e.V.].

1.7 Mastitis

1.7.1 Humane Mastitis

Die Entzündung der Brust, auch Mastitis genannt, kann sowohl durch eine Infektion mit Bakterien als auch ohne bakterielle Infektion ausgelöst werden [Boakes et al, 2018; Amir, 2014]. Mastitis ist eine sehr häufig auftretende Infektion bei stillenden Müttern, die meist in den ersten fünf Monaten nach Geburt des Kindes auftritt [Dixon und Khan, 2011]. Die Mastitis variiert stark in der Ausprägung. Sie kann milde Symptome mit nur lokalen Entzündungszeichen, wie zum Beispiel Rötung, Wärme und Schmerzempfindlichkeit hervorrufen [Amir, 2014; Boakes et al, 2018]. Jedoch kann die Mastitis sich auch mit starken Symptomen wie Fieber, Abszessen und, im schlimmsten Fall, mit einer Sepsis bemerkbar machen. In schlimmeren Fällen ist die Mastitis mit

einem längeren Krankenhausaufenthalt verbunden. Außerdem kann es zu einer vorübergehenden Abnahme der Milchsekretion kommen [Boakes et al, 2018].

1.7.2 Bovine Mastitis

Die höchste Gefahr für eine Kuh an intramammären Infektionen zu erkranken, besteht kurz nach der Geburt eines Kalbes [Pyörälä, 2008]. Die Faktoren, die die Anfälligkeit der Brustdrüse für eine Mastitis bestimmen, sind abhängig von den Bakterien, die auf der Brustwarze sitzen, von der Effizienz der Abwehrmechanismen des Brustkanals und der Abwehrmechanismen im Euter [Sordillo et al, 1995]. In der Trockenphase, also vor Milcheinschuss, ist das Euter sehr resistent gegen Infektionen. In der nicht-laktierenden Milchdrüse ist die Konzentration an löslichen Faktoren sehr hoch und die Abwehr von Infektionen sehr gut [Burvenich et al, 2007; Pyörälä, 2008].

1.7.3 Mastitismilch

Mastitis ist eine der bedeutendsten Krankheiten der Milchkühe weltweit. Diese Krankheit hat einen großen Effekt auf die Milchquantität und –qualität. Die akute Mastitis ist die Krankheit, die bei Milchkühen am häufigsten letal verläuft [Eckersall et al, 2001; De Graves and Fetrow 1993].

Das Besiedeln der bovinen Milchdrüse mit pathogenen Bakterien resultiert in einer veränderten Zusammensetzung der von den Gewebezellen synthetisierten Milch [Kitchen, 1981]. Die Anzahl der Bakterien in der Milch nimmt stark zu und es kommt außerdem zu einer Zunahme von somatischen Zellen. Der Milchertrag sinkt als Resultat von stark beschädigtem Sekretionsgewebe [Kitchen, 1981].

Die Diagnose von klinischer Mastitis wird zuerst durch das Beobachten und Abtasten des Kuheuters gestellt. Anschließend wird eine kleine Menge Milch entnommen und untersucht. In dieser Milch sind bei einer Mastitis-Infektion Gewebereste und Eiterflocken zu finden [Eckersall et al, 2001]. Die Milchfarbe reicht von weißer, wässriger Milch, bis zu gelber, bzw. zu roter, mit Blut versetzter, Milch. Auch die Konsistenz kann sich von reifer Milch stark unterscheiden. Weiterhin kann man in dieser infektiösen Milch inflammatorische Proteine, wie Leukotriene und/oder Interleukine, finden. Diese können auch in optisch gesunder Milch auftreten [Eckersall et al, 2001].

Akute-Phase-Proteine sind eine Gruppe von Serumproteinen, die sich bei Infektionen bzw. Entzündungen stark von der ursprünglichen Konzentration unterscheiden. Das sensitivste Akute-Phase-Protein im Hausrind ist das Haptoglobin und das Serum-

Amyloid A. Diese können bei einer akuten Infektion, wie einer starken Mastitis, um das 100fache ansteigen und sind in der Milch zu finden [Eckersall et al, 2001; Ogola et al, 2007].

1.7.4 Unterschiede zwischen Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien in der Milch

Die Zellwand von Gram-negativen Bakterien, wie *Escherichia coli* (*E. coli*), besteht aus einer dünnen Schicht von Peptidoglykanen im periplasmatischen Raum, zwischen der inneren und äußeren Lipidmembran. Die Außenmembran enthält Lipopolysaccharide auf ihrer äußersten Schicht [Brown et al, 2015].

Bei Gram-positiven Bakterien, wie *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), fehlt gänzlich die Außenmembran. Diese besitzen eine einzige Lipidmembran, die durch die Zellwand, bestehend aus einer dicken Schicht aus Peptidoglykanen und Lipoteichonsäure, umgeben ist [Brown et al, 2015].

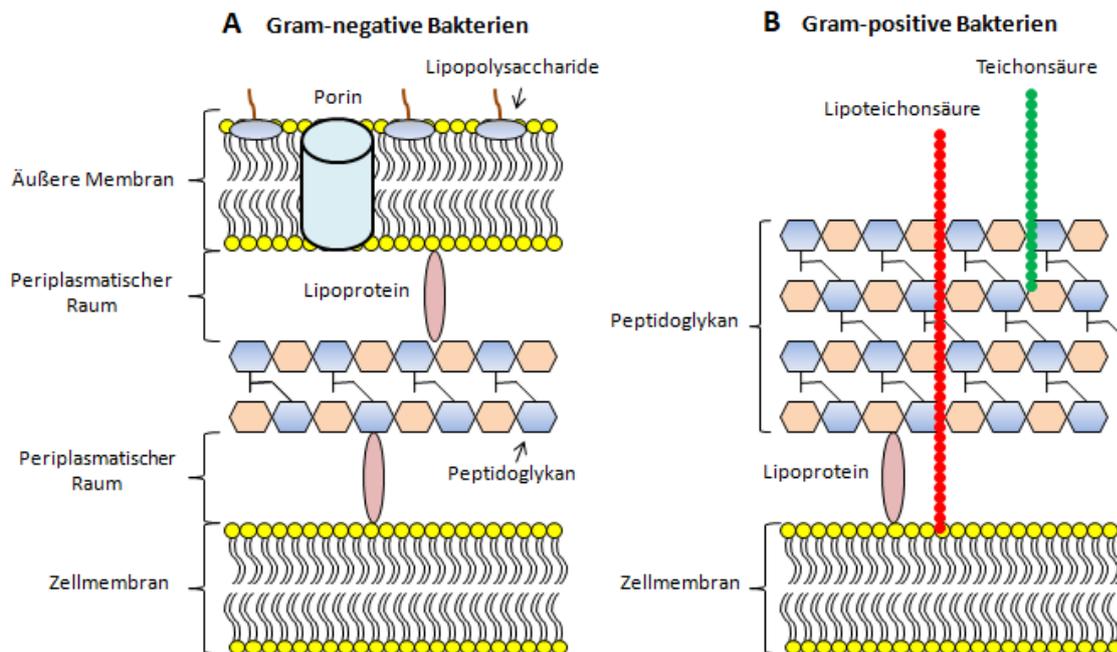


Abbildung 5. Unterschiede im Aufbau zwischen Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien:

Dargestellt sind die Unterschiede zwischen Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien. Gram-negative Bakterien (A), wie zum Beispiel *E. coli*, besitzen auf der Außenmembran Lipopolysaccharide. Die Peptidoglykanschicht ist sehr dünn. Im Gegensatz dazu besitzen Gram-positive Bakterien (B) (*S. aureus*) eine dicke Peptidoglykanschicht. Eine Außenmembran, wie bei den Gram-negativen Bakterien, existiert nicht. Ebenfalls sind hier keine Lipopolysaccharide zu finden. Die Abbildung wurde selbst angefertigt, basierend auf [Brown et al, 2015].

Das Immunsystem ist wichtig, um in den Körper eingedrungene Pathogene am Vermehren zu hindern und schließlich möglichst abzutöten. Einer der ersten Schritte, um das Immunsystem des Wirtes zu aktivieren, ist die Erkennung von Pathogenspezifischen Eigenschaften. Phagozyten erkennen diese hoch konservierten Eigenschaften (auch PAMPS (*pathogen-associated molecular patterns*) genannt) und setzen eine Kaskade in Gang, welche letztendlich zur Aktivierung des adaptiven Immunsystems führt. Eins der bekanntesten PAMPS ist das Endotoxin Lipopolysaccharid (LPS), welches, wie bereits beschrieben, nur auf der äußeren Membran von Gram-negativen Bakterien zu finden ist und eine starke Immunantwort, bei Infektion mit Gram-negativen Pathogenen, auslöst. Gram-positiven Bakterien fehlt das LPS. Diese produzieren jedoch andere PAMPS, wie die Lipoteichonsäure [Wright et al, 1990; Takeda et al, 2003; Branger et al, 2004].

1.7.5 Erreger der Mastitis

Die Mastitis ist bei Milchbauern eine häufige und gefürchtete Erkrankung der Milchkühe. Bei sehr starker Infektion ist die Milchproduktion verringert und die Qualität der Milch nimmt ab. Es finden sich weniger Casein-Proteine in der Milch, jedoch eine hohe Anzahl von Serumproteinen und Gewebezellen. Bei akuten oder chronischen Erkrankungen der Milchdrüse können die Milch-sekretierenden Alveolarzellen beschädigt oder zerstört werden. Somit kann sich das Gewebe nicht mehr erholen, was in einer permanent verminderten Milchproduktion resultiert [Brouillette und Malouin, 2005].

Die Mastitis kann durch eine hohe Anzahl an Bakterienspezies ausgelöst werden. Die häufigsten Pathogene bei einer Mastitis sind *E. coli*, *S. aureus* und *S. uberis* [Eckersall et al, 2001].

1. Escherichia coli

E. coli verursacht Infektionen und Entzündungen der Milchdrüse bei Milchkühen. Diese Infektionen entstehen am häufigsten kurz nach der Geburt des Kalbes, bzw. in den ersten Wochen danach. *E. coli*- Infektionen bereiten häufig sehr starke systemische Symptome, wie zum Beispiel hohes Fieber. Gerade bei *E. coli*- Infektionen kommt es zum starken Produktionsverlust von Milch und häufig zum Tod der Kühe. Die Gram-negativen Bakterien wandern über die Zitzenöffnungen in das Euter ein und erzeugen eine starke akute Entzündung. Die Anzahl an Neutrophilen steigt. Diese Neutrophilen-Infiltration ist eine der ersten Schritte des Immunsystems, um eine Multiplikation der

Pathogene zu verhindern und einer noch stärkeren Infektion zu entkommen [Burvenich et al, 2003].

Die Pathogenese einer *E. coli*- Infektion unterscheidet sich deutlich von anderen Pathogenen. Es ist bekannt, dass bei enterotoxischen *E. coli*- Stämmen (ETEC) die Besiedlung der intestinalen Mukosa in Beziehung zu der Expression von verschiedenen unterschiedlichen proteinartigen Oberflächenstrukturen, wie zum Beispiel Kolonisierungsfaktoren, steht. Diese Faktoren sind in der Lage, spezifische Rezeptoren an der intestinalen Epitheloberfläche zu erkennen. Die Pathogenität hängt hauptsächlich von der Expression von Virulenzfaktoren ab. Ein wirksamer Faktor in der Pathogenese von *E. coli* ist das Lipopolysaccharid (LPS) [Burvenich et al, 2003]. Lipid A (Endotoxin), der hydrophobe Anker von LPS, ist ein Glukosamin-basiertes Phospholipid, welches in der äußeren Schicht der äußeren Membran zu finden ist. Dieses findet man bei den meisten Gram-negativen Bakterien, wie zum Beispiel *E. coli* [Raetz und Whitfield, 2002].

Einige Antibiotika, die extrem toxisch auf Gram-positive Bakterien wirken, wirken nur in sehr hohen Konzentrationen letal auf Gram-negative Bakterien. Dies ist bedingt durch die Oberflächenstruktur von Gram-negativen Bakterien, die das Eindringen der Antibiotika nicht zulässt [Tamaki et al, 1971]. Es wurde festgestellt, dass durch ein mutiertes Lipopolysaccharid, die Antibiotikaresistenz akut abnimmt. Somit wurde LPS ebenfalls als wichtiger Faktor für die Antibiotikaresistenz ermittelt [Tamaki et al, 1971, Delcour, 2009].

LPS induzieren bei Säugetieren Abwehrmechanismen und sind gleichzeitig toxische Verbindung. Die pathophysiologischen Effekte von LPS in Wiederkäuern sind dosisabhängig und führen zu verschiedenen Symptomen [Burvenich et al, 2003]. Bei hohen LPS-Konzentrationen kann es zu einer erhöhten Bildung von Stickstoffmonoxid im Körper kommen. Dies führt zu einem absinkenden Blutdruck, was bis zum septischen Schock führen kann. Außerdem ist LPS dafür bekannt, weitere systemische Reaktionen des Körpers, wie Fieber, auszulösen [Hallemeesch et al, 2003; Leon et al, 1999].

2. Staphylococcus aureus

S. aureus ist heutzutage einer der häufigsten bovinen Mastitiserreger [Fox et al, 2001]. Das Gram-positive Bakterium ist in der Lage eine starke Mastitis zu erzeugen. In den meisten Fällen induziert eine *S. aureus*- Infektion des bovinen Euters jedoch eine subklinische Infektion. Diese verläuft häufig chronisch, da sie schwer mit konventioneller Antibiotikatherapie zu heilen ist. Im Gegensatz zu *E. coli*- Infektionen,

ist die Immunantwort auf die Infektion häufig ungenügend [Sears und McCarthy, 2003; Brouillette und Malouin, 2005].

Wie auch bei *E. coli*- Infektionen ist bei einer *S. aureus*- Infektion die somatische Zellzahl in der Milch häufig erhöht. Optische Veränderungen in der Milch oder am Euter sind jedoch häufig nicht zu erkennen [Petersson-Wolfe et al, 2010]. Die Bakterien persistieren in den Milchdrüsen, in den Milchgängen und auf Zitzenläsionen. Diese Infektion beginnt meist nur in einem Viertel des Euters und kann sich durch Melkgeräte, Fliegen, oder durch infizierte Menschenhände, auf weitere Viertel bzw., im schlimmsten Fall, auf das ganze Euter ausbreiten [Petersson-Wolfe et al, 2010]. Durch das schlechte Ansprechen auf eine Antibiotikabehandlung muss die infizierte Kuh von der Herde getrennt werden, um weitere Ansteckungen zu verhindern [Petersson-Wolfe et al, 2010]. Staphylokokken können dauerhaft keine gesunden Zitzen persistieren. Da jedoch häufig Läsionen an den bovinen Eutern zu finden sind, ist eine rasche Ausbreitung möglich [Petersson-Wolfe et al, 2010].

Studien zeigen, dass ca. 3% aller Tiere mit *S. aureus* infiziert sind. *S. aureus* produziert Toxine, die die Zellmembranen zerstören können und außerdem Schäden an dem Milch-produzierenden-Gewebe verursachen können. Leukozyten werden an den Infektionsort gelockt und versuchen eine schlimmere Infektion zu verhindern. Bei langer und starker Infektion können sich Abszesse im Euter bilden. Durch diese sind die Bakterien geschützt und werden schwerer vom Immunsystem erkannt. Außerdem erschweren die Abszesse das Abtöten der Bakterien mit Antibiotika, gegen die wiederum häufig Resistenzen vorliegen [Petersson-Wolfe et al, 2010].

3. Streptococcus uberis

Streptococcus uberis (*S. uberis*) ist, wie auch *E. coli*, ein Bakterium, was umweltbedingt in Kot (Kuhmist) und anderem organischen Material vorkommt. In englischen bovinen Herden sind 2/3 aller schweren Mastitis-Erkrankungen auf diese zwei Pathogene zurückzuführen [Leigh, 1999; Petersson-Wolfe und Currin, 2012].

S. uberis ist ein Gram-positives Bakterium, mit einer Zellwandstruktur, die *S. aureus* gleicht [Petersson-Wolfe und Currin, 2012].

Schlechte Euterpflege und offene Wunden am Euter erhöhen deutlich das Risiko einer Infektion mit *S. uberis*. Zur Prävention ist es wichtig, dass sich die Milchkühe in einer trockenen, sauberen Umgebung befinden, die möglichst mit nicht-organischem Sand ausgelegt ist. Bei akuten Infektionen ist eine lange Antibiotikabehandlung nötig [Petersson-Wolfe und Currin, 2012].

1.7.6 Unterschiede zwischen humaner und boviner Mastitis

Um Unterschiede zwischen einer humanen und bovinen Mastitis zu erkennen, wurden in einer Studie *S. aureus*- Stämme von einer humanen Mastitis und von einer bovinen Mastitis isoliert. Bei der Antibiotikaresistenz wurden Unterschiede beschrieben. Penicillin-resistente Stämme wurden häufiger aus humanen laktierenden Mastitisproben isoliert. Außerdem war eine hohe genetische Diversität unter den Stämmen, bei den stillenden Frauen, zu sehen [Delgado et al, 2011].

In einer weiteren Studie wurden ebenfalls Unterschiede bei *S. aureus*- Stämmen, zwischen boviner und humaner Mastitis, untersucht. Diese Proben stammten jeweils aus Indien. Bei 77% der humanen *S. aureus*-Stämme, wurde eine Methicillin-Resistenz (MRSA) festgestellt. Bei den bovinen Stämmen lag die Methicillin-Resistenz bei nur 29% [Prashanth et al, 2011].

Staphylokokken sind die häufigsten Erreger bei der humanen Mastitis [Marín et al, 2017]. Bei Menschen ist eine *E. coli*- Infektion eher selten, wohingegen bei der bovinen Mastitis häufiger *E. coli* der Erreger ist. Dies liegt vermutlich an den unhygienischen Bedingungen, in denen die Stallkühe leben. Ansonsten ist der Ablauf einer humanen Mastitis der einer bovinen Mastitis sehr ähnlich, sodass die Milchkuh ein gutes Modeltier für eine Mastitis darstellt, um humanmedizinische Fragestellungen zu bearbeiten.

1.8 Sialinsäure in der humanen Ernährung

1.8.1 Interaktion von Pathogenen mit Oligosaccharidsequenzen

Humane Milch enthält große Mengen an Oligosacchariden, die wiederum Sialinsäure enthalten. Es konnte gezeigt werden, dass mikrobielle Pathogene, *in vitro* und *in vivo*, von diesen Oligosacchariden inhibiert wurden. Pathogene im Allgemeinen benutzen häufig Oberflächenkohlenhydrate, um ihren Wirt zu erkennen und an den Zellen zu binden. Es wird beschrieben, dass die Oligosaccharide als „Köder“ für Pathogene wirken können [Wang und Brand-Miller, 2003; Wang, 2009]. Oligosaccharidsequenzen auf löslichen Glykokonjugaten, wie zum Beispiel Muzine, können nämlich ebenfalls von Pathogenen gebunden werden, sodass die Bindung an Zellen kompetitiv inhibiert wird und so die Erreger über den Zilienschlag in der Lunge nach außen befördert werden. Somit sind sie nicht mehr in der Lage ihr eigentliches Ziel, die Mukosazellen, zu erreichen [Wang und Brand-Miller, 2003]. In diesem Fall schafft es der Wirt, die Spezifität des Pathogenrezeptors zu seinem eigenen Vorteil zu nutzen. Sialylierte Oligosaccharide in der humanen Milch agieren als hoch spezifische Rezeptoren für

Viren, Bakterien und Parasiten. Sowohl freie als auch zellgebundene Sialinsäuren verhindern zum Beispiel das Binden des Rotavirus und des Cholera-toxins [Wang und Brand-Miller, 2003].

Stillen zeigt zudem allgemein eine niedrigere Morbiditäts- und Mortalitätsrate, vorallem bei Atemwegsinfektionen und Darmerkrankungen. Auch dies ist darauf zurückzuführen, dass Pathogene leichter an membrangebundene Zellrezeptoren binden können, da Kinder, die mit Muttermilchersatz gefüttert werden, weniger sialylierte Oligosaccharide besitzen, die als „Köder“ für die Pathogene wirken können [Wang und Brand-Miller, 2003].

1.8.2 Unterschiede zwischen humaner Milch, boviner Milch und dem Muttermilchersatz

Die freien Oligosaccharide in der humanen Milch können aus Glukose, Galaktose, Fukose, N-Acetylglukosamin und Sialinsäureresten bestehen. Die Oligosaccharide stehen, nach Laktose und Fett, mengenmäßig an dritter Stelle in der humanen Milch. Die höchste Konzentration ist im Kolostrum zu finden. Aber auch im späteren Laktationsstadium sind weiterhin zahlreiche unterschiedliche sialylierte Oligosaccharide zu finden. Im Gegensatz dazu enthält bovine Milch weniger dieser Oligosaccharide. Auch hier ist eine höhere Konzentration an sialylierten Oligosacchariden im Kolostrum zu finden. Im weiteren Laktationsstadium nimmt die Konzentration jedoch stark ab [Wang und Brand-Miller, 2003].

Humane Milch enthält signifikant höhere Konzentrationen an Sialinsäure als bovine Milch, bzw. Muttermilchersatz. Die Sialinsäurekonzentration in der humanen Milch variiert zwischen den einzelnen Frauen sehr stark. Der Grund dafür ist bislang unbekannt. Es könnte jedoch auf genetische Differenzen in der Synthesekapazität hindeuten oder auf die unterschiedliche Belastung der Frauen mit Pathogenen [Wang und Brand-Miller, 2003; Wang et al, 2007].

In humaner Milch liegen ca. 73% der Sialinsäuren an freien Oligosacchariden gebunden vor. Im Gegensatz dazu kommen beim Muttermilchersatz die meisten Sialinsäuren an Glykoproteinen gebunden vor (70%). Humane Milch enthält außerdem Sialinsäuren, die an Glykolipide gebunden sind. Hier ist die Konzentration zweifach höher als in boviner Milch und im Muttermilchersatz [Wang und Brand-Miller, 2003; Wang et al, 2007].

Bovine Milch, welche am häufigsten als Basis-Milch für Baby-Ersatznahrung eingesetzt wird, hat eine sehr geringe Menge an Sialinsäuren. Wenn man dies mit humaner Milch (einen Monat nach Geburt) vergleicht, beträgt die Sialinsäurekonzentration von boviner

Milch nicht mal 1/4 von humaner Milch. Stillkinder bekommen somit, gleich von Geburt an, eine sialinsäurehaltigere Nahrung [Wang und Brand-Miller, 2003].

1.8.3 Sialinsäure in der Milch und die exogene Verabreichung von Sialinsäure (bei Ratten)

In humaner Milch liegt eine hohe Konzentration an Sialinsäuren vor, überwiegend als Neu5Ac [Wang und Brand-Miller, 2003; Wang, 2009].

Die exogene Verabreichung von Sialinsäure wurde vor ca. 30 Jahren verstärkt untersucht. Morgan und Winick benutzten für die Versuche sowohl gut genährte als auch unterernährte Rattenbabies [Morgan & Winick, 1980a]. Diesen wurde 1 mg N-Acetylneuraminsäure pro 50 g Körpergewicht intraperitoneal injiziert. Dies wurde täglich durchgeführt und zwar an den Tagen 14-20 postnatal. Es zeigte sich ein Anstieg von Sialinsäuren in zerebralen und zerebellaren Gangliosiden und eine erhöhte Sialinsäurekonzentration in den Glykoproteinen. Außerdem erreichten sie in einem artspezifischen Intelligenztest (Labyrinthtest) eine höhere Punktzahl im Vergleich zu Kontrolltieren [Morgan & Winick, 1980a; Wang und Brand-Miller, 2003].

Aufgrund dieses Ergebnisses schlossen die Forscher, dass durch die substituierte Sialinsäure eine höhere Lernfähigkeit angenommen werden kann. Diese Schlussfolgerung haben auch weitere Forschungsgruppen mit ähnlichen Tiermodellen getroffen [Morgan & Winick, 1980a; Wang und Brand-Miller, 2003; Wang et al, 2007].

In einem weiteren Versuch wurden Rattenbabys ab Tag 14 nach Geburt entweder intraperitoneal oder oral mit Sialinsäure versetzt. Auch hier wurde in beiden Fällen, im Vergleich zu Kontrollgruppen, eine erhöhte Sialinsäurekonzentration in Glykoproteinen und Gangliosiden nachgewiesen. Die orale Gabe von Sialinsäuren erwies sich dabei als genauso effektiv wie die intraperitoneale Gabe [Carlson & House, 1986; Wang und Brand-Miller, 2003].

Studien mit humanen Kindern zeigten weiterhin, dass Kinder, die gestillt wurden, bessere Ergebnisse in späteren Intelligenz (IQ)-Tests zeigten [Mortensen et al, 2002; Wang und Brand-Miller, 2003]. Kinder die nicht gestillt wurden, sondern mit Muttermilchersatz ernährt wurden, schnitten deutlich schlechter ab. Die Stillzeit korrelierte hierbei mit der im IQ-Test erreichten Punktzahl. Je länger gestillt wurde, umso höhere Werte konnten die Kinder später erreichen. Sowohl im mathematischen Bereich als auch im Lesen schienen die gestillten Kinder besser zu sein. Somit scheint es, als könnten die Inhaltsstoffe der Muttermilch diesen Intelligenzvorteil begründen [Wang und Brand-Miller, 2003].

1.8.4 Sialinsäure während der humanen Schwangerschaft

In der Schwangerschaft wurde ein Konzentrationsanstieg von Sialinsäure im maternalen Plasma und Speichel festgestellt. Es zeigte sich außerdem, dass die vermehrt synthetisierte Sialinsäure der Mutter die Plazenta überwinden kann und das fetale Wachstum im dritten Trimester fördert [Wang und Brand-Miller, 2003].

1.9. Medizinische Bedeutung von Störungen im Sialinsäuremetabolismus

Störungen im Sialinsäuremetabolismus korrelieren mit verschiedenen Krankheiten.

Krankheitsbedingte Sialinsäure-Defizite in Gangliosiden und Glykoproteinen des Hirns stehen im engen Zusammenhang mit der mentalen Retardierung [McVeagh et al, 1997]. Auch bei dem Krankheitsbild der Schizophrenie scheint ein Zusammenhang mit der Sialinsäurekonzentration zu bestehen. Je niedriger der Sialinsäuregehalt in den Glykoproteinen der Cerebrospinalflüssigkeit, umso schlimmer war das Ausmaß der Schizophrenie. Bei einer geheilten Schizophrenie war die Sialinsäurekonzentration erneut im Normalbereich [Campbell et al, 1967; Wang und Brand-Miller, 2003].

Alzheimer ist eine Krankheit, die normalerweise bei Menschen ab einem Alter von 65 Jahren auftritt. In einigen Fällen beobachtet man diese Krankheit jedoch auch bei deutlich jüngeren Leuten [Warren, 1994]. Die Krankheit beginnt mit leichter Vergesslichkeit, später kommt es zum Gedächtnisverlust und zum Verlust der kognitiven Funktionen. Auch bei diesen Alzheimer-Patienten wurde eine abnehmende Sialyltransferaseaktivität im Serum beobachtet. Der Gangliosid-Sialinsäuregehalt im cerebralen Kortex war ebenfalls verringert [Sorbi et al, 1987]. Somit könnte man den Gehalt an Sialinsäure im Serum als frühen biochemischen Marker von Neurodegeneration benutzen [Schauer & Kamerling, 1997; Wang und Brand-Miller, 2003].

Adulte Menschen exprimieren keine signifikanten Mengen an Neu5Gc in normalen Zellen [Shaw & Schauer, 1988]. In Tumorzellen hat man diese jedoch vermehrt gefunden [Rosenberg, 1995]. Wie bereits erwähnt, zeigen Tumorzellen einen höheren Grad an Sialylierung an ihrer Zelloberfläche. Umso höher die Sialylierung der Tumorzelloberfläche, je höher ist das Metastasierungspotential [Troy, 1995]. Die erhöhte Sialylierung könnte auch dazu beitragen, dass Metastasen im Blutkreislauf besser überleben können und es außerdem leichter haben, in neue Gewebe einzuwandern [von Itzstein & Thomson, 1997; Wang und Brand-Miller, 2003].

Weiterhin werden Sialinsäure-Konzentrationen im Blut als Marker für Akute-Phase-Reaktionen verwendet. Einige saure Glykoproteine, wie zum Beispiel Fibrinogen und Haptoglobin, besitzen die Sialinsäure als endständigen Zucker. Sowohl Fibrinogen als auch Haptoglobin zeigen eine starke Zunahme bei Zellbeschädigung [Taniuchi et al, 1981]. Erhöhte Sialinsäurekonzentrationen im Plasma deuten weiterhin auf mikrovaskuläre Komplikationen bei Typ 1-Diabetes hin [Crook et al, 2001; Wang und Brand-Miller, 2003].

2. Zielsetzung

In humaner Milch wurde bereits ein hoher Gehalt an PolySia beschrieben, der über die gesamte Stillzeit konstant bleibt [Yabe et al, 2003]. Im Gegensatz dazu ist die PolySia-Konzentration im Basisprodukt von herkömmlichen Muttermilchersatz, nämlich Kuhmilch, unbekannt. Um mehr Informationen über die Rolle von PolySia in der Milch und bei Infektionen des Milchdrüsengewebes (Mastitis) zu erlangen, waren in dieser Dissertation folgende Fragen von Bedeutung:

- Kommt PolySia nur in humaner Milch oder auch in Kuhmilch, sowie anderer tierischer Milch vor?
- Gibt es Unterschiede im PolySia-Gehalt zwischen den verschiedenen Milchsorten, bzw. zwischen Kolostrum und reifer Milch?
- Wo liegt PolySia im Brustdrüsengewebe vor, bzw. wo wird es gebildet?
- Welche der beiden Polysialyltransferasen, St8SialII und/oder St8SialIV, synthetisieren PolySia?
- Gibt es Unterschiede im PolySia-Status, nach einer Infektion des Milchdrüsengewebes (Mastitis) im bovinen Tiermodell?

3. Materialien

3.1 Probenmaterialien

Die Milchproben von landwirtschaftlichen Nutztieren wurden von Dr. Andreas Vernunft (Abteilung Experimentelle Reproduktionsbiologie), Dr. Andreas Höflich (Abteilung Signaltransduktion) sowie Dr. Juliane Günther (aktuell Abteilung Glykobiologie) vom Leibniz-Institut für Nutztierbiologie (FBN) zur Verfügung gestellt. Das Melken zur Gewinnung von Milch bei milchliefernden landwirtschaftlichen Nutztieren ist ein normaler Prozess in der Landwirtschaft und stellt keinen Tierversuch im Sinne des Tierschutzgesetzes dar.

Muttermilch wurde von Prof. Dr. Kunz vom Institut für Ernährungswissenschaft der JLU Gießen zur Verfügung gestellt. Eine Kopie des bewilligten Antrags der Ethikkommission des Fachbereichs Medizin liegt dem Promotionsbüro vor (Nr. 77/00). Für die Immunhistochemie von Kuheutergewebe lagen bereits fertige, in Paraffin eingebettete, Milchdrüsegewebsschnitte aus Kuheuter vor, die von Dr. Juliane Günther (aktuell Abteilung Glykobiologie; Leibniz-Institut für Nutztierbiologie (FBN)) zur Verfügung gestellt wurden. Die Schnitte stammen von der Tierärztlichen Hochschule (TiHo) Hannover und enthalten Gewebe, die mit *E. coli* oder *S. aureus* infiziert wurden, sowie Kontrollgewebe. Die Studie, für die das Tiermodell benötigt wurde, ist bereits veröffentlicht worden [Petzl et al, 2008]. Der Tierversuch wurde von der dortigen Ethikkommission genehmigt (Nr. 509.6-42502-03/678).

3.2 Biologische Materialien

3.2.1. Primärantikörper

	Eigenschaft	Katalognummer oder Herstellungsort	Referenz/ Firma
α- polySia (mAk735)	mAk (Maus IgG2A); erkennt α -2,8-verknüpfte PolySia ab einer Kettenlänge von acht Sialinsäuren	Med. Hochschule Hannover MHH, Arbeitsgruppe Prof. Gerardy- Schahn	[Frosch et al., 1985]

3.2.2. Sekundärantikörper

	Eigenschaft	Katalognummer	Referenz/ Firma
Polyclonal Rabbit anti-mouse	HRP-linked Antibody	P0260 Verdünnung: 1/6000	Dako
Dako EnVision⁺	System-HRP Labelled Polymer Anti-mouse	K4001	Dako
Donkey anti-mouse		715035151	Jackson ImmunoR esearch

3.2.3 Enzyme

	Eigenschaften	Herstellungsort
Endoneuraminidase N (EndoN)	Stammt aus einem E. coli K1 Phagen. Sie bindet an α -2,8- verknüpfte Sialinsäuren ab einem Polymerisationsgrad von acht Resten und spaltet ein Oktamer in drei (nicht-reduzierendes Ende) Reste [Stummeyer et al, 2005]; #1588;	Medizinische Hochschule Hannover MHH, Arbeitsgruppe Prof. Gerardy-Schahn
Inaktives EndoN	Das Enzym wurde im aktiven Zustand durch zwei Punktmutationen inaktiviert (Arg 596 Ala/Arg 647 Ala), sodass das Enzym die PolySia-Kette zwar noch bindet, jedoch nicht mehr schneiden kann [Schwarzer et al, 2009]; #3031;	Medizinische Hochschule Hannover MHH, Arbeitsgruppe Prof. Gerardy-Schahn

3.3. Lösungen

3.3.1. Lösungen für SDS-PAGE und Westernblot

Offizieller Name	Zusammensetzung	Artikelnummer	Firma
10 x Towbin (pH ca. 8,0) für 1L	141 g Glycine (200 mM)	3908.2	Roth
	30 g Tris (25 mM)	5429.3	Roth
	7,5 g SDS	CN30.2	Roth
	20% Methanol (v/v) → erst unmittelbar für 1 x Transpuffer zugeben	4627.4	Roth
10x TBS, 1L pH 7,4	80 g NaCl (mit HCl auf pH 7,4 einstellen)	3957.1	Roth
	24,2 g Tris	5429.3	Roth
1 x TBS-T	100 ml 10X TBS mit 900 ml aqua dest.		
	1 ml Tween 20	39796.01	Serva
10 x Elektrophoresepuffer Laemmli	60,5 g Tris [s.o]	5429.3	Roth
	100 g Glycine [s.o], 10 g SDS [s.o]	3908.2 CN30.2	Roth Roth
ECL	Luminol	A2185	AppliChem
	Cumarinsäure (p- coumaric acid)	C9008-1G	Sigma
	H ₂ O ₂ Wasserstoffperoxid 30%	8070.2	Roth
Entwickler	Entwicklerkonzentrat Kodak	GBXE	Hartenstein
Fixierer	Fixiererkonzentrat Kodak	GBXF	Hartenstein

3.3.2 Lösungen für Gelherstellung

Offizieller Name	Artikelnummer	Firma
Acrylamide/Bis Solution (30% w/v)	10688.01	Serva
Tris 0,5 mol/L pH: 6,8	5429.3	Roth

dd H₂O	Milli Q	
APS 10% (Ammoniumperoxidsulfat)	9592.3	Roth
TEMED (N,N,N',N'- Tetramethylethylenediamine)	35930.02	Serva
2-propanol	9866.5	Roth

3.3.3 Lösungen für Antikörper und Blocken

Offizieller Name	Artikelnummer	Firma
Albumin Fraktion V (Westernblot)	8076.4	Roth
Milchpulver Blotting grade, pulv.	T145.1	Roth
Albumin, IgG-frei (Immunhisto/Fluoreszenz)	3737.2	Roth
Color Prestained Protein Standard, broad range 11- 245 kDa	P7712	NEB

3.3.4 Lösungen und Verbrauchsmaterialien für Immunhistochemie

Name	Offizieller Name	Artikelnummer	Firma
Isopropanol	2-propanol	9866.5	Roth
Roti Histol	Roti-Histol für die Histologie	6640.4	Roth
Deckgläser für Mikroskopie	Automat-Star Deckgläser für Mikroskopie (24x50 mm; Stärke 1,5)	K12450a1,5	Engelbrecht
Hämalaunlösung	Hämalaunlösung sauer von Mayer	T865.2	Roth
Roti-Mount Aqua	Roti-Mount Aqua für die Mikroskopie (Dichte 1,05-1,18)	2848.1	Roth

DAB-Tabletten	SIGMAFAST 3,3-Diaminobenzidine tablets (to prepare 1 ml)	D4168-50SET	SIGMA
Trypsin			Germed

3.4 Verbrauchsmaterialien und Geräte

	Offizieller Name	Artikelnummer/Seriennummer/Katalognummer	Firma
Eppis 2 ml	SafeSeal Reagiergefäße 2 ml	72.695.500	Sarstedt
Eppi 1,5 ml	RotiLabo Sicherheitsreaktionsgefäß	XC63.1	Roth
Spitzen 1000 µl, blau	Pipettenspitze 1000 µl, blau	70.762.010	Sarstedt
Spitzen 200 µl, gelb	Pipettenspitze 200 µl, gelb	70.760.012	Sarstedt
Spitzen 10 µl, farblos	Pipettenspitze 10 µl, farblos	70.1116	Sarstedt
Parafilm	Parafilm, Laboratory Film	PF10	Hartenstein
Vortexer	MINI-Vortex VPE=1	Art.No.: L023	Kisker Biotech
ddH₂O	Reinstwasser-aufbereitung Purelab classic		Elga
SpeedVac	Rotations-Vakuum-Konzentrator	Modell: RVC2-18 CD plus	Christ
SpeedVac Pumpe	Vakuum-system MZ 2C NT +AK+EK		Vacuubrand

Mikroskop (DAB-Entwicklung)			
Zentrifuge Labor	Heraeus Primo R Centrifuge	Cat.: 75005440	Thermo fisher
Wasserbad			
Brutschrank	Typ: UM200	Nr. B203.0684	Memmert
Proteinmessung	FLUOstar Omega		BMG Labtech
Elektrophorese-gerät	Electrophor. Power Supply EPS 601	Cat.: 18-1130-02	Healthcare Life Sciences
Snap-System	SNAP i.d.® 2.0 Protein Detection System	Cat.: SNAP2BASE	Millipore
Wippe	MR-1, Miniwippe-Schüttler	Bestellnummer: BS-010152-AAG	Biosan
Rührgerät	Colorsquid	Bestellnummer: 513669922	IKA
Kassette zum Bilder entwickeln	Hypercassette	GERPN11642	Sigma
Blot für WesternBlot	Hoefer TE77X Semidry Blotting Systems	Cat.: 03-500-613	Thermofisher
Brutschrank	Heracell 150i CO ₂ Inkubator Edelstahl-Innenbehälter	5536007	Thermofisher

3.5 Sonstiges

	Artikelnummer	Firma
Dynabeads M-280 Tosylactivated	14203	Invitrogen
500 ml Fetal Bovine Serum	16140071	Gibco (Thermofisher)
RIPA Buffer (10 x)	#9806	Cell Signaling technology
Triethylamin	X875.1	Roth
NaCl (Natriumchlorid)	3957.1	Roth
Ethanol	9065.4	Roth
PBS	14190-094	Gibco

3.5.1 Chemikalien

Name	Offizieller Name	Art.Nummer	Firma
NH₄HCO₃	Ammonium bicarbonate 500 g	09830-500G	Sigma
Acetonitril	Acetonitril	HL44.2	Roth
Natriumphosphatpuffer	1.Natriumdihydrogenphosphat- monohydrat > 98%	K300.2	Roth
	2.Di- Natriumhydrogenphosphat >99%	P030.2	Roth
Ammoniumsulfat	Ammoniumsulfat >99%	9218.1	Roth
HCL	Salzsäure 25%	6331.3	Roth
DTT	Dithiothreitol	D-5545	Sigma
Iodoacetamide	Iodoacetamide	6125-25G	Sigma
TFA	Trifluoressigsäure	6957.1	Roth

3.5.2 Materialien für rT-PCR und Agarosegel

	Offizieller Name	Artikelnummer	Firma
Nanodrop			Kisker
RNase freies Wasser	Gibco distilled water		Life technologie
RNA in cDNA	iScript cDNA-Synthesis Kit		Biorad
Thermocycler	Primus 96Plus; RT50 cyc-Program		Biotech
Primer St8Siall/IV			TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH
SYBR-Mix	IQ SYBR Green Supermix	Cat#170-8882	Biorad
PCR-Platten	Hard-Shell PCR-Plates, 96well thin wall	Cat#HSP9601	Biorad
Platten Centrifuge	Plate centrifuge		Starlab
Probenauswerter	CFX96 Real-time-System; C1000 Touch-Thermal-Cycler		Biorad
Agarose	Agarose		Serva
TAE-Puffer	Rotiphorese® 50 x TAE Puffer	CL86.2	Roth
SYBRGold	SYBRGold nucleic acid gel stain	REF:S11494	Life technologies
Größenstandard für Agarosegel	FastRuler™ Low Range DNA Ladder (50-1500 bp)	SM1103	Thermofisher

4. Methoden

4.1 Proteinanalytische Methoden

4.1.1 Probenaufarbeitung

Für die vorliegende Arbeit wurde Milch von verschiedenen Säugetieren verwendet. Die Lyse wurde für zwei Stunden bei 8°C in einem Schüttler durchgeführt. Als Lysepuffer wurde der Ripa-Puffer verwendet und in 1fach-Verdünnung zur Milch gegeben (Verhältnis von 3 Teilen Milch zu 1 Teil Ripapuffer).

4.1.2 Affinitätsaufreinigung mit Tosylaktivierten Dynabeads

Für die Versuche wurden folgende Puffer verwendet:

Puffer B: 0,1 M Natriumphosphatpuffer, pH: 7,4

Puffer C: 3 M Ammoniumsulfatpuffer in Puffer B

Puffer D: PBS pH 7,4 mit 0,5% BSA

Puffer E: PBS pH 7,4 mit 0,1% BSA

Eluationspuffer (Triethylamin): 100 mM Triethylamin + 150 mM NaCl

Die Immunpräzipitation ermöglicht es, ein ganz bestimmtes Antigen aus einer heterogenen Lösung zu isolieren. Dieses Antigen kann sowohl ein Protein als auch ein Peptid sein. In der Regel ist dabei ein Antikörper *in vitro* an ein festes Substrat gekoppelt und durch die Affinität des Antikörpers wird ein spezifisches Antigen gebunden.

In dieser Arbeit wurde inaktivierte Endoneuraminidase (EndoN) verwendet. Die enzymatisch inaktive Form kann PolySia binden aber nicht spalten. Inaktiviertes EndoN wurde für die Präzipitation an tosylaktivierte magnetische Dynabeads (Beads) gekoppelt. Die Tosylaktivierung machte es möglich, eine kovalente Bindung von Dynabead und Enzym zu erreichen.

Ligandenbindung an Dynabeads

Es wurden 165 µl (5 mg) der Dynabeads (künftig Beads genannt) dem Originalgefäß entnommen und in ein Reaktionsgefäß überführt. Generell verliefen die Waschvorgänge immer auf die gleiche Weise: Man hielt das Flüssigkeit-Beads-

Gemisch an einem Magnetständer und wartete, bis sich die Beads an der Gefäßwand gesammelt hatten. Jetzt konnte die flüssige Phase leicht abpipettiert werden.

Nach dem Entfernen der Flüssigkeit aus der Beads-Suspension, wurde 1 ml Puffer B zu den Beads gegeben und vorsichtig resuspendiert. Nach erneuter Abnahme des Überstandes mit Hilfe des Magnetständers, wurde zu den Beads 165 µl von Puffer B gegeben.

Um die Isolation von PolySia aus der Milch zu ermöglichen, musste zuerst ein Ligand an die Dynabeads gekoppelt werden. Als Ligand wurde inaktives EndoN verwendet. Über eine S_N2-Reaktion (nukleophile Substitution) bindet das inaktive EndoN an die Stelle, an die vorher Tosyl gebunden hatte, unter Entstehung eines sekundären Amins. Das Tosyl wird quasi durch EndoN ersetzt (substituiert) und somit als Abgangsgruppe bezeichnet.

In den folgenden Versuchen wurde inaktives EndoN als Ligand verwendet. Dieses unterscheidet sich vom Aktiven nur dadurch, dass es im aktiven Zentrum durch zwei induzierte Punktmutationen inaktiviert wurde (Alanin an den Positionen 596 und 647 durch Arginin ersetzt). Somit kann das Enzym die PolySia-Ketten zwar binden, aber nicht mehr schneiden [Schwarzer et al, 2009].

Nach Überführung der Beads in ein neues Reaktionsgefäß und nach Abziehen des Überstandes, wurden 100 µg des Ligandes in Puffer B so gemischt, dass ein Endvolumen von 150 µl entstand. In diesem Fall waren das 23,3 µl inaktives EndoN und 126,7 µl Puffer B. Dies wurde zu den Beads gegeben, gevortext, und anschließend mit 100 µl Puffer C überschichtet. Über Nacht wurden die Beads auf einem Rotator, bei 37°C, inkubiert (12-18 Stunden).

Am nächsten Morgen wurde der Überstand erneut abgezogen und die Beads anschließend mit 1 ml Puffer D versetzt. Es folgte eine Inkubation von einer Stunde bei 37°C auf dem Rotator. Nach erneuter Abnahme des Überstandes, wurde anschließend zwei Mal mit Puffer E (1 ml) gewaschen.

Nun waren die Beads einsatzbereit, mit einer finalen Konzentration von 20 mg/ml. Die Beads konnten nun bis zu ihrer Verwendung mit 240 µl Puffer E versetzt und im Kühlschrank gelagert werden.

Zu diesen 20 mg/ml wurden die verschiedenen lysierten Milchproben transferiert und bei Raumtemperatur zwei Stunden, oder über Nacht im Kühlschrank, mit einem Rotator inkubiert. Anschließend wurde die Milch vorsichtig abgezogen (mit Hilfe von einem Magnetständer) und mehrfach mit dem angegebenen Puffer (Puffer E) gewaschen. Eluiert wurde in diesem Fall mit 80 µl Triethylamin (Abweichung vom Herstellerprotokoll).

Durch den starken basischen Charakter von Triethylamin wurde die reversible Bindung zwischen Enzym und PolySia gelöst und die aufgereinigten polysialylierten Proteine in das Triethylamin abgegeben. Die polysialylierten Proteine, die sich nun im Triethylamin befinden, bezeichnet man als Eluat. Dieses wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und aufgrund der stark basischen Eigenschaften, die auch dem eluierten Protein schaden, sofort mit Flüssigstickstoff gefroren. In der SpeedVac wurde die Probe anschließend vollständig getrocknet. Die eluierten, trockenen Proben wurden, bis zur weiteren Verwendung, bei -20°C gelagert.

Da die tosylaktivierten Beads mehrfach verwendet werden können, wurden sie nach dem Eluieren mindestens drei Mal mit Puffer E gewaschen und anschließend mit 240 µl Puffer E im Kühlschrank, bis zur nächsten Verwendung, gelagert.

4.1.3 Enzymatische Abspaltung von Sialinsäuren mittels EndoN

EndoN ist ein Enzym, welches unter anderem für den Verdau von PolySia verantwortlich ist. Als Negativkontrolle wurden die trocken gezogenen polysialylierten Proteine, mit einer Konzentration von 2,23 µg/ml EndoN, in TBS resuspendiert und anschließend bei 37°C für zwei Stunden im Schüttler inkubiert. Aktives EndoN ist in der Lage, die α -2,8-verknüpfte PolySia bis zur Bildung von maximal sieben Untereinheiten zu degradieren [Rutishauser et al, 1985]. Somit ist der verwendete mAk735-Antikörper nicht mehr in der Lage das PolySia zu binden, da er dafür mindestens acht aufeinanderfolgende N-Acetylneuraminsäure-Einheiten benötigt.

4.1.4 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die sogenannte SDS-PAGE ist eine Labormethode, die zur Auftrennung von geladenen Molekülen, wie zum Beispiel Proteinen, verwendet wird. Durch unterschiedliche Wandergeschwindigkeiten der Moleküle (bedingt durch verschiedene Ladungs- und Masseneigenschaften), kommt es zu einer Auftrennung in einzelne Fraktionen [Westermeier, 1990].

In der Regel wird zur eindimensionalen Auftrennung von Proteinen eine diskontinuierliche Elektrophorese nach Laemmli durchgeführt [Laemmli 1970]. Hier durchlaufen die Proteine zuerst das Sammelgel, in dem sie konzentriert werden und anschließend das Trenngel, in dem sie der Größe nach aufgetrennt werden. Durch das negative Detergenz SDS erhalten alle Proteine eine negative Ladung. Bei angelegter elektrischer Spannung wandern nun alle negativ geladenen Proteine in Richtung

Anode. Hierbei werden kleine Proteine schneller durch die Poren des Gels geleitet als große Proteine, die eher zurückgehalten werden.

Das Trägermaterial der Elektrophorese ist das Polyacrylamid. Bei dem Trenngel wurden die Konzentrationen 7% oder 10% verwendet, beim Sammelgel 5% (Tabelle 1).

Die Zusammensetzung für Trenn- und Sammelgel erfolgte wie unten angegeben. Zusätzlich zu den Proben, wurde immer ein Größenstandard (siehe Methoden) aufgetragen. Das Trenngel wurde zwischen zwei Glasplatten gegossen, sodass es insgesamt eine Größe von 8 x 8,5 cm aufwies. Die dabei entstehenden Luftblasen wurden mit Isopropanol entfernt. Je nach Versuch, wurden die vorher in der SpeedVac trocken gezogenen Proben, mit EndoN (Konzentration: 2,23 µg/ml) in TBS, für zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Nicht enzymversetzte Proben wurden nur in TBS, für zwei Stunden bei 37°C, inkubiert. Bei anderen Versuchen, bei denen ein PolySia-Verdau nicht notwendig war, wurden die trockenen Proben entweder in Lysepuffer (Ripa), oder direkt in 1fach-Probenpuffer, resuspendiert. Nach 90 min Polymerisierungszeit, wurde das Isopropanol vorsichtig mit ddH₂O abgespült und mit dem Gießen des Sammelgels begonnen. Während der Polymerisierungszeit des Sammelgels wurden die Proben mit Probenpuffer versetzt, anschließend fünf Minuten bei 96°C in einem Heizblock gekocht und letztendlich abzentrifugiert. Nach 30 min Polymerisierungszeit, konnte der Kamm aus dem Sammelgel entfernt werden und mit dem Waschen der Taschen begonnen werden. Nun wurden die Proben aufgetragen. Die Probenmenge, pro Spur, beträgt 10 µl. Als Elektrophoresepuffer wurde Laemmli verwendet.

Die Elektrophorese wurde mit einer niedrigen Spannung von 100 V und 20 mA gestartet, bis die Proben das Trenngel erreicht hatten. Anschließend wurde diese mit 30 mA fortgesetzt.

Tabelle 1 Herstellung von Sammel- und Trenngel: Anleitung für das Gießen eines 7 und 10%igen Gels. Angegeben sind die Chemikalien für das Trenn- und Sammelgel [Eigene Darstellung].

Sammelgel für 8 x 8,5 cm	5%	Trenngel für 8 x 8,5 cm	7%	10%
Acrylamid (30:0,8) [ml]	0,63	Acrylamid (30:0,8) [ml]	1,75	2,50
Tris 1,5 mol/l pH:8,8 [ml]	0,95	Tris 1,5 mol/l pH:8,8 [ml]	1,88	1,88
ddH ₂ O [ml]	2,13	ddH ₂ O [ml]	3,75	3,00
SDS 10% [ml]	0,038	SDS 10% [ml]	0,08	0,08
APS 10% [ml]	0,075	APS 10% [ml]	0,05	0,075
TEMED [µl]	5	TEMED [µl]	5	5

4.1.5 Western Blot

10 × Transferpuffer:

Towbin (pH 8,0)

141 g Glycin (200 mM)

30 g Tris (25 mM)

7,5 g SDS

(20% Methanol (v/v) werden erst für 1 × Transferpuffer hinzu gegeben

10 × Waschpuffer - Tris-buffered saline (TBS):

24,2 g Tris und 80 g NaCl

mit HCL auf pH 7,4

einstellen (0,1% Tween 20

(v/v) werden erst für 1 ×

Waschpuffer zugegeben →

TBS-T

Für die anschließende Methode wurde immer 1 × Waschpuffer und 1 × TBS-T verwendet.

Nach Abschluss der Gelelektrophorese, folgte der Transfer der aufgetrennten Proteine auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF-Membran). Diese Membran hat den großen Vorteil, dass sie sehr reißfest ist und eine sehr hohe Proteinbindungskapazität besitzt. Auch bei der Verwendung von Chemolumineszenz-Detektionssystemen, zeigt sie ein gutes Signal-Hintergrund-Verhältnis. Der Proteintransfer erfolgt zur Trennrichtung senkrecht. Somit entspricht das Trennmuster auf der PVDF-Membran exakt dem Trennmuster auf dem Gel.

Um die Proteine auf die Membran zu blotten/übertragen, wurde eine Blotting-Apparatur verwendet. Nachdem das Gel von den Glasplatten getrennt wurde, wurde es für sieben min in 1 × Transferpuffer eingelegt. In dieser Zeit wurde die 8 × 8,5 cm große PVDF-Membran für ca. 30 Sekunden in 100%iges Methanol eingelegt, dann kurz mit dH₂O ab gespült und bis zur weiteren Verwendung in 1 × Transferpuffer gelagert. Die Blottpapiere (insgesamt 4 pro PVDF-Membran; 8 × 8,5 cm), die zusätzlich für das Blotten der Proteine auf die PVDF-Membran benötigt wurden, legte man ebenfalls bis zur Verwendung in Towbin-Puffer ein.

Das „Blot-Sandwich“ wurde wie folgt zusammengebaut:

1. Unten Anodenplatte
2. Zwei Blottingpapiere exakt übereinander auf die untere Anodenplatte legen
3. Die PVDF-Membran exakt auf die Blottingpapiere legen
4. Das Gel genau passend auf die PVDF-Membran legen ohne Luftblasen zu hinterlassen
5. Zwei Blottingpapiere genau passend auf das Gel legen
6. Mit einem Roller vorsichtig über das „Sandwich“ rollen, um mögliche Luftblasen zu entfernen
7. Oben die Kathodenplatte
8. Blottingapparatur schließen, ohne „Sandwich“ zu verschieben

Nun wurde für ein Gel 400 V, 68 mA und 100 W eingestellt und für eine Stunde geblottet.

Nach Abschluss des Blottens wurde die PVDF-Membran vorsichtig entnommen und in Waschpuffer gelegt.

Im weiteren Verfahren (zum Beispiel zum Blocken) wurde das Snap-System von Millipore verwendet:

1. Unterdruckpumpe auf 5 bar einstellen
2. Snap-Box und beiliegende Membran mit dH_2O anfeuchten
3. PVDF-Membran zwischen Membran und Fließnetz legen (Proteinseite nach oben)
4. Box mit PVDF-Membran schließen und in das Snap-System einbauen
5. Zuerst 30 ml TBS-T auf die Membran geben und vollständig trocken ziehen lassen
6. Dann 30 ml 0,5%ige fettfreie Milch (am besten zwei Stunden vor Snap-System mit TBS-T ansetzen) auf die Membran geben und trocken ziehen lassen → zum Blocken
7. 3 x mit je 30 ml TBS-T waschen und jeweils vollständig trocken ziehen lassen
8. Die Membran konnte nun entnommen werden (Proteinseite immer nach oben) und in einer passenden Schale mit dem primären Antikörper (mAk735) versetzt werden. Die Schale wurde unter leichtem Schwenken über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt. Als Konzentration wurde 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in 5% BSA verwendet.

Am nächsten Morgen wurde die Membran entnommen und 3×10 Minuten, unter stärkerem Schwenken, mit TBS-T gewaschen. Anschließend wurde die Membran mit dem sekundären Antikörper für 90 Minuten, unter leichtem Schwenken, bei Raumtemperatur inkubiert. Hierbei wurde eine Konzentration von $0,22 \mu\text{g/ml}$ (Polyclonal Rabbit anti-mouse) oder $0,133 \mu\text{g/ml}$ (Donkey anti-mouse) in 0,5%iger Milch verwendet. Nur bei Abbildung 8, 10 und 11 wurde Donkey anti-mouse verwendet. Nach den 90 Minuten wurde erneut 3×10 Minuten mit TBS-T gewaschen und die Membran anschließend für eine Minute in dH_2O gelegt.

4.1.6 Chemolumineszenzreaktion mit ECL

Da der sekundäre Antikörper HRP-gekoppelt vorliegt, kann durch das Enzym eine Chemolumineszenzreaktion mit ECL katalysiert werden. HRP fördert die Umsetzung von Luminol in die oxidierte Form, womit anschließend die Lumineszenz detektiert werden kann.

<u>ECL für eine Membran:</u>	8 ml Luminol
	3 μl H_2O_2
	300 μl Coumarinsäure

Für die ECL-Lösung wurden die oben angegebenen Chemikalien der Reihenfolge nach zusammen pipettiert. Die Membran wurde nun, für zwei Minuten, mit dieser Lösung, unter leichtem Schwenken, inkubiert und anschließend in eine Fotokassette (mit Klarsichtfolie) gelegt. Da ECL im absolut Dunklen (nur Rotlichtlampe) eine Halbwertszeit von 15 Minuten aufweist, wurde die Kassette sofort in die Dunkelkammer gebracht. Das Fotopapier wurde jetzt, je nach Signalstärke, zwischen 10 Sekunden und 10 Minuten auf die Membran gelegt. Anschließend wurde das Fotopapier für eine Minute in den Entwickler gelegt, dann kurz mit dH_2O gespült und nun für mindestens zwei Minuten im Fixierer gelagert. Nach kurzem Waschen der Fotos wurden diese getrocknet und anschließend eingescannt.

4.2. Histologische Methoden

Für die Immunhistochemie lagen bereits fertige, in Paraffin eingebettete, Milchdrüsenepithelschnitte aus Kuheuter-Drüsengewebe vor. Die Schnitte stammen vom Leibniz-Institut für Nutztierbiologie (FBN) in Dummerstorf (Abteilung Genomic) und enthalten sowohl Gewebe von Tieren mit einer Infektion mit *E. coli* als auch mit *S. aureus*.

Vor Entnahme der Gewebeproben wurden die Kühe an der Tierärztlichen Hochschule (TiHo) in Hannover entweder mit *E. coli* (500 CFU; *Colony Forming Unit*) oder *S. aureus* (10000 CFU) infiziert. Diese fand direkt ins Euter statt und sollte eine Mastitis induzieren [Petzl et al, 2008].

Die Infizierung erfolgte zu vier verschiedenen Zeitpunkten, je in ein anderes Viertel des Euters (Abbildung 6).

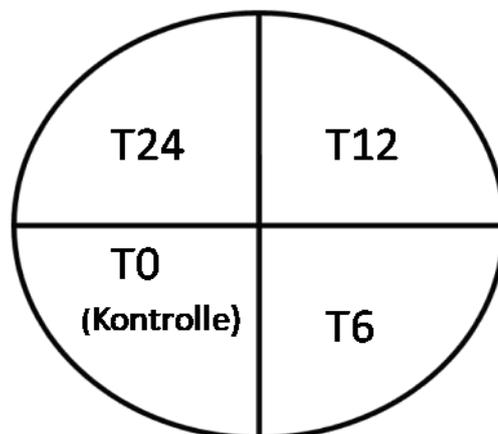


Abbildung 6. Darstellung eines Kuheuters: Diese Abbildung soll das Euter einer Kuh darstellen. Das Euter wird in vier gleiche Teile aufgeteilt. Die Zeichnung zeigt die Gesamtzeit der Infektion, entweder mit *E. coli* oder *S. aureus*, bevor das Tier geschlachtet wurde und die Gewebeentnahme durchgeführt wurde. (T24 bedeutet eine Infektionszeit des Euters von 24h). Bei dem Viertel „Kontrolle“ wurde Kochsalz verwendet. Die Zeichnung wurde selbst erstellt.

Die Gewebeentnahme erfolgte in allen Fällen nach der Schlachtung des Tieres (24 Stunden nach erster Infizierung). Zum Zeitpunkt T6 ist das Viertel des Kuheuters seit bereits 6 Stunden, entweder mit *E. coli* oder mit *S. aureus*, infiziert. T12 bedeutet, dass die Infizierung des Euterviertels 12 Stunden zurückliegt und T24, dass die Infizierung 24 Stunden vorlag, bevor das Tier geschlachtet wurde. Zusätzlich wurde ein Euterviertel als Kontrolle (T0) verwendet. Hier wurde kein Bakterienstamm, sondern eine Kochsalzlösung 24 Stunden vor Schlachtung in das Euterviertel injiziert. Dieses Viertel ist quasi keimfrei.

Der pathologisch-histologische Untersuchungsbefund, der an der TiHo in Hannover (Abteilung Diagnostik) aufgenommen worden ist und bereits in Petzl *et al* veröffentlicht wurde, war wie folgt [Petzl et al, 2008].

1. *S. aureus*:

Kontrolle (T0) (keine Infektion): einzelne Galaktolithen.

T6 (6 Stunden infiziert): einzelne Galaktolithen, fokal mittelgradige akute eitrige Mastitis, fokal geringgradige lympho-histiozytäre Mastitis.

T12 (12 Stunden infiziert): einzelne Galaktolithen, multifokal geringgradige lympho-histiozytäre interstitielle Mastitis.

T24 (24 Stunden infiziert): einzelne Galaktolithen, multifokal geringgradige akute eitrige Alveolitis, fokal geringgradige interstitielle lymphozytäre Mastitis.

2. *E. coli*:

Kontrolle (T0) (keine Infektion): ohne besonderen Befund.

T6 (6 Stunden infiziert): ohne besonderen Befund.

T12 (12 Stunden infiziert): mittelgradige, multifokale konfluierende, akute, eitrige Mastitis mit geringgradigem interstitiellem Ödem.

T24 (24 Stunden infiziert): diffuse, mittelgradige, akute, eitrige, herdförmig geringgradig nekrotisierende Mastitis und Galaktophoritis mit Nachweis von Bakterienrasen und thrombosierte Lymphgefäße, gering bis mittelgradiges interstitielles Ödem.

Um die Schnitte für den folgenden Versuch verwenden zu können, mussten diese zuerst entparaffiniert und rehydratisiert werden. Damit eine vollständige Entparaffinierung garantiert werden konnte, wurden die Schnitte für eine Stunde bei 60°C im Ofen erwärmt. Somit wurde das Paraffin flüssig und konnte leichter vom Objektträger entfernt werden. Für die Entparaffinierung wurde eine absteigende Alkoholreihe mit nachfolgenden Chemikalien verwendet:

1. 2 × 5 min Rotihistol
2. 2 × 3 min 100% Isopropanol
3. 1 × 3 min 70% Isopropanol
4. 1 × 3 min 50% Isopropanol
5. 1 × 5 min dH₂O

Um Reagenzien zu sparen, war es bei den nachfolgenden Schritten absolut ausreichend, ca. 100 µl auf einen Gewebeschnitt zu pipettieren und hinterher vorsichtig mit einem fusselreien Tuch abzuziehen.

Bei immunhistochemischen Nachweisreaktionen, bei denen im Anschluss als Detektionsenzym HRP (Meerrettichperoxidase) verwendet wird, kann es durch gewebeeigene Peroxidasen zu unerwünschten Reaktionen kommen.

Um die gewebeeigene endogene Peroxidase zu reduzieren, wurden nach dem Entparaffinieren und Rehydratisieren die Gewebeschnitte für 30 min mit 4% H₂O₂ in Methanol benetzt.

Anschließend wurden die Schnitte 3 × 5 Minuten mit Histopuffer gewaschen.

Die Arbeitsschritte unterschieden sich im weiteren Verlauf, je nachdem, ob die Schnitte mit einem Enzym behandelt wurden, oder nicht.

Histopuffer: PBS + 0,2% BSA

4.2.1 PolySia-Verdau mit aktivem EndoN

Bei dem Versuch, wo der Verdau von PolySia mit EndoN gezeigt werden sollte, wurden die Schnitte (Proben mit EndoN und ohne EndoN gegenübergestellt) wie folgt weiter behandelt. Hier ist zu beachten, dass auch die Schnitte ohne PolySia-Verdau, wie angegeben (und demnach gleich wie mit EndoN), behandelt wurden.

Nach dem dreimaligen Waschen mit Histopuffer, wurde nun der Schnitt für 10 Minuten mit 0,06% Trypsin in TBS proteolytisch anverdaut. Da in diesem Fall PolySia wohl als Komplex mit Proteinen vorliegt, war dieser Arbeitsschritt notwendig, damit das Enzym (aktives EndoN) in der Lage ist, vorhandene PolySia-Ketten bis auf sieben Untereinheiten abzudauen (wichtig für die Negativkontrolle). Somit ist der spätere Antikörper (mAk735) nicht mehr in der Lage zu binden, da er mindestens acht Untereinheiten zur Erkennung benötigt. Es wurden auch Schnitte ohne Trypsinverdau angefärbt. Hier zeigten sich jedoch keine Unterschiede zwischen +/- EndoN behandelten Schnitten (siehe Abbildung 13).

Nach den 10 Minuten wurden die Schnitte erneut 3 × 5 Minuten mit Histopuffer gewaschen.

Nun wurden die unspezifischen Bindungsstellen für eine Stunde bei 37°C im Brutschrank mit 2% BSA in PBS geblockt und danach 1 × 5 Minuten mit Histopuffer abgewaschen. Bei den immunhistochemischen Schnitten ist es sehr wichtig, dass diese nicht austrocknen. Deshalb sollte bei längeren Inkubationszeiten, vorallem über

Nacht oder im Brutschrank bei 37°C, die Gewebeschnitte in einer Feuchtebox aufbewahrt werden.

Um eine Negativkontrolle der Schnitte zu erhalten, wurde die eine Hälfte der Schnitte mit einer Konzentration von 67 µg/ml aktivem EndoN in TBS und die andere Hälfte nur mit TBS behandelt. Die Inkubation erfolgte über Nacht im Brutschrank bei 37°C.

Am nächsten Tag wurden die Schnitte 3 × 5 Minuten mit Histopuffer gewaschen und der primäre Antikörper hinzugegeben. Anschließend wurde als primärer Antikörper mAk735, in einer Konzentration von 2 µg/ml in Histopuffer, verwendet. Die Inkubation erfolgte über Nacht in einer Feuchtebox im Kühlschrank bei 8°C.

Bei dem Versuch, wo kein Verdau mit EndoN nötig war, wurden die Schnitte wie folgt behandelt:

Im Anschluss an das dreimalige Waschen mit Histopuffer wurde, ohne PolySia-Verdau, direkt mit 2% BSA in PBS für eine Stunde bei 37°C im Brutschrank geblockt.

Nach kurzem Abwaschen mit Histopuffer wurde der primäre Antikörper mAk735 in einer Konzentration von 2 µg/ml (in Histopuffer) auf die Schnitte gegeben und über Nacht im Kühlschrank, in einer Feuchtebox, inkubiert.

4.2.2 Weiteres gemeinsames Vorgehen

Sowohl bei Schnitten mit Enzymbehandlung als auch ohne, war es wichtig, dass bei den Versuchen ein Gewebeschnitt zur Kontrolle mitgeführt wurde. Ist der Kontrollschnitt bei der Auswertung im Mikroskop gefärbt, lässt das auf eine unspezifische Bindung des sekundären Antikörpers schließen, wodurch der Versuch nicht auswertbar ist. Der Kontrollschnitt wurde genauso behandelt wie alle anderen Schnitte, außer, dass kein primärer Antikörper auf den Schnitt gegeben wurde, sondern nur Histopuffer.

Am nächsten Morgen wurde der primäre Antikörper entfernt und 3 × 5 Minuten mit Histopuffer gewaschen.

Nun wurde der sekundäre Antikörper, aus dem Envision-Kit (anti-mouse), verwendet. Pro Schnitt wurden zwei Tropfen genommen. Der sekundäre Antikörper sollte nun spezifisch an dem Primären binden. Auch die Kontrolle wurde mit sekundärem Antikörper versetzt. Für 30 Minuten inkubierten die Schnitte nun bei Raumtemperatur und wurden anschließend für mindestens fünf Minuten in dH₂O gelagert.

4.2.3 Detektion

Zur Visualisierung von Gewebe- bzw. Zellantigenen, wurden SIGMAFAST 3,3-Diaminobenzidine-tablets (DAB-Tabletten) von SIGMA verwendet. Diese wurden nacheinander in 1 ml ddH₂O gelöst (zuerst DAB-Tablette, dann H₂O₂-Tablette). Da der sekundäre Antikörper aus dem Envision-Kit HRP-gekoppelt vorliegt, und vorher die gewebeeigene Peroxidase gehemmt wurde, reagiert das H₂O₂ spezifisch mit dem HRP des sekundären Antikörpers. Hier erkennt man in den mikroskopischen Aufnahmen anschließend eine Braunfärbung.

Für jeden Schnitt wurden 100 µl der DAB-Lösung verwendet und unter dem Mikroskop gewartet, bis eine Braunfärbung zu sehen war. Dann wurde die Reaktion sofort abgestoppt, indem die Gewebeschnitte in dH₂O gelegt wurden. Alle Schnitte wurden nun gleich lang, wie der erste, mit DAB entwickelt.

Im Anschluss wurden die Gewebeschnitte 10-15 Sekunden mit Hämatoxylin gefärbt. Hämatoxylin ist ein natürlich vorkommender Farbstoff, der, in Form des basischen Hämalaun, eine stark färbende Eigenschaft besitzt. Es werden alle Strukturen blau bis violett angefärbt, die basophil bzw. sauer sind. Daher erkennt man die blau angefärbten Zellkerne in den Schnitten.

Nach kurzer Inkubation mit dem Farbstoff, wurden die Gewebeschnitte für zwei Minuten, bei laufendem Wasser, „gebläut“. Da, wie oben erwähnt, die Hämalaunbindung im sauren Milieu erfolgt, muss der pH-Wert durch das Spülen mit Leitungswasser erhöht werden, um die Färbung zu konservieren. Dieser Vorgang wird allgemein als „Bläuen“ bezeichnet.

4.2.4 Konservierung bzw. Vorbereitung der Schnitte zur mikroskopischen Beurteilung

Zum Eindecken der Schnitte wurde Roti-Mount Aqua für die Mikroskopie (Dichte 1,05-1,18), verwendet. Das Medium ist eine wässrige Polyacrylat-Lösung, mit der man Gewebeschnitte direkt nach der Färbung eindecken kann, ohne sie vorher wieder rehydratisieren zu müssen. Als Deckgläser wurden „Automat-Star - Deckgläser für Mikroskopie“ von Engelbrecht (24 x 50 mm) verwendet. Zum Eindecken der Gewebeschnitte war es ausreichend, einen Tropfen auf den Schnitt zu geben und vorsichtig, ohne Luftblasen zu bilden, den Schnitt vollständig zu benetzen.

Anschließend wurden die Bilder, mit einem 10er bzw. 100er Objektiv, mikroskopiert und aufgenommen. Bei der 100fachen Vergrößerung war die Nutzung von Immersionsöl erforderlich.

4.3 Molekularbiologische Methoden

4.3.1 Nachweis der Genexpression von St8SialI und St8SialIV in Milchdrüsengewebe

Um herauszufinden, ob eine der zwei Polysialyltransferasen (St8SialI und St8SialIV) in den Milchdrüsenepithelzellen (Holstein Friesian) exprimiert wird, wurden folgende Proben verwendet (Tabelle 2):

Tabelle 2 Proben: Aufgeführt wurden die für die spätere rT-PCR verwendeten bovinen Proben [Eigene Darstellung].

Bezeichnung	was	woher
Hirn	Gewebe	Hirn
MD	Gewebe	Milchdrüse gesund
Lunge	Gewebe	Lunge
MEC K	pbMEC	Milchdrüsenepithelzellen

Es handelte sich bei allen Proben um Gewebe, ausgenommen der MECK-Probe. Diese stellte Primärzellen aus dem bovinen Milchdrüsenepithel dar.

Bei der Milchdrüse wurde gesundes Gewebe für den Versuch verwendet.

Da für Hirn und Lunge bereits bekannt ist, dass dort sowohl die Sialyltransferase St8SialI als auch St8SialIV aktiv vorliegen, wurden diese beiden Proben als Positivkontrolle verwendet. Diese Kontrolle ist wichtig, damit bei einem negativen Ergebnis überprüft werden kann, ob der verwendete Primer geeignet war, bzw. die verwendete Methode erfolgreich war.

Zu Beginn musste aus dem Gewebe reine RNA isoliert werden.

4.3.1.1 RNA-Isolierung

Die RNA-Extraktion ist eine biochemische Methode zur Isolierung von total-RNA aus einer Lösung, bzw. aus einem Zellgemisch. Zum Aufreinigen der Proben wurde das „Direct-zol RNA MiniPrep“ von Zymo Research verwendet.

Zuerst wurde 95-100%iges Ethanol (im Verhältnis 1:1) zu den lysierten Proben hinzugegeben (1 ml Ethanol + 1 ml Lysat) und vermengt. Die Mischung wurde nun in ein Zymo-Spin IIC-Column (folgend nur noch Säule genannt) gefüllt und dieses in ein Sammelgefäß (beides in dem Kit vorhanden) gestellt und für eine Minute bei 16000 xg zentrifugiert. Alle folgenden Zentrifugationsschritte erfolgten jeweils bei 16000 xg. Der Überstand wurde verworfen und die Säule wurde in ein neues Sammelgefäß gestellt.

Um in der lysierten Probe die mögliche DNA zu entfernen, folgte ein DNA-Verdau mit DNase. Auf die Säule wurde 400 µl „RNA-Wash-Buffer“ pipettiert und für 30 Sekunden zentrifugiert (Überstand verworfen).

Für jede Probe wurde anschließend der „DNase1 reaction mix“ vorbereitet und davon 80 µl direkt auf die Säule gegeben. Es folgt eine Inkubation bei Raumtemperatur für 15 Minuten. Anschließend wurde für 30 Sekunden zentrifugiert.

<u>DNase 1 reaction mix:</u>	DNase:	5 µl
	10x DNase 1 reaction Buffer:	8 µl
	DNase/RNase-Free Water:	3 µl
	RNA Wash Buffer (mit Ethanol):	64 µl

Nach dem DNA-Verdau ging es weiter mit der RNA-Aufreinigung.

Auf die Säule wurde 400 µl „Direct-zol RNA PreWash“ gegeben und für eine Minute zentrifugiert (Überstand verworfen). Dieser Schritt wurde nochmals wiederholt. Nun wurden 700 µl „RNA Wash Buffer“ zur Säule gegeben, für eine Minute zentrifugiert und erneut der Überstand verworfen. Um eine vollständige Entfernung des Waschpuffers zu erreichen, war es notwendig, noch einmal für zwei Minuten zu zentrifugieren. Die Säule wurde im Anschluss in ein neues RNase freies Reaktionsgefäß überführt und mit 50 µl „DNase/RNase-Free Water“ benetzt. Der letzte Zentrifugationsschritt betrug eine Minute. Die RNA-Qualität und -Konzentration wurde mit dem NanoDrop-Spectrophotometer gemessen (Tabelle 3):

Tabelle 3 Ergebnisse von Nanodropmessung: Die RNA-Konzentration pro Probe ist in ng/µl angegeben. Die Proben wurden sowohl bei 260 nm wie auch bei 280 nm gemessen. Das Verhältnis daraus gibt einen Hinweis über die RNA-Reinheit pro Probe [Eigene Darstellung].

Probenbezeichnung	ng/µl	A260	A280	A260/A280
MEC K	1765.47	44.137	22.504	1.96
Lunge	518.57	12.964	6.720	1.93
Hirn	961.91	24.048	12.649	1.90
MD	1368.98	34.225	17.568	1.95

Das Absorptionsverhältnis von 260nm/280nm wird verwendet, um die Reinheit der RNA zu bestimmen. Ab einem Verhältnis von ca. 2,0 wird die RNA als „rein“ bezeichnet. Wenn das Verhältnis unter 1,8 liegen würde, könnte dies ein Hinweis darauf sein, dass die Proben mit Proteinen oder Phenolen kontaminiert sind. In diesem

Versuch lag das Verhältnis (260nm/280nm) in allen Proben bei ca. 2,0. Also kann man davon ausgehen, dass die isolierte RNA „rein“ vorliegt.

In der Tabelle ist außerdem die RNA-Konzentration in ng/µl für jede Probe angegeben. Die eluierte DNA-freie RNA wurde in einem RNase freiem Reaktionsgefäß bei -70°C, bis zur Verwendung, gelagert.

4.3.1.2 Umschreiben von total-RNA in cDNA

Als Nächstes musste die vorhandene total-RNA in cDNA umgeschrieben werden. Damit von jeder Probe identisch viel RNA umgeschrieben wurde, verwendete man von jeder Probe 200 ng/µl. Die RNA wurde zum Erreichen der 200 ng/µl mit RNase freiem Wasser verdünnt. Für das folgende Umschreiben der RNA in cDNA wurde nun 1 µl (also 200 ng) RNA verwendet und mit den beschriebenen weiteren Chemikalien gemischt. Hierfür wurde das iScript cDNA Synthesis Kit (Biorad Laboratories GmbH München, Germany) verwendet.

1 µl von 200 ng Probe

14 µl RNase freies Wasser

4 µl von iScript cDNA Synthesis Kit Mix

1 µl reverse Transkriptase

Für das Umschreiben der RNA in cDNA ist es notwendig, reverse Transkriptase einzusetzen. Für eine Negativkontrolle wurde die reverse Transkriptase nicht verwendet. Hier wurde diese durch 1 µl mehr RNase freies Wasser ersetzt.

Bei einer PCR-Analyse sollte generell eine Negativkontrolle durchgeführt werden. Diese gibt Auskunft darüber, ob die Probe mit genomischer bzw. umgebungsbedingter DNA verunreinigt ist.

Auch ist eine Positivkontrolle sinnvoll. Hier wird ebenfalls Auskunft darüber gegeben, ob richtig pipettiert wurde und ob der Versuch, bzw. die Reaktion, funktioniert hat.

4.3.1.3 Quantitative Polymerase-Chain-Reaction (rT-PCR)

Die rT-PCR, auch „real-time polymerase chain reaction“ genannt, ist eine molekularbiologische Methode, die auf dem Grundsatz einer normalen „polymerase chain reaction“ (PCR) beruht. Im Gegensatz zu der üblich verwendeten PCR, ist es bei der rT-PCR möglich, die Amplifikation des gewünschten DNA-Moleküls in „real-time“ zu verfolgen. Bei einer konventionellen PCR hingegen, ist nur eine Endpunktanalyse möglich.

Die Quantifizierung erfolgt mit Hilfe einer Fluoreszenzmessung. Je mehr PCR-Produkte vorhanden sind, umso stärker nimmt die Fluoreszenz zu (proportional).

Nur in der exponentiellen Phase der PCR ist eine korrekte Quantifizierung möglich, da eine Linearität erreicht wird.

Die Abundanz von mRNA für die Gene *st8sialI* und *st8sialV*, wurde durch die rT-PCR mit dem iCycler von Biorad quantifiziert. Dafür wurde 1 µl der umgeschriebenen cDNA mit 4 µl Primermix (entweder St8SialI oder St8SialV; beide Primer auf 20 µM verdünnt) und 5 µl „IQ SYBR Green Supermix“ von Biorad gemischt und anschließend in eine 96well-Platte gegeben. SYBR-Green ist ein Cyanin-Farbstoff, der in der Lage ist an doppelsträngige DNA zu binden und somit zum Nachweis von doppelsträngiger DNA eingesetzt wird.

Die 96-well-Platte wurde anschließend in einer Plattenzentrifuge zentrifugiert, um sicherzustellen, dass alle Reagenzien am Boden der Platte vollständig gemischt sind. Zur Vervielfältigung der gesuchten cDNA wurde das „CFX96 Real-time-systeme (C1000 Thermo-Thermal-Cycler)“ von Biorad, verwendet. In einer rT-PCR wird eine positive Reaktion und somit eine vorhandene Genexpression durch die Akkumulation eines Fluoreszenzsignals erkannt. Nach jedem PCR-Zyklus sollte sich die vorhandene gesuchte cDNA verdoppelt haben. Deshalb kommt es zu einem exponentiellen Anstieg des Signals. Die Analysen wurden in der Service Gruppe *Zytometrie* am FBN durchgeführt und von Frau Dr. Juliane Günther ausgewertet.

Die PCR wurde durchgeführt mit 40 Zyklen (drei Minuten bei 94°C, 30 sek bei 60°C, 45 sek bei 70°C) gefolgt von 10 sek bei 94°C, 30 sek bei 60°C und 45 sek bei 70°C. Anschließend wurde die PCR mit 10 sek bei 94°C, 30 sek bei 60°C und sieben Minuten bei 70°C fortgeführt und es kam zur Denaturierung, zum Anlagern und zur Elongation. Die bovinen Primer (TIB-Molbiol-Primer) wurden designt, um jeweils einen spezifischen Genabschnitt abzudecken. Sie lagern sich bei 60-70°C an.

Die bovinen Primer-Sequenzen sind in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4 Primersequenzen: Angegeben sind die „Forward und Reverse Primer-Sequenzen“ von *St8SialI* und *St8SialV*. Außerdem ist die Produktgröße aufgeführt [Eigene Darstellung].

Transkripte	Forward-Primer	Reverse-Primer	Produktgröße (Basenpaare)	Datenbanknummer
<i>St8SialI</i>	166-190 CCA GCT GTT GTT GAC AGA AGT AAT	362-338 TCT CGG TCG AAG ATG TAA TGA ATA	197	NM_001098113.1
<i>St8SialV</i>	442-465 TCT GGC ATT CTG CTA GAT AGT GAG	661-630 TGT CAT TCA GCA TGG AAA GTC TAT	220	NM_001001163.1

4.3.1.4 Spezifitätsbestätigung mit 2%igem Agarosegel

Die Spezifität der Amplifikation wurde durch eine Agarosegel-Elektrophorese, im Vergleich mit einem Oligonukleotid-Molekularmassenstandard, ermittelt.

Für das 2%ige Agarosegel wurden 2 g Agarose von Serva in 100 ml 1 × TAE-Puffer gelöst und anschließend für drei Minuten in der Mikrowelle gekocht. Nach kurzem Abkühlen (ohne fest zu werden) wurden 5 µl „SYBR Gold nucleic acid gel stain“, von Life Technologies, den 100 ml hinzugesetzt. Die komplette Flüssigkeit wurde nun in die Apparatur von Biorad gegeben und gewartet, bis das Gel vollständig polymerisiert war. Nach dem Auftragen der vervielfältigten DNA, die zuvor 10fach verdünnt wurde, erfolgte die Auftrennung in einer Tischelektrophorese (horizontale Elektrophorese).

Die Auftragung eines Markers war notwendig, um zu bestätigen, dass die errechnete Produktgröße der produzierten DNA entspricht.

4.3.1.5 Sequenzierung

Die vervielfältigte DNA wurde anschließend durch Sequenzierung überprüft. Hiermit sollte bestätigt werden, dass die vervielfältigte DNA-Sequenz der Sequenz der Gene, *st8sialI* und *st8sialV*, entspricht. Die Sequenzierung wurde von der Servicegruppe *Sanger und Next-Generation-Sequenzierung (NGS)* am FBN durchgeführt. Die angezeigte Sequenz entsprach exakt der publizierten Gensequenz in der GenBank (mindestens 95% Übereinstimmung).

5. Ergebnisse

5.1 Nachweis von PolySia aus der Milch von gesunden Kühen (ohne Infektion/Mastitis) mittels Western-Blot

5.1.1 Nachweis von PolySia in humaner Milch

In Muttermilch konnte bereits in vorangegangenen Arbeiten PolySia nachgewiesen werden (Yabe et al. 2003). Um die gewählte Aufarbeitungs- und Isolationsstrategie zu testen, wurde deshalb zunächst PolySia aus Muttermilch isoliert. Nach der Aufreinigung mit EndoN-Beads, wurde ein Aliquot der polysialylierten Fraktion mit aktiver EndoN behandelt, um das spezifische Binden der Antikörper an PolySia zu kontrollieren. Da der mAk735-Antikörper mindestens Kettenlängen mit 8 Neu5Ac-Resten benötigt, nach einem erfolgreichen Verdau die Ketten jedoch kürzer sind, ist somit keine Bindung des mAk an die Spaltprodukte möglich.

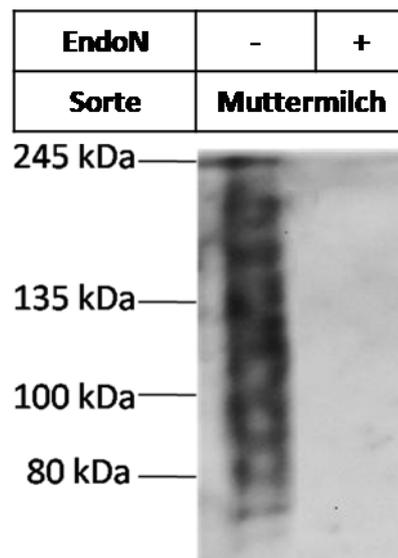


Abbildung 7. Western-Blot Analyse von PolySia in der humanen Muttermilch: Es wurde, vor dem Auftragen der Proben auf das 7%ige Gel, entweder mit EndoN verdaut (+) oder die Proben wurden ohne Enzymverdau aufgetragen (-). Als primärer Antikörper wurde mAk735 (anti-PolySia) verwendet. Die Molekulargewichte sind in Kilodalton (kDa) angegeben.

Die auf das Gel aufgetragenen Proteine wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und anschließend mittels Western-Blot weiter bearbeitet. Die aufgetrennten polysialylierten Proteine wurden nun über Chemolumineszenz sichtbar gemacht (ECL).

Man erkennt in Abbildung 7, ohne das Einsetzen von EndoN, die typischerweise schmierende PolySia-Bande, die sich über einen Molekulargewichtsbereich (angegeben in kDa) von ca. 80-250 kDa zieht. Nach Verdau von PolySia mit aktiver EndoN ist kein Signal von PolySia zu sehen. Somit ist die Aufarbeitungs- und Isolationsstrategie für die Isolation von PolySia anwendbar.

5.1.2 Nachweis von PolySia in verschiedenen Milchsorten

Um zu überprüfen, ob PolySia generell in Säugetieren vorkommt, wurde in einem weiteren Versuch reife Milch von der Ziege, vom Schaf, vom Schwein, von einer Stute, vom Büffel und vom Rind untersucht.

Hierfür wurde wiederum PolySia aus den Milchproben mit EndoN-Beads isoliert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der Proteine und nach dem anschließenden Blotten, wurden die Membranen mit dem primären Antikörper mAk735 und dem sekundären Antikörper „Polyklonal Rabbit anti-mouse“ behandelt. Nach Entwickeln mit ECL erkennt man in Abbildung 8 ein deutliches PolySia-Signal in der reifen humanen Milch und in der reifen Milch vom Schwein. In reifer Kuhmilch (Holstein Friesian) ist hingegen kein PolySia-Signal sichtbar. Auch bei Stuten-, Büffel-, Schaf- und Ziegenmilch war kein eindeutiger Unterschied zwischen unbehandelter und mit EndoN behandelter Probe zu erkennen.

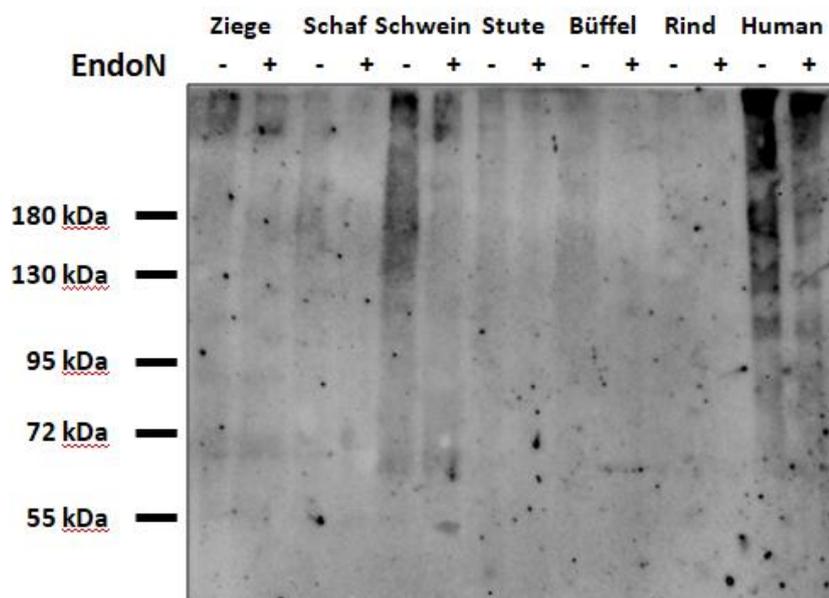


Abbildung 8. Western Blot-Analyse von PolySia aus verschiedenen Milchsorten (reife Milch): Die Proben wurden nach enzymatischem Verdau mit EndoN (+) oder unbehandelt (-) aufgetragen. Als primärer Antikörper wurde mAk735 (anti-PolySia) verwendet. Die Molekulargewichte sind in Kilodalton (kDa) angegeben.

5.1.3 PolySia-Verlauf in boviner Milch nach Kalbung

Da Kuhmilch nicht nur ein gängiges Lebensmittel ist, sondern auch meist als Basis für Säuglingsergänzungsmittel fungiert, ist von großem Interesse, ob generell das physiologisch funktionelle Polysaccharid PolySia in Kuhmilch nicht vorkommt. Mit höchster Wahrscheinlichkeit wird Kolostrum PolySia enthalten, weil hier laut Literatur auch die höchste Menge an Sialinsäure vorliegt [Wang et al, 2001]. Aus diesem Grund wurde Kuhkolostrum in die Analysen einbezogen. Es zeigte sich, dass im Kolostrum von Kühen PolySia nachweisbar ist (Abbildung 9).

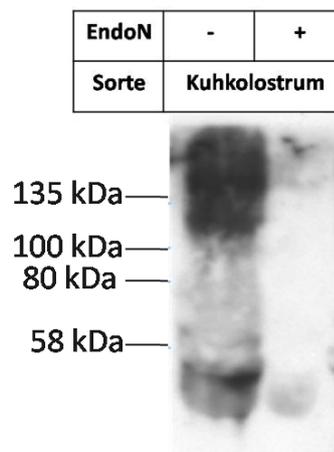


Abbildung 9. Western Blot-Analyse von PolySia aus einer bovinen Kolostralprobe: Gezeigt wird Kuhkolostrum, welches mittels Western-Blot analysiert wurde. Die Probe wurden nach enzymatischem Verdau mit EndoN (+), oder unbehandelt (-), aufgetragen. Als primärer Antikörper wurde mAk735 (anti-PolySia) verwendet. Die Molekulargewichte sind in Kilodalton (kDa) angegeben. Es wurde ein 10%iges Gel verwendet.

Der zeitliche Verlauf für das Vorhandensein von PolySia sollte anschließend näher ermittelt werden. Für diesen Versuch wurde die bovine Milch von Holstein Friesian Kühen verwendet und der zeitliche Verlauf der PolySia-Menge, vor und nach der Geburt eines Kalbes, beobachtet. Die PolySia-Isolate wurden mittels Western-Blot analysiert.

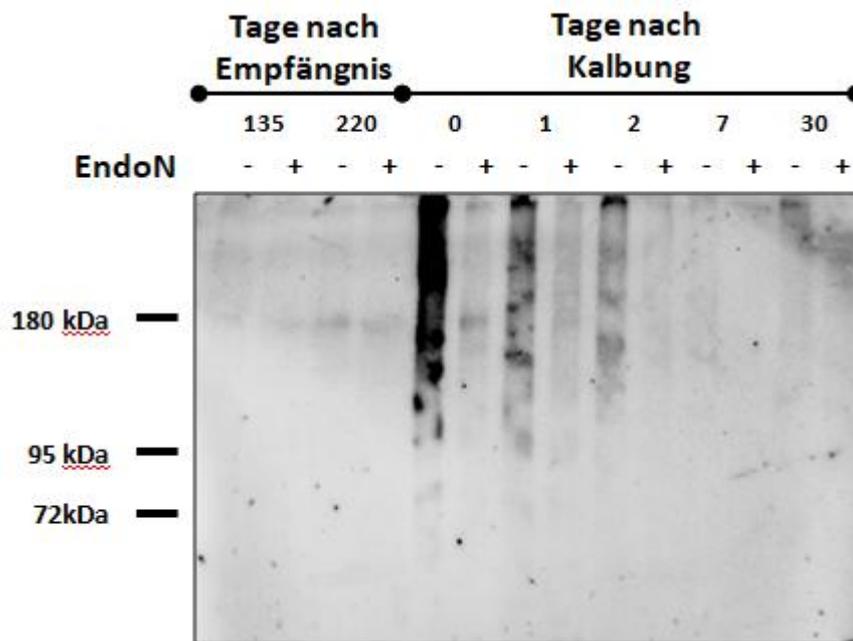


Abbildung 10. Western-Blot-Analyse von PolySia in boviner Milch vor und nach Kalbung: Die Milchproben wurden an bestimmten Tagen vor und nach der Kalbung entnommen und auf den Blot aufgetragen. Weiterhin wurden die Proben nach dem enzymatischen Verdau mit EndoN (+) oder unbehandelt (-) auf das 7%ige Gel aufgetragen. Als primärer Antikörper wurde mAk735 eingesetzt. Die Molekulargewichte sind in Kilodalton (kDa) angegeben.

In Abbildung 10 erkennt man, ohne den vorherigen enzymatischen Verdau mit EndoN, deutliche PolySia-Banden um den Zeitpunkt der Geburt des Kalbes. Der EndoN-Verdau zeigt, dass es sich um ein spezifisches Signal handelt. Nach zwei Tagen ist das Immunsignal an der Nachweisgrenze und im späteren Verlauf nicht mehr klar vom Kontrollverdau zu unterscheiden.

5.1.4 Nachweis von PolySia in reifer Dextermilch

Beim analysierten Holstein Friesian Rind handelt es sich um eine Milchkuh, die auf Milchleistung hin gezüchtet wurde. Somit könnte PolySia auch bei Rindern in der reifen Milch vorhanden sein, jedoch in verdünnter Form. Deshalb wurde auch reife Milch von einem Zweinutzungs- und Rind, dem Dexter-Rind, analysiert, das ca. vier Mal weniger Milch pro Jahr gibt [Dexter Verband Deutschland e.V.; Bundesrasseverband Deutscher Dexter-Züchter und -Halter e.V.; Arbeitsgemeinschaft Süddeutscher Rinderzucht- und Besamungsorganisationen].

In Abbildung 11 erkennt man bei der Dexterprobe, ohne vorherigen Enzymverdau mit EndoN, einen für PolySia typischen „Schmier“; ebenso beim Kolostrum von Holstein Friesian und bei der Muttermilch. Bei der reifen Holstein Friesian Milch war hingegen

kein Signal zu sehen. Nach dem Verdau mit EndoN war in allen Fällen kein Signal vorhanden.

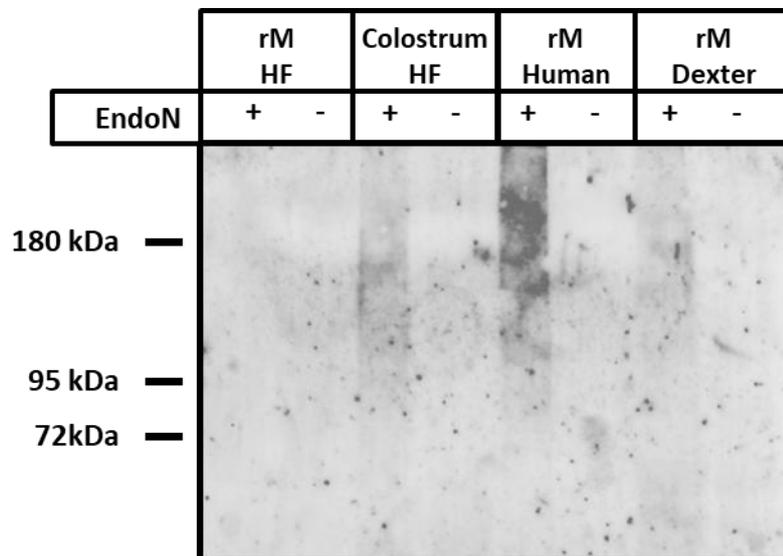


Abbildung 11. Western-Blot-Analyse von PolySia aus Kolostrum von Holstein Friesian, reifer Dextermilch, reifer Holstein Friesian- Milch und reifer Muttermilch: Die Proben wurden entweder nach enzymatischem Verdau mit EndoN (+), oder unbehandelt (-), auf das 7%ige Gel aufgetragen. Als primärer Antikörper wurde mAk735 eingesetzt. Die Molekulargewichte sind in Kilodalton (kDa) angegeben. Reife Milch, rM; Holstein Friesian, HF.

5.2 Nachweis von PolySia in bovinen Milchdrüsenewebe mittels Immunhistochemie

5.2.1 Nachweis von PolySia in Milchdrüsenepithelzellen

Die bisherigen Ergebnisse lassen vermuten, dass PolySia in Milchdrüsenewebe von Säugern gebildet und in die Milch sekretiert wird. Es gibt jedoch auch zahlreiche Beispiele, dass Bestandteile aus dem Blut in die Milch transportiert werden. Um den Ursprung von PolySia genauer zu ermitteln, sollte PolySia im Gewebe lokalisiert werden. Dazu wurden immunhistochemische Analysen durchgeführt. Zur Verfügung stand bereits auf Objektträger gezogenes Milchdrüsenewebe von Holstein Friesian Kühen (T0), die in Paraffin eingebettet vorlagen.

Es wurde ebenso wie für die Western Blot Analysen der mAk735 verwendet, um PolySia zu visualisieren. In Abbildung 12 erkennt man ein deutliches PolySia-Signal in Milchdrüsenepithelzellen. Gefärbt wurde mit DAB-Tabletten, wie in dem Methodenteil beschrieben. Durch die Reaktion von H_2O_2 mit dem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper, erscheint das PolySia braun.

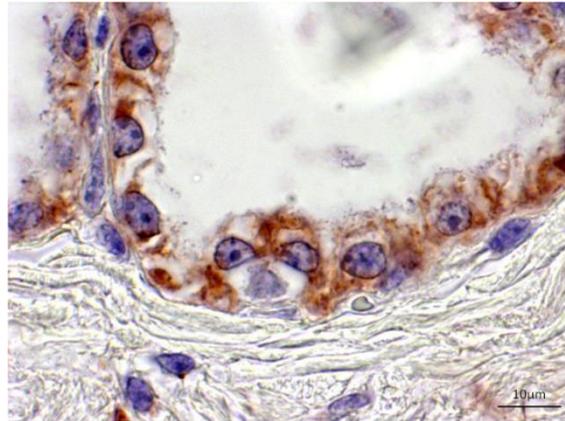


Abbildung 12. Lokalisation von PolySia in einer Milchdrüsenepithelzelle: In dieser Abbildung erkennt man ein deutliches PolySia-Signal (braun) in den Milchdrüsenepithelzellen. Blau dargestellt sind die Zellkerne, die mit Hämalaun angefärbt wurden. Für diese Abbildung wurde ein T0- Schnitt verwendet. Der angegebene Messbalken beträgt 10 μm .

Um sicherzugehen, dass die Signale in den Milchdrüsenepithelzellen tatsächlich PolySia zuzuordnen sind, wurden auch Schnitte mit EndoN behandelt. Die Schnitte wurden identisch gehandhabt, jedoch wurde ein Schnitt mit EndoN behandelt, während der zweite Schnitt mit Histopuffer ohne EndoN inkubiert wurde. Die ersten Versuche wurden ohne den, in dem Methodenteil beschriebenen, Trypsinverdau durchgeführt. Wie in Abbildung 13 zu sehen ist, waren die Signale mit und ohne EndoN vergleichbar, was zunächst dafür sprechen würde, dass es sich um eine unspezifische PolySia-Färbung handelt.

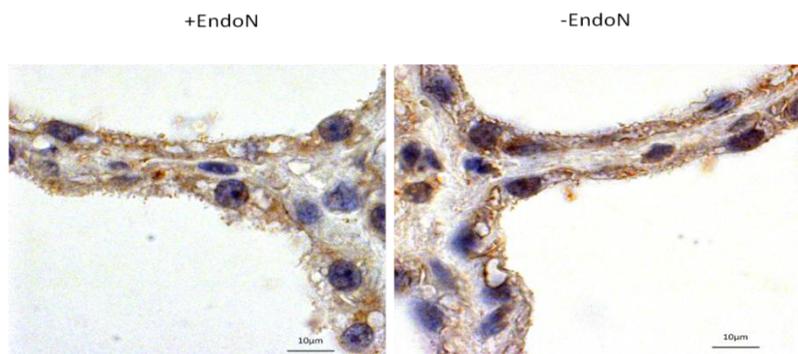


Abbildung 13. Behandlung einer bovinen Milchdrüse mit und ohne EndoN (ohne Trypsinverdau): Die Gewebeproben der bovinen Milchdrüse wurden entweder mit EndoN (+EndoN), oder nur mit Histopuffer versetzt (-EndoN). Es erfolgte kein vorheriger Verdau mit Trypsin. Blau dargestellt sind die mit Hämalaun angefärbten Zellkerne, braun dargestellt ist das angefärbte PolySia in den Milchdrüsenepithelzellen. Hier wurde der primäre Antikörper mAk735 verwendet. Der angegebene Messbalken beträgt 10 μm .

Da jedoch PolySia in der Milch Laktoferrin bindet, wäre es möglich, dass PolySia in den Drüsenzellen bereits als Komplex mit Bindungspartnern vorliegt. Durch die

Formalinverknüpfung der Proteine während der Präparateaufarbeitung, würden solche proteinogenen Interaktionspartner kreuzvernetzt werden, was wiederum PolySia vor dem Enzym EndoN maskieren könnte.

Aus diesem Grund wurden die Versuche erneut durchgeführt. Diesmal wurden die Schnitte jedoch vorab mit Trypsin behandelt. Dabei handelt es sich um eine gängige Demaskierungsstrategie bei Paraffinschnitten.

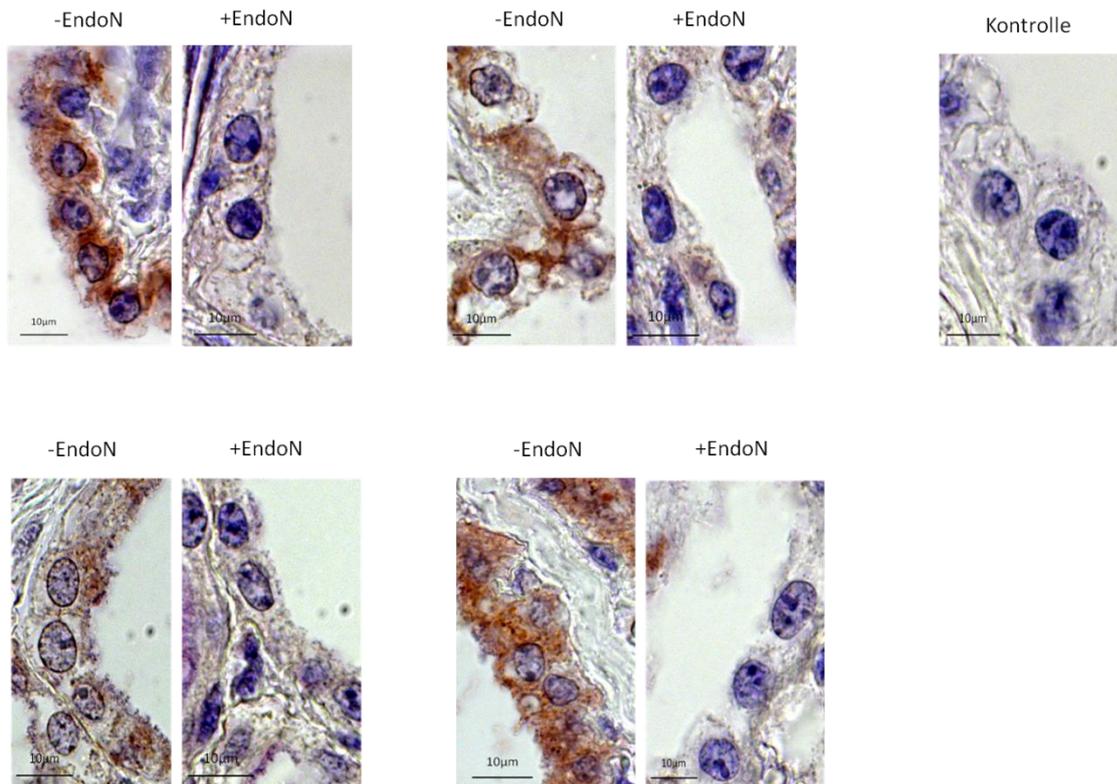


Abbildung 14. Behandlung einer bovinen Milchdrüse mit und ohne EndoN (mit Trypsinverdau): Dargestellt sind Milchdrüsenepithelzellen der Kuh. Die eine Hälfte der Proben wurde mit dem PolySia-abbauendem Enzym EndoN versetzt (+EndoN). Die andere Hälfte der Schnitte wurde exakt gleich behandelt, allerdings nicht mit EndoN versetzt, sondern zu dem Zeitpunkt nur mit Histopuffer inkubiert (-EndoN). Außerdem wurde eine Kontrolle für den Zweitantikörper mitgeführt (kein Erstantikörper). Blau dargestellt sind die Zellkerne, die mit Hämalaun angefärbt wurden. Braun zu sehen ist das spezifisch angefärbte PolySia. Der angegebene Messbalken beträgt 10 µm.

Zudem wurde eine Kontrolle mitgeführt, in welcher der mAk735 weggelassen wurde. Hier zeigte sich keine Färbung, was unspezifische Bindungen des sekundären Antikörpers ausschließt (Abbildung 14). Wie man in Abbildung 14 ebenfalls erkennen kann, war der EndoN-Verdau diesmal in allen Fällen erfolgreich. Die Gewebeschnitte ohne vorherigen enzymatischen PolySia-Verdau haben deutlich gefärbte Milchdrüsenepithelzellen. Bei den Schnitten, die mit EndoN versetzt wurden, erkennt man keine Braunfärbung mehr.

5.3 Nachweis der Genexpression von St8SialI und St8SialIV im Milchdrüsenepithel

Um zu analysieren, ob das Drüsenepithel die Polysialyltransferasen exprimieren, wurde mRNA isoliert und anschließend mittels reverse-Transkriptase in cDNA überführt. Die mittels rT-PCR vervielfältigten Produkte für *st8sialI* und *st8sialIV* wurden auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen. Außerdem wurde ein DNA-Marker mit aufgetragen, um hinterher auf die Größe der cDNA schließen zu können. Es wurden verschiedene Ausgangsmaterialien verwendet, um mRNA von *st8sialI* und *st8sialIV* nachzuweisen. Bovine Lunge und Hirn wurden als Positivkontrollen verwendet. Beide Gewebe sind dafür bekannt sind, dass St8SialI und St8SialIV exprimiert werden. Neben Eutergewebe wurden zudem kultivierte primäre Milchdrüsenepithelzellen untersucht. Nach der Detektion im UV-Licht waren in allen Proben, für beide Polysialyltransferasen, Banden zu sehen (Abbildung 15 und 16).

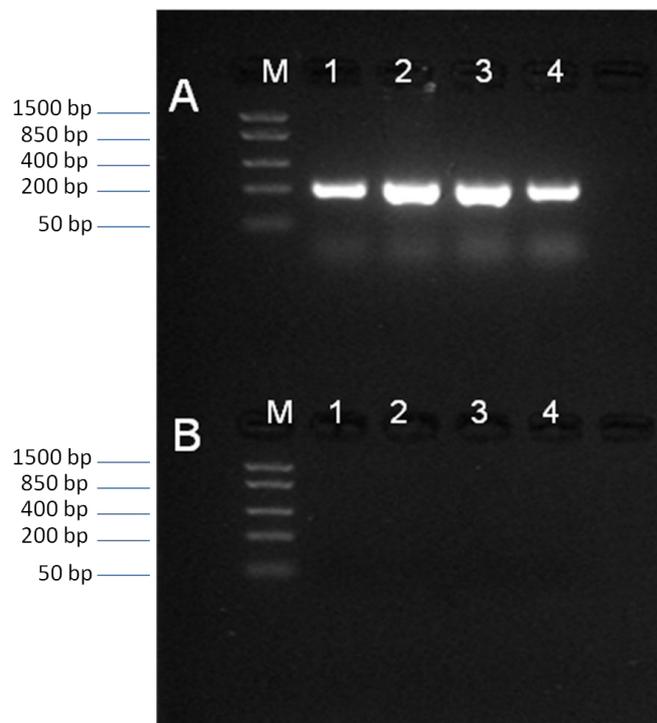


Abbildung 15. St8SialI-Transkripte nach rT-PCR: In dieser Abbildung wurde *Bos taurus* ST8 alpha-N-acetyl-neuraminide alpha-2,8-sialyltransferase 2 (St8SialI) Transkripte nach rT-PCR (Primer-TIB-Molbiol, 60°C) dargestellt. Es wurde 200 ng cDNA verwendet.

M steht für den DNA-Marker (FastRuler™ Low Range DNA Ladder, 50-1500 bp); bp steht für Basenpaare. Bahn 1: bovine MD+ (Milchdrüsenepithelzellen); Bahn 2: bovines Hirn (Gewebe); Bahn 3: bovine Lunge (Gewebe); Bahn 4: bovine MEC-K (Milchdrüsenepithelzellen); A: Steht für den kompletten PCR-Ansatz; B: Steht für den PCR-Ansatz ohne Transkriptase.

Die Banden liegen, sowohl bei *St8SialI* (Abbildung 15) als auch bei *St8SialIV* (Abbildung 16), im Bereich von 200 bp. Dies liegt im Bereich der vorausgesagten Produktgrößen. Die Negativkontrollen, ohne reverse Transkriptase, waren in allen Fällen negativ. Somit kann man eine Verunreinigung der Proben mit genomischer DNA ausschließen.

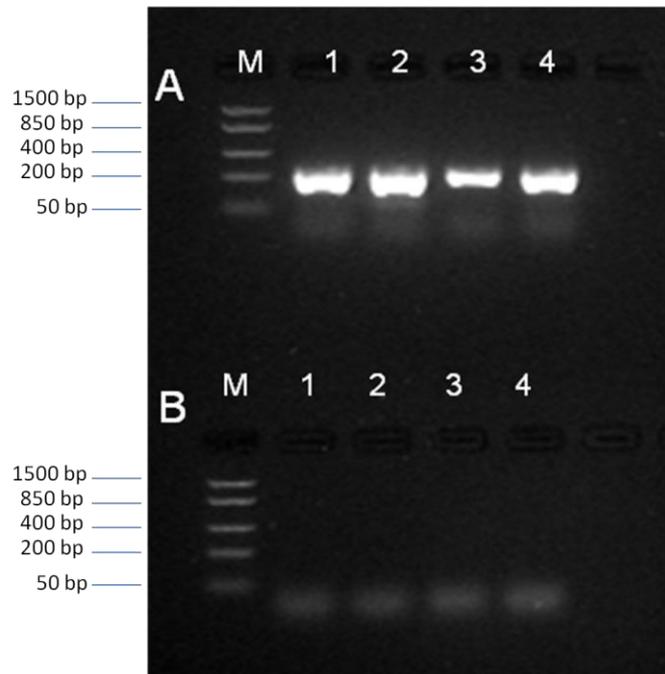


Abbildung 16. *St8SialIV*-Transkripte nach rT-PCR: In dieser Abbildung wurde *Bos taurus* ST8 alpha-N-acetylneuraminide alpha-2,8-sialyltransferase 4 (*St8SialIV*) Transkripte nach rT-PCR (Primer-TIB-Molbiol, 60°C) dargestellt. Es wurde 200 ng cDNA verwendet.

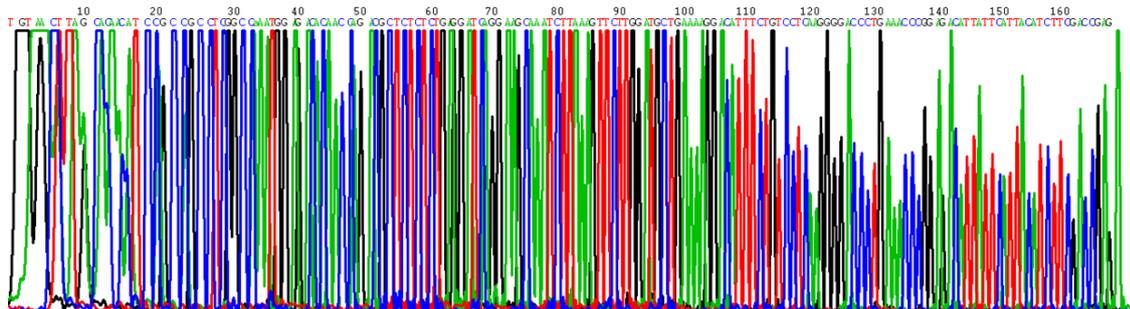
M steht für den DNA-Marker (FastRuler™ Low Range DNA Ladder, 50-1500 bp), bp steht für Basenpaare. Bahn 1: bovine MD+ (Milchdrüsengewebe); Bahn 2: bovine Hirn (Gewebe); Bahn 3: bovine Lunge (Gewebe); Bahn 4: bovine MEC-K (Milchdrüsenepithelzellen); A: Steht für den kompletten PCR-Ansatz; B: Steht für den PCR-Ansatz ohne Transkriptase.

5.3.1 Sequenzierung

Zum Validieren der vorherigen Ergebnisse sollte nun überprüft werden, ob die cDNA von Abbildung 15 und 16 der DNA-Sequenz von *st8sialI* und *st8sialIV* entspricht. Hierfür wurde eine Sequenzierung durchgeführt. Die Analysen wurden in der Servicegruppe *Sanger und Next-Generation-Sequenzierung (NGS)* durchgeführt. Abbildung 17 und 18 zeigen jeweils die Sequenz, welche zu mindestens 95% der publizierten Gensequenz in der GenBank entspricht. Dies wurde hier für beide Sialyltransferasen dargestellt. Hiermit wird bewiesen, dass es sich bei der cDNA aus Abbildung 15 und 16 um die Gene *st8sialI* und *st8sialIV* handelt.

Chromatogramm-Sequenzierung ST8SIA2 (PCR-Produkt, 197 bp Produktgröße)

5'-3' forward, 95% Übereinstimmung mit Genbanksequenz



Chromatogramm-Sequenzierung ST8SIA2 (PCR-Produkt, 197 bp Produktgröße)

5'-3' reverse, 99% Übereinstimmung mit Genbanksequenz

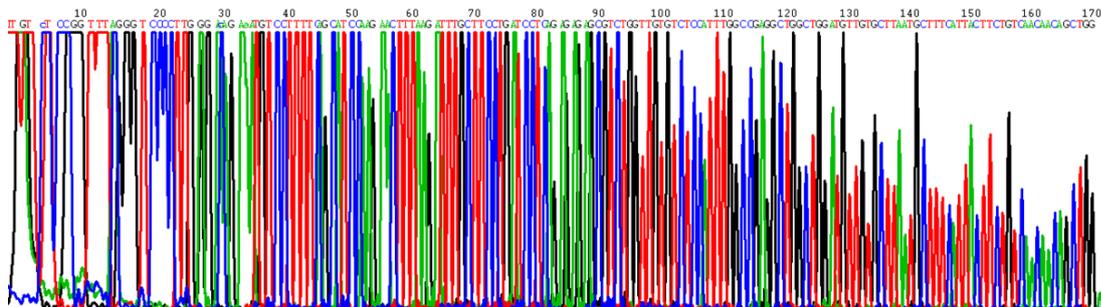
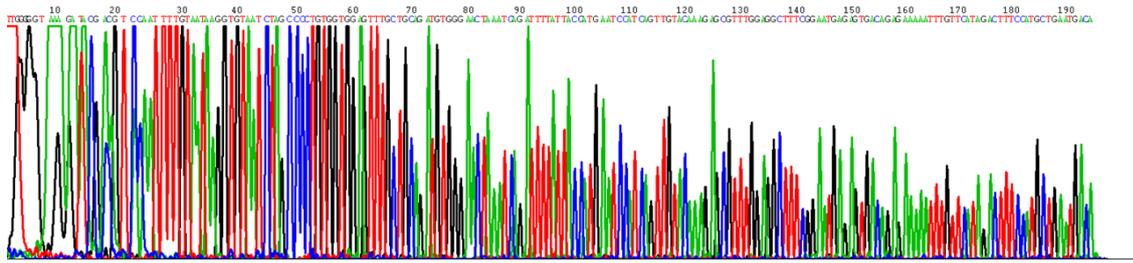


Abbildung 17. Sequenzierung der cDNA auf ST8Siall: Dargestellt ist die Sequenzierung der cDNA aus der verwendeten Probe (Milchdrüsengewebe). Es liegt eine Übereinstimmung von mindestens 95% mit der Sequenz für *st8siall* in der GenBank vor.

Chromatogramm-Sequenzierung ST8SIA4 (PCR-Produkt, 220 bp Produktgröße)

5'-3' forward, 97% Übereinstimmung mit Genbanksequenz



Chromatogramm-Sequenzierung ST8SIA4 (PCR-Produkt, 220 bp Produktgröße)

5'-3' reverse, 95% Übereinstimmung mit Genbanksequenz

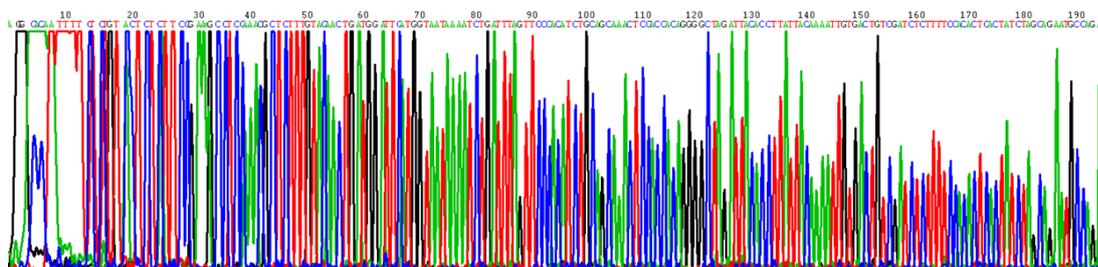


Abbildung 18. Sequenzierung von cDNA auf ST8SiaIV: Dargestellt ist die Sequenzierung der cDNA aus der verwendeten Probe (Milchdrüsenepithelgewebe). Es liegt eine Übereinstimmung von mindestens 95% mit der Sequenz für *st8siaIV* in der GenBank vor.

5.4 Histologische Unterschiede des PolySia-Gehalts in Milchdrüsenepithelzellen nach Infektion

Um mögliche Veränderungen des Polysialylierungsstatus bei einer Mastitis zu analysieren, wurden retrospektiv immunhistologische Analysen von Milchdrüsenepithelgewebe durchgeführt, welches mit *S. aureus*- oder *E. coli* infiziert wurde [Petzl et al, 2008]. Als Kontrolle (T0) werden die Schnitte bezeichnet, die aus dem Euterviertel stammen, welches nicht infiziert wurde. Dass es hierbei trotzdem zu leichten systemischen Veränderungen des Viertels gekommen ist, kann man, aufgrund der Infektion der anderen Euterviertel, nicht ausschließen. Als T24 werden die Schnitte bezeichnet, die 24 Stunden entweder mit *E. coli* oder *S. aureus* infiziert vorlagen, bevor die Gewebeprobe entnommen wurde. Alle Proben wurden entnommen, nachdem das Tier bereits tot war.

Wie in Petzl *et al* beschrieben, löste die *E. coli*- Infektion bei den Kühen eine sehr starke Infektion (auch systemisch) aus, wohingegen die Infektion mit *S. aureus* subklinisch ablief. In einer kleineren Vergrößerung (10fach) erkennt man, dass bei starker *E. coli*- Infektion (T24) das Drüsenepithelgewebe abgenommen hat und in

Bindegewebe umgebaut wurde. Nach einer Infektion mit *S. aureus* hingegen erkennt man, nach 24 Stunden Infektion (T24), keinerlei Drüsenverlust (Abbildung 19).

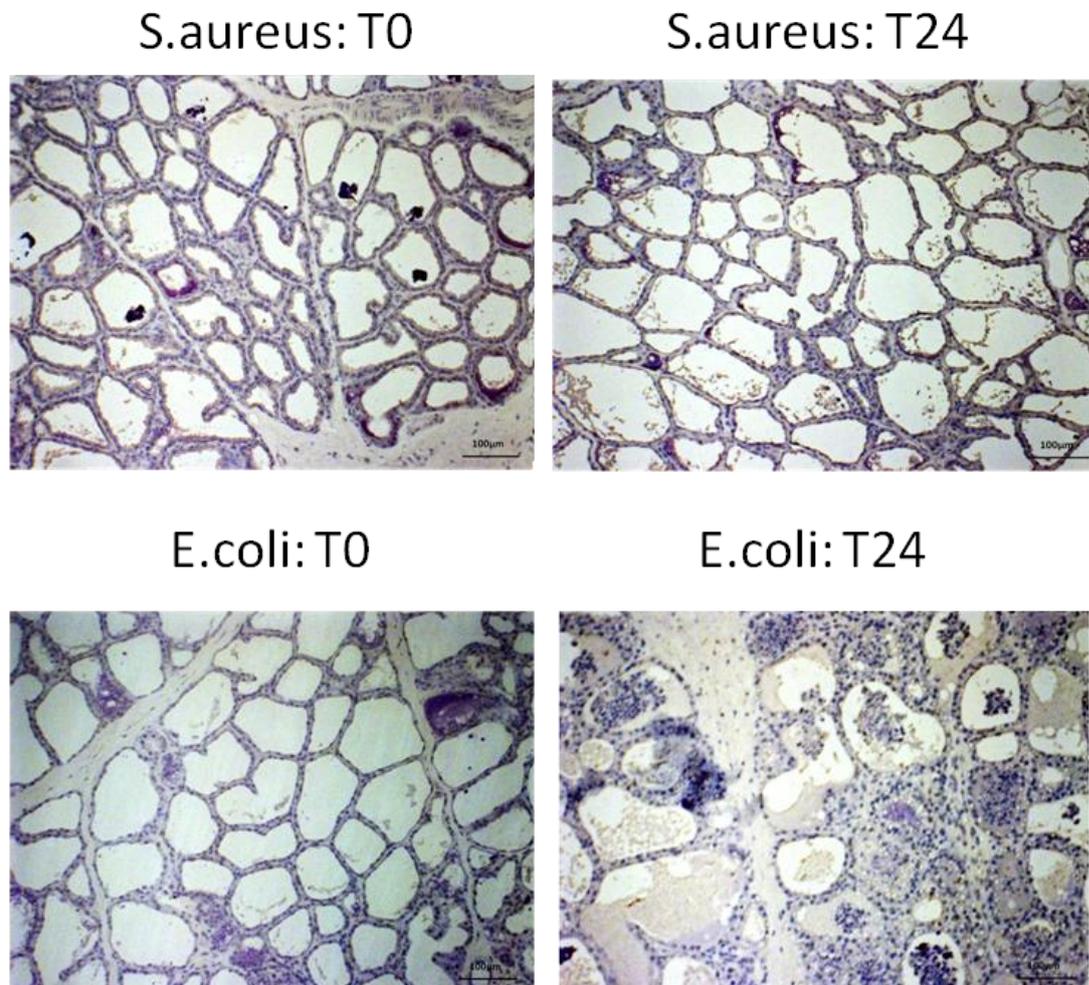


Abbildung 19. Übersichtsbild des Drüsengewebes der Kuh: Dargestellt wurden Schnitte vom Euterviertel T0 (Kontrolle, ohne Infektion) und T24 (24 Stunden Infektion) mit *E. coli* oder *S. aureus*. Die Bilder wurden mit einem 10er Objektiv aufgenommen. Der angegebene Messbalken beträgt 100 µm.

5.4.1 Nachweis von PolySia zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion

Nach erfolgreicher Identifizierung von PolySia in den Milchdrüsenepithelzellen wurde nun untersucht, ob optische PolySia-Mengenunterschiede im Verlauf der Infektion (Mastitis) zu erkennen sind und ob es Unterschiede zwischen einer Infektion mit dem Gram-negativen Bakterium *E. coli* und dem Gram-positiven Bakterium *S. aureus* gibt.

Die Schnitte wurden, wie im Methodenteil beschrieben, entparaffiniert und anschließend mit dem Antikörper mAk735 behandelt.

In Abbildung 20 erkennt man das braun angefärbte PolySia in den Milchdrüsenepithelzellen der Kuh. Es scheint, als gäbe es bei den mit *S. aureus*

infizierten Kühen, keinen PolySia-Mengenunterschied zwischen nicht infizierten und infizierten Eutervierteln.

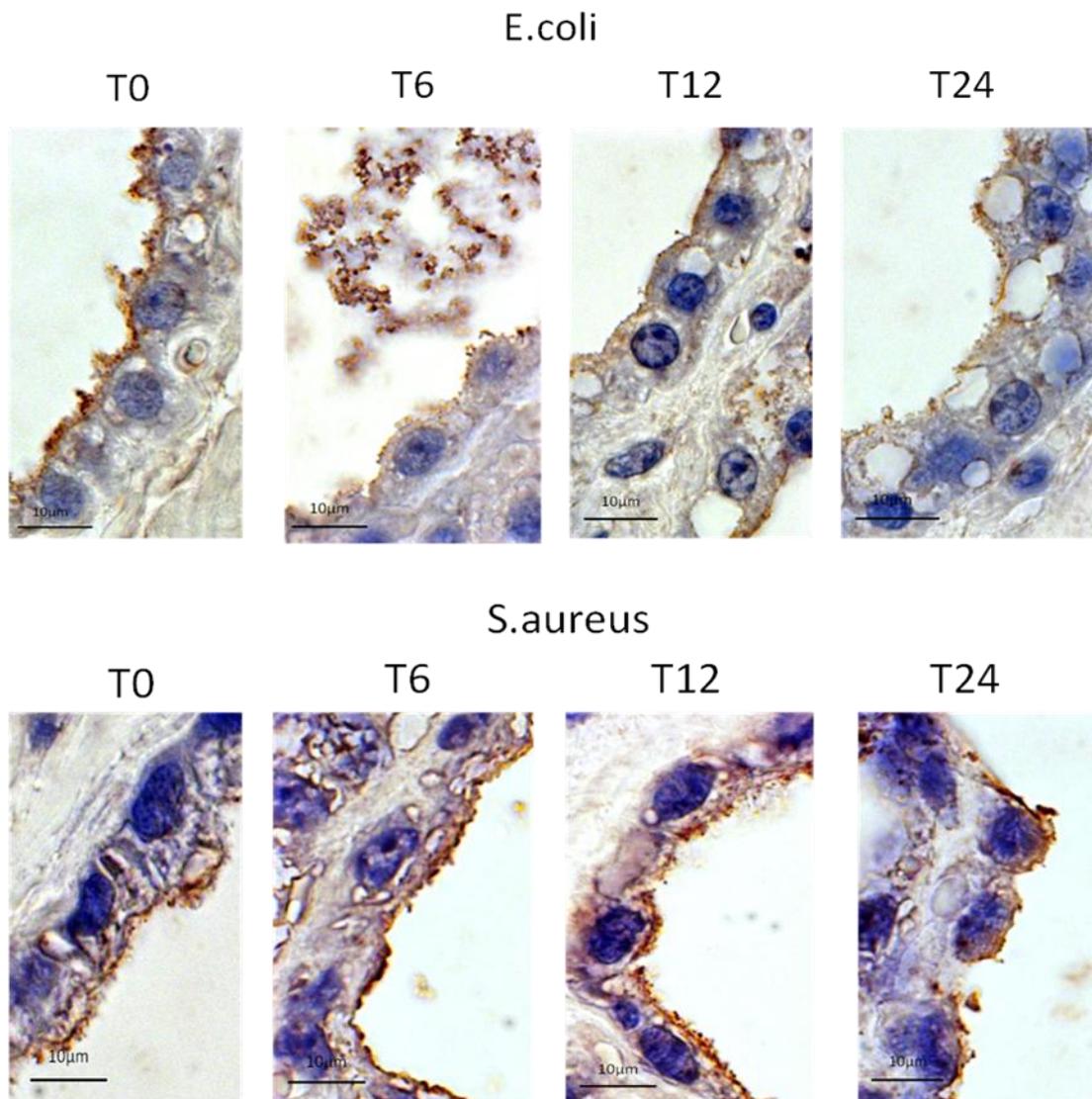


Abbildung 20. Nachweis von PolySia in Milchdrüsenepithelzellen, zu verschiedenen Zeitpunkten und nach Infektion mit *S. aureus* oder *E. coli*: Die Färbung von PolySia wurde mit DAB-Tabletten visualisiert. Nach Infektion mit *E. coli* wurden Bilder in verschiedenen Infektionsstadien (T0, T6, T12, T24) gemacht. T0 steht für die Kontrolle mit Kochsalzlösung und ohne Bakterienstamm. Nach Infektion mit *S. aureus*, wurden ebenfalls Bilder zu vier verschiedenen Zeitpunkten (T0, T6, T12, T24) gemacht. Braun dargestellt wurde das angefärbte PolySia. Als primärer Antikörper wurde mAk735 verwendet. Blau dargestellt sind hier die Zellkerne, die mit Hämalaun angefärbt wurden. Der angegebene Messbalken beträgt 10 µm.

Nach der Infektion mit *E. coli* ist ein deutlicher Unterschied zwischen dem nicht infizierten und dem infizierten Eutergewebe zu sehen. Das nicht infizierte Gewebe zeigt den höchsten PolySia-Gehalt in den Milchdrüsenepithelzellen. 6 Stunden (T6) nach der *E. coli*-Infizierung erkennt man, dass das PolySia-Signal in den Epithelzellen

abnimmt. Allerdings sieht man, zu diesem Zeitpunkt, in den Alveolen des Gewebes vermehrt braun angefärbte Ablagerungen. Nach 12 (T12) und 24 (T24) Stunden erscheint der PolySia-Gehalt in den Milchdrüsenepithelzellen vergleichbar mit den Färbungen nach 6 Stunden. Auch hier sieht man, im Vergleich zu nicht infiziertem Gewebe, vermehrt braune Ablagerungen in den Alveolen.

5.4.2 Veränderungen der Expressionsrate der Polysialyltransferasen zu verschiedenen Zeitpunkten nach *E. coli*- Infektion

Da bei einer *E. coli*-Infektion Unterschiede im PolySia-Status histologisch detektiert werden konnten, wurde von denselben Tieren quantitative mRNA Analysen für *st8siaII* und *st8siaIV* durchgeführt. Die Analysen wurden von der Service Gruppe *Zytometrie* am FBN durchgeführt und von Frau Dr. Juliane Günther ausgewertet.

Bei den Produktanalysen von *st8siaII* und *st8siaIV* mRNA ergab sich, dass beide Polysialyltransferasen während der *E. coli*- Infektion reguliert werden. Während *st8siaII* nach 12 Stunden eine statistisch signifikante Erhöhung zeigt, ist ein verdoppeltes *st8siaIV* mRNA-Level nach 24 Stunden zu beobachten (Abbildung 21).

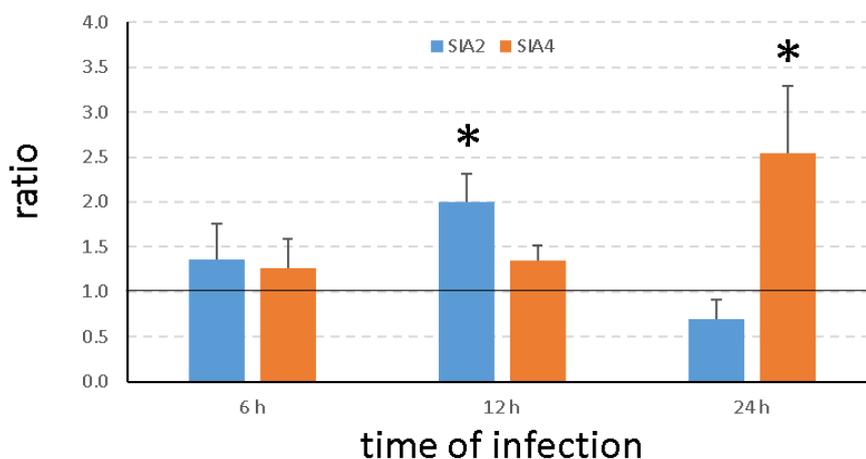


Abbildung 21. Expression von *st8siaII* und *st8siaIV* in Eutergewebe, nach experimenteller Infektion mit *E. coli*: Die mRNA der Polysialyltransferasen wurde in Gewebeproben aus nichtinfizierten sowie 6 h, 12 h und 24 h infizierten Eutervierteln, mittels rT-PCR, quantifiziert. Die jeweilige Veränderung des Expressionslevels der Gene nach *E. coli* Infektion wurden durch Vergleich mit dem jeweiligen Kontrollviertel (nicht infiziertes Viertel = ratio 1,0) ermittelt (n = 4 Tiere pro Euterviertel, Mittelwert \pm SEM). * p < 0,05.

6.Diskussion

Die Milch spielt eine große Rolle in der Ernährung von Säugetieren. Für Schafe, Kühe, Menschen und alle anderen Säuger ist das Kolostrum für die Jungtiere in den ersten Lebenstagen bzw. -wochen von großer Bedeutung [Uruakpa et al, 2002; Puppel et al, 2019]. Dies enthält neben Proteinen, Lipiden und Peptiden weitere lebenswichtige Bestandteile, wie unter anderem Immunglobuline und Laktoferrin [Bagwe et al, 2015; Zimecki et al, 2005]. In dieser Dissertation wurde PolySia als weiterer Bestandteil des Kolostrums, sowie reifer Milch in verschiedenen Säugern nachgewiesen.

6.1 Nachweis von PolySia in der Milch

Das Polysaccharid PolySia wurde bereits in einigen Zellen/Geweben nachgewiesen. Auch in der humanen und murinen Milch ist PolySia als Bestandteil bereits bekannt [Yabe et al, 2003]. Um zu überprüfen, ob PolySia universell in der Milch von anderen Säugern vorkommt, wurden verschiedene Milchproben von unterschiedlichen Säugetierarten untersucht. Im besonderen Fokus war dabei Kuhmilch, da sie eines der gängigsten Lebensmittel ist, sowie zumeist als Basiskomponente bei der Herstellung von Säuglingsersetznahrung dient. Unter den analysierten Milchproben war auch Kolostralmilch von Holstein Friesian Kühen, in der ein deutliches PolySia-Signal zu erkennen war.

Weiterhin wurde die spätere reife Kuhmilch vom Holstein Friesian auf das Vorhandensein von PolySia getestet. Im Gegensatz zum Kolostrum war in der reifen Milch PolySia unter der Nachweisgrenze vom angewendeten Western-Blot. Um zu sehen, wie sich im Detail der PolySia-Gehalt in der Milch im Laufe der Laktationszeit von Holstein Friesian Kühen verändert, wurde der PolySia-Gehalt in der bovinen Milch am Tag der Kalbung und im weiteren Verlauf getestet. Auch hier zeigte sich, dass die erste Kolostralmilch mehr PolySia enthält als im weiteren Verlauf der Laktation. Somit scheint es, als würde im Verlauf der Laktationszeit die PolySia-Konzentration in Milch von Holstein Friesian Kühen sehr stark abnehmen.

Beim Menschen jedoch ist nicht nur im Kolostrum eine nachweisbare Menge von PolySia zu finden. Auch in der weiteren Laktationszeit, die für gewöhnlich jedoch deutlich kürzer ist als bei Holstein Friesian Kühen, ist PolySia in größeren Mengen in der Milch, nachweisbar [Yabe et al, 2003]. Auffällig war zudem der hohe PolySia-Gehalt in der reifen Schweinemilch. Neben der Muttermilch waren hier die deutlichsten Signale zu erkennen.

Um zu prüfen, ob auch in anderer reifer boviner Milch die PolySia-Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze im Western-Blot ist, wurde das Dexter-Rind getestet. Das Dexter-Rind ist eine kleine Rinderrasse, die im Vergleich zu Holstein Friesian bedeutend weniger Milch pro Tag produziert [Dexter Verband Deutschland e.V.; Bundesrasseverband Deutscher Dexter-Züchter und -Halter e.V.]. Holstein Friesian werden hingegen hauptsächlich als Hochleistungsmilchkuh gehalten. Im Gegensatz dazu wird in den meisten Fällen die Dexter-Kuhmilch zur Aufzucht der Jungtiere verwendet. Im durchgeführten Western-Blot war ein PolySia-Signal bei der Dexter-Milchprobe zu erkennen. Hier ist PolySia, im Gegensatz zur Milch von Holstein Friesian, in einer nachweisbaren Menge in reifer Milch vorhanden. Hierbei sollte erwähnt werden, dass es sich auch bei der Dexter-Milchprobe nicht um Kolostrum handelte. Die Milch wurde im späteren Laktationszyklus entnommen.

Die Unterschiede zwischen den beiden Rinderrassen könnten mehrere Gründe haben. Es könnte sein, dass die PolySia-Synthese im Laktationsverlauf unterschiedlich reguliert wird und deshalb bei Holstein Friesian im Western-Blot kein Signal zu sehen war. Eine weitere Möglichkeit könnte die pro Tag produzierte Milchmenge sein, die im Vergleich zum Dexter-Rind deutlich höher ist [Dexter Verband Deutschland e.V.; Bundesrasseverband Deutscher Dexter-Züchter und -Halter e.V.; Arbeitsgemeinschaft Süddeutscher Rinderzucht- und Besamungsorganisationen]. Hier könnte es sein, dass PolySia aufgrund der hohen Verdünnung unterhalb der Nachweisgrenze im Western-Blot liegt. Darüber hinaus haben Hochleistungsmilchkühe eine negative Energiebilanz [Xu et al, 2020]. Für die Synthese von Sialinsäuren wird jedoch Glucose benötigt [Schauer, 2004]. Die Konsequenz dieser Erkenntnisse sind für den Menschen vielschichtig. Bovine Milch, die sehr häufig als Baby-Ersatznahrung verwendet wird, hat, wie für das Holstein-Friesian Rind exemplarisch dargestellt, einen sehr geringen PolySia-Gehalt [Wang und Brand-Miller, 2003]. Somit nehmen Säuglinge, die mit Baby-Ersatznahrung aufwachsen, im Vergleich zu Stillkindern in den ersten Wochen bis Monaten deutlich weniger PolySia zu sich.

Betrachtet man nun die Tatsache, dass PolySia die neuronale Entwicklung bei Säugetieren fördert [Varki & Schauer, 2009; Hildebrandt et al, 2007], könnte man zu dem Schluss kommen, dass bovine Milch allein nicht ausreichend für eine ausgewogene Baby-Ersatznahrung ist. Außerdem zeigen Versuche mit Rattenbabies, dass eine sialinsäurereiche Ernährung, zu einer höheren Intelligenz führt [Morgan & Winick, 1980a; Wang und Brand-Miller, 2003]. Bislang ist jedoch noch nicht vollständig klar, ob und wie oral verabreichte Sialinsäure bei den Säuglingen über den Darm aufgenommen werden kann. In einem Versuch mit Rattenbabies konnte jedoch gezeigt werden, dass auch nach oraler Gabe von Sialinsäure eine erhöhte

Sialinsäurekonzentration in Glykoproteinen und Gangliosiden im Gehirn vorhanden war [Wang und Brand-Miller, 2003].

Weitere Studien ergaben, dass auch Kinder, die lange gestillt wurden, im weiteren Lebensverlauf einen höheren Intelligenzquotienten zeigten [Mortensen et al, 2002; Wang und Brand-Miller, 2003]. Die Intelligenz korrelierte hier mit der Stillzeit. Kinder, die mit Muttermilchersatz gefüttert wurden, schnitten hingegen deutlich schlechter ab [Mortensen et al, 2002; Wang und Brand-Miller, 2003]. Eine Supplementierung von Säuglingersatznahrung mit PolySia oder Säuglingersatznahrung, die auf Basis von boviner Kolostralmilch hergestellt wurde, könnte ein Defizit an Sialinsäuren möglicherweise ausgleichen und somit einen entscheidenden Einfluss auf die frühkindliche Entwicklung haben. Des Weiteren könnte Kuhmilch von Rinderrassen verwendet werden, die höhere Anteile an PolySia haben. Dexter wäre gegebenenfalls eine Alternative zu dem klassischen Milchvieh Holstein Friesian. Es sind aber noch zahlreiche andere Rassen in der Nutztierhaltung, die auf ihren PolySia-Gehalt hin getestet werden könnten.

6.2 PolySia-Lokalisation im Milchdrüsengewebe –

Untersuchung auf Zellebene

Nach dem Nachweis von PolySia in der Milch, sollte nun die Lokalisation von PolySia im Milchdrüsengewebe untersucht werden. Hierzu wurde bovines Milchdrüsengewebe verwendet. Bei den immunhistochemischen Analysen war PolySia eindeutig in den Milchdrüsenepithelzellen zu sehen.

Der Spezifitätstest der PolySia-Färbung ließ anfangs darauf schließen, dass die aufgenommenen Signale unspezifisch waren. Hierfür wurde das Enzym EndoN verwendet. Das Enzym ist in der Lage PolySia zu degradieren, sodass Kettenlängen mit maximal sieben Sialinsäureresten entstehen. Der mAk735, der an PolySia bindet, benötigt jedoch mindestens acht Sialinsäurereste, um diese zu erkennen. Nach dem Verdau mit EndoN war zunächst kein Unterschied zwischen der Behandlung mit und ohne EndoN erkennbar. Der Spezifitätstest hat also nicht funktioniert (siehe Abbildung 13).

Ein möglicher Grund hierfür, wäre die Interaktion zwischen PolySia und Laktoferrin. Da die PolySia-Färbung einen vesikulären Charakter hat, wurde angenommen, dass in den Vesikeln dicht gepackte PolySia-Laktoferrin Komplexe vorhanden sind. Nach der Formalinfixierung werden die Proteine kreuzvernetzt und blockieren so den enzymatischen Abbau durch EndoN. Aus diesem Grund wurde mit einem Proteaseverdau eine Demaskierungsstrategie angewendet, die häufig bei

Paraffinpräparaten genutzt wird. Der Versuch wurde erneut durchgeführt, jedoch dieses Mal mit einem vorherigen kurzen Trypsinverdau der Gewebeschnitte. Durch das Trypsin werden die Interaktionspartner von PolySia (zum Beispiel Laktoferrin) verdaut und hinterlassen anschließend eine freie PolySia-Kette, die nun im entfalteten Zustand vorliegt. Nach erneutem EndoN-Verdau, konnte die spezifische Bindung des mAk735 an PolySia, in den Milchdrüsenepithelzellen, nachgewiesen werden. Die zumeist intrazelluläre Lage ist ebenfalls gut erkennbar (siehe Abbildung 14).

Es scheint, als wäre EndoN, ohne den Trypsinverdau, nicht in der Lage, an sein spezifisches Epitop von PolySia zu binden und somit die Homopolymerkette abzubauen. Durch den Verdau dieser, war EndoN nun vermutlich in der Lage an PolySia zu binden und dieses abzubauen. Verwunderlich erscheint jedoch zunächst, dass der mAk735 ohne vorangegangenen Proteaseverdau PolySia binden aber EndoN es nicht vermag die Ketten zu spalten. Dies ist wohl damit zu erklären, dass die PolySia-Kette sehr flexibel ist und unterschiedlichste 3D-Strukturen eingehen kann (Abbildung 22). Während der mAk735 PolySia an Stellen mit einer Schleife im PolySia-Strang bindet, interagiert EndoN mit gestreckten helikalen Strukturen [Nagae et al, 2013; Haselhorst et al, 2006; Stummeyer et al, 2005]. Eine mit EndoN vergleichbare Bindestrategie wird auch bei Laktoferrin vermutet [Kühnle et al, 2019a]. Diese Unterschiede, beziehungsweise Gemeinsamkeiten, könnten der Grund für den nötigen Proteaseverdau für EndoN sein.

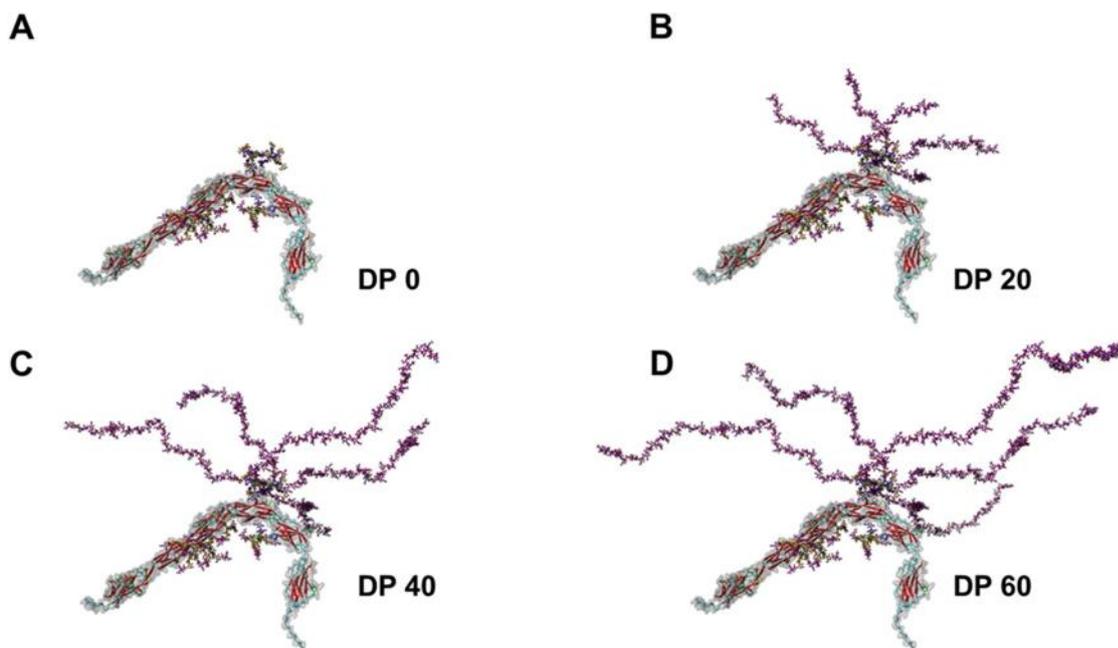


Abbildung 22. Polysialyliertes NCAM: 3D Model von NCAM mit unterschiedlich langen PolySia-Ketten (Kettenlänge, DP). Abbildung aus [Galuska et al, 2017 Biology], CC BY.

6.3 Nachweis der Polysialyltransferasen St8SialII und St8SialIV im bovinen Milchdrüsengewebe – Untersuchung auf RNA-Ebene

Da PolySia durch die Immunhistochemie in den Milchdrüsenepithelzellen sichtbar gemacht werden konnte, sollte nun untersucht werden, ob PolySia auch in den Milchdrüsenepithelzellen synthetisiert wird.

Die bereits bekannten Polysialyltransferasen St8SialII und ST8SialIV wurden schon in mehreren Gewebearten, wie zum Beispiel in der Lunge und dem Gehirn, nachgewiesen [Yoshida et al, 1995; Krocher et al, 2015; Tanaka et al, 2000]. Die Polysialyltransferasen werden je nach Entwicklungsstadium und Gewebe unterschiedlich exprimiert [Oltmann-Norden et al, 2008].

Es sollte nun überprüft werden, ob in dem verwendeten bovinen Milchdrüsengewebe, die Polysialyltransferasen St8SialII und/oder St8SialIV exprimiert werden. Bovine Lunge und Gehirn dienten als Positivkontrollen. Nach der Isolierung von RNA aus dem Gewebe, wurde die RNA in cDNA umgeschrieben. Mit Hilfe einer rT-PCR, wurde die entsprechend gesuchte DNA vervielfältigt und in einem 2%igen Agarosegel sichtbar gemacht (siehe Abbildung 15 und 16). Es zeigte sich, dass neben den Kontrollen Hirn und Lunge auch im Eutergewebe beide Polysialyltransferasen (sowohl St8SialII als auch St8SialIV) im Milchdrüsengewebe (MD) exprimiert werden. Da das Milchdrüsengewebe aus mehreren verschiedenen Zelltypen besteht, kann man hiermit keine genaue Aussage darüber treffen, in welchen Zellen St8SialII und St8SialIV exprimiert vorliegen. Um das Ergebnis zu spezifizieren, wurden außerdem Milchdrüsenepithelzellen (Primärzelllinie) auf eine mögliche St8SialII- und St8SialIV-Expression untersucht, die von Frau Dr. Juliane Günther zur Verfügung gestellt wurden. Auch diese zeigten eine Expression von beiden Polysialyltransferasen. Dass es sich bei den gezeigten Banden auf dem Agarosegel wirklich um die Gensequenz der beiden Polysialyltransferasen handelt, wurde mit einer Sequenzierung abschließend nachgewiesen (Abbildung 17 und 18).

Somit wurde das Ergebnis und die Hypothese der Immunhistochemie bestätigt. Nicht nur PolySia ist in den Milchdrüsenepithelzellen zu finden, sondern auch die Polysialyltransferasen, die es bilden kann. Weil die Transferasen in den Milchdrüsenepithelzellen exprimiert werden, ist anzunehmen, dass die Sialinsäurepolymere auch hier synthetisiert werden. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass auch PolySia aus dem Blut, zusätzlich zu den im Drüsenepithel gebildeten Polymeren, in die Milch transferiert wird.

6.4 PolySia während einer Mastitis

Da PolySia zahlreiche immunmodulatorische Funktionen zugesprochen werden, sollte untersucht werden, ob es zu Veränderungen der PolySia-Maschinerie während einer Mastitis kommt. Werneburg *et al* beschrieben 2016 bereits die Wirkung von Lipopolysacchariden auf das Freisetzen von polysialylierten Proteinen. Lipopolysaccharide (LPS) kommen natürlich in Gram-negativen-Bakterien, wie *E. coli*, vor und scheinen die Freisetzung von polysialylierten Proteinen aus ihren Zellen zu fördern. Diese wiederum können die durch LPS-induzierte Stickstoffmonoxidproduktion vermindern und wirken somit als Schutz [Werneburg et al, 2016].

Um die Bedeutung von PolySia bei Infektionen von Milchdrüsenepithel zu untersuchen, wurde ein bovines Mastitismodell untersucht. Hierfür wurden die Euter von Milchkühen direkt mit Pathogenen infiziert. Als Pathogen wurde entweder der Gram-negative-Erreger *E. coli* oder das Gram-positive-Bakterium *S. aureus* verwendet.

Ein Euter wird in vier gleiche Viertel eingeteilt. Jedes Viertel besitzt eine eigene Milchdrüse. Dabei wurden die infizierten Euterviertel jeweils nach 6, 12 und 24 Stunden Infizierung untersucht. Ein weiteres Euterviertel wurde nach 24 Stunden Kochsalzlösung-Behandlung gewonnen (Kontrolle bzw. T0). Dieser Vorgang wurde mit mehreren Kühen, mit einer *E. coli*-Infizierung, exakt so durchgeführt. Weitere Kühe wurden in gleicher Art und Weise, jedoch mit *S. aureus*, infiziert.

Bei der Untersuchung, mit Hilfe der Immunhistochemie, sollte beachtet werden, dass die uninfizierten Euterviertel durchaus systemischen Effekten ausgesetzt waren. Dies ist bedingt durch die akute Infektion der anderen Euterbereiche.

In Abbildung 19 konnte man bei *E. coli*- Infektion nach 24 Stunden starke Veränderungen im Drüsengewebe feststellen. Durch die 24-Stunden-Infektion kam es zum Umbau des Euters und zur Abnahme des Drüsengewebes. Im Gegensatz dazu sieht man bei *S. aureus*- Infektion keinen Unterschied im Drüsengewebe. Dieses Ergebnis war zu erwarten, da eine Infektion mit *E. coli* sehr häufig starke klinische Infektionen auslöst, die nicht nur zur Zerstörung des Drüsengewebes führen, sondern eventuell auch zum Tod der Kühe. Da *S. aureus*- Bakterien hauptsächlich chronische Infektionen auslösen und diese in vielen Fällen subklinisch ablaufen, war hier, in der kurzen Infektionszeit von 24 Stunden, das Ergebnis zu erwarten.

Die Gewebe, deren histologische Veränderungen bereits in Petzl *et al* beschrieben wurden [Petzl et al, 2008], sind retrospektiv auf ihren PolySia-Gehalt untersucht worden. Bei den mit *E. coli* infizierten Gewebeschnitten ist in den Kontrolltieren ohne Infizierung (T0) ein starkes PolySia-Signal in den Milchdrüsenepithelzellen zu erkennen. 6 Stunden nach Infektion mit *E.coli* ist auffällig, dass sehr starke

Ablagerungen, die PolySia-positiv sind, in den Alveolen zu sehen sind, aber gleichzeitig das PolySia-Signal in den Milchdrüsenepithelzellen abnimmt. Sowohl bei T12 als auch bei T24 erkennt man weiterhin die PolySia-positiven Ablagerungen in den Alveolen. Auch hier liegt in etwa ein gleich starkes Signal an PolySia in den Milchdrüsenepithelzellen vor, wie nach 6 Stunden.

Bei den Gewebeschnitten eines Kuheuters, welche mit *S. aureus* infiziert wurden, wurde ebenfalls, wie beschrieben, auf unterschiedliche PolySia-Konzentrationen zu den verschiedenen Infektionszeitpunkten getestet. Es war jedoch kein Unterschied in der Färbung und somit in der PolySia-Konzentration in den Milchdrüsenepithelzellen zu sehen. Nach 6 Stunden sind die Ablagerungen, die bei der *E. coli*- Infektion zum gleichen Zeitpunkt zu sehen waren, nicht zu erkennen.

Dieses Ergebnis bestätigt die Hypothese, dass nach einer *E. coli*- Infektion des Euters, bzw. nach LPS-Stimulation, innerhalb von 6 Stunden PolySia aus den Zellen abgegeben werden könnte. Das Gram-positive Bakterium *S. aureus* jedoch besitzt kein LPS. Auch lässt sich bei *S. aureus* keine Ausschüttung von PolySia aus den Epithelzellen vermuten. Dieser Versuch wurde mehrmals mit verschiedenen Kuhproben durchgeführt und lieferte immer das oben beschriebene Ergebnis.

Interessanterweise wurde zudem nachgewiesen, dass die Exprimierung der Polysialyltransferasen während der Mastitis reguliert wird. So kam es nach 12 Stunden zu einem signifikanten Anstieg von *st8siaII* mRNA, während sich mRNA von *st8siaIV* nach 24 Stunden mehr als verdoppelt hat. Somit deuten die Daten darauf hin, dass PolySia bei einer Infektion von Milchdrüsenewebe involviert ist.

Dass PolySia für das Immunsystem eine wichtige Rolle spielt, wurde bereits von mehreren Wissenschaftlern beschrieben [Werneburg et al, 2016; Kiermaier et al, 2016; Rollenhagen et al, 2013]. Durch NET gelangen antimikrobielle Faktoren, wie Histone und Laktoferrin, direkt an den Ort der Infektion, um Pathogene zu bekämpfen. Wie in der Einleitung beschrieben, stellen Laktoferrin, dessen Abspaltprodukt Laktoferricin ist, sowie Histone, Interaktionspartner von PolySia dar [Kühnle et al, 2019b; Zlatina et al, 2018]. Es konnte gezeigt werden, dass PolySia die Histon-vermittelte Zellschädigung bei eukaryotischen Zellen vermindern kann, ohne die antimikrobielle Aktivität von Lysin-reichen Histonen zu beeinflussen [Zlatina und Galuska, 2019]. Somit wären bei einer Mastitis körpereigene Zellen vor den toxischen Eigenschaften von Histonen geschützt, während Bakterien weiterhin von Histonen geschädigt werden. Des Weiteren wird vermutlich über PolySia die Akkumulierung von Laktoferrin moduliert [Kühnle et al, 2019b] sowie die Ausschüttung von NET inhibiert [Kühnle et al, 2019c]. Somit könnte PolySia in der Milch, neben der reinen Nährstoffversorgung für den

Säugling, auch eine immunologische Funktion für Kind aber auch Mutter haben, die unter anderem während einer Mastitis zum Tragen kommt.

In dieser Dissertation wurde das Vorkommen und die Funktion von PolySia hauptsächlich anhand boviner Proben untersucht. Da PolySia jedoch nachweislich auch in humaner Milch vorkommt, ist es wahrscheinlich, dass diese Ergebnisse auch auf die Humanmedizin übertragen werden können. Die Kuh stellt in dieser Dissertation also ein Modell dar, mit dem man mögliche Aufgaben von PolySia in der Humanmedizin eruieren soll.

7.Zusammenfassung

Die Polysialinsäure (PolySia) ist ein lineares Kohlenhydratpolymer, welches aus mindestens acht N-Acetylneuraminsäureresten besteht. Es ist in mehrere physiologische Prozesse involviert. Unter anderem scheint es eine Rolle in Bezug auf das Immunsystem und in der Hirnentwicklung bei Säugetieren zu spielen.

In vorherigen Versuchen wurde bereits das Vorliegen von PolySia in humaner und muriner Milch untersucht und bestätigt. Ziel der Arbeit war es nun, den Ort der PolySia-Bildung und die Auswirkung von Infektionen, in diesem Fall einer Mastitis, auf PolySia zu untersuchen. Des Weiteren stand Kuhmilch im Fokus, da sie meist als Basis für Säuglingsergänzungsnahrung fungiert und eines der gängigsten Lebensmittel darstellt.

Als Methoden wurden, unter anderem, der Western Blot, die Immunhistochemie und eine reverse-Transkriptase PCR (rT-PCR) angewandt.

PolySia konnte in einigen Milchsorten von unterschiedlichen Säugern nachgewiesen werden. Auffällig war dabei, dass nach Muttermilch die höchsten PolySia-Mengen in Schweinemilch vorlagen, während in reifer Milch von Hochleistungsmilchkühen (Holstein Friesian) die Signale lediglich nahe der Nachweisgrenze oder drunter lagen. Eine Ausnahme zeigte hier die Kolostralmilch dieser Milchkühe, die noch hohe Mengen an PolySia enthielt. Mittels Immunhistochemie konnte gezeigt werden, dass PolySia in Milchdrüsenepithelzellen lokalisiert ist. Zudem wurden Transkripte beider Polysialyltransferasen, St8SialII und St8SialIV, detektiert.

Anschließend wurde die Bedeutung der PolySia während einer Infektion untersucht. Hierfür wurde ein Mastitismodel am Kuheuter angewendet. Zu erkennen war, bei starker Infektion mit dem Gram negativen Bakterium *E. coli*, eine vermehrte PolySia-Abgabe in die Alveolen. Zudem erhöhten sich die Transkripte beider Polysialyltransferasen. Bei der subklinischen Infektion mit dem Gram-positiven Bakterium *S. aureus* zeigte sich hingegen keine PolySia-Abgabe in die Alveolen des Milchdrüsenengewebes. Dies könnte durch Lipopolysaccharide bedingt sein, die nur bei Gram-negativen Bakterien zu finden sind. Dies lässt eine Rolle von PolySia im Zusammenhang mit der Immunabwehr, bei starken Infektionen mit Gram-negativen Bakterien, wie *E. coli*, vermuten und wäre ein weiterer Hinweis für die Bedeutung von PolySia in Bezug auf das Immunsystem.

8. Abstract

Polysialic acid (polySia) is a linear carbohydrate polymer consisting of at least eight N-acetylneuraminic acid residues. It is involved in several physiological processes. Among others, it seems to play a role during immunological processes and the development of the brain in mammals.

In previous experiments, the presence of polySia in human and murine milk has been investigated and confirmed. The aim of the outlined study was to investigate the location of the polysialylation process in udder and the effect of an infection, in this case mastitis, on the polysialylation status. Furthermore, the focus was on cow's milk, as it is usually the basis for infant replacement food and is one of the most common food products. The analytical methods, which were applied, included e.g. Western blot, immunohistochemistry and reverse transcriptase PCR (rT-PCR).

PolySia could be detected in several milk types from different mammals. It was remarkable that after breast milk the highest amounts of polySia were found in pig milk, whereas in mature milk from high yielding dairy cows (Holstein Friesian) the signals were close to or below the detection limit. An exception was colostrum of these dairy cows, which still contained high amounts of polySia. Using immunohistochemistry, it was demonstrated that polySia is localized in mammary gland epithelial cells. Furthermore, transcripts of both polysialyltransferases, St8SialII and St8SialIV, were detectable.

Subsequently, the polySia-status during infection was investigated. For this purpose, a mastitis model was applied in cow's udders. An increased release of polySia into the alveoli was observed during infections with the Gram negative bacterium *E. coli*. Furthermore, the transcripts of both polysialyltransferases increased. However, subclinical infection with the Gram-positive bacterium *S. aureus* did not result in polySia release into the alveoli of the mammary gland tissue. The results let suggest, that lipopolysaccharides trigger the processes, which are only found in Gram-negative bacteria. In addition, a role of polySia as a part of the immune defense is likely during severe infections with Gram-negative bacteria, such as *E. coli*. Thus, the obtained results are further indications for the involvement of polySia during immunological processes.

9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die häufigsten Sialinsäuren bzw. sialylierten Moleküle.....	2
Abbildung 2: Aufbau der Glykokalyx am Beispiel eines Spermiums.....	3
Abbildung 3: PolySiastruktur.....	4
Abbildung 4: Milchsekretion.....	11
Abbildung 5: Unterschiede im Aufbau zwischen Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien.....	16
Abbildung 6: Darstellung eines Kuheuters	41
Abbildung 7: Western-Blot Analyse von PolySia in der humanen Muttermilch	51
Abbildung 8: Western Blot-Analyse von PolySia aus verschiedenen Milchsorten (reife Milch).....	52
Abbildung 9: Western Blot-Analyse von PolySia aus einer bovinen Kolostralprobe. ...	53
Abbildung 10: Western-Blot-Analyse von PolySia in boviner Milch vor und nach Kalbung.....	54
Abbildung 11: Western-Blot-Analyse von PolySia aus Kolostrum von Holstein Friesian, reifer Dextermilch, reifer Holstein Friesian- Milch und reifer Muttermilch.....	55
Abbildung 12: Lokalisation von PolySia in einer Milchdrüsenepithelzelle	56
Abbildung 13: Behandlung einer bovinen Milchdrüse mit und ohne EndoN (ohne Trypsinverdau)	56
Abbildung 14: Behandlung einer bovinen Milchdrüse mit und ohne EndoN (mit Trypsinverdau).....	57
Abbildung 15: St8SialI-Transkripte nach rT-PCR.....	58
Abbildung 16: St8SialV-Transkripte nach rT-PCR.....	59
Abbildung 17: Sequenzierung der cDNA auf ST8SialI.....	60
Abbildung 18: Sequenzierung von cDNA auf ST8SialV.....	61
Abbildung 19: Übersichtsbild des Drüsengewebes der Kuh.....	62
Abbildung 20: Nachweis von PolySia in Milchdrüsenepithelzellen, zu verschiedenen Zeitpunkten und nach Infektion mit <i>S. aureus</i> oder <i>E. coli</i>	63
Abbildung 21: Expression von <i>st8sialI</i> und <i>st8sialV</i> in Eutergewebe, nach experimenteller Infektion mit <i>E. coli</i>	64
Abbildung 22: Polysialyliertes NCAM.....	68

10.Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Herstellung von Sammel und Trenngel	37
Tabelle 2: Proben	46
Tabelle 3: Ergebnisse von Nanodropmessung.	47
Tabelle 4: Primersequenzen.	50

11. Abkürzungsverzeichnis

SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
mAK	monoklonaler Antikörper
PolySia	Polysialinsäure
EndoN	Endoneuraminidase N
Tween	Polyoxyethylen-sorbitan-monolaurat
NCAM	Neural cell adhesion molecule
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
St8SialII	ST8 alpha-N-acetyl-neuraminide alpha-2,8-sialyltransferase 2
St8SialIV	ST8 alpha-N-acetyl-neuraminide alpha-2,8-sialyltransferase 4
PMN	Polymorphkernige Neutrophile
APS	Ammoniumpersulfat
DTT	Dithiothreitol
HRP	horseradish-peroxidase
PBS	Phosphat buffered saline
BSA	Bovine serum albumine
TFA	Trifluoressigsäure
PVDF	Polyvinylidenflourid
TEMED	N,N,N`N` - Tetramethylethylendiamin
Neu5Ac	N-Acetylneuraminsäure
PAMP	pathogen-associated molecular patterns
PMN:	polymorphkernige Neutrophile
LPS	Lipopolysaccharid
NET	neutrophil extracellular trap
rT-PCR	real-time polymerase chain reaction
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylokokkus aureus</i>
dH ₂ O	einfach destilliertes Wasser
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
h	Stunde
min	Minute
s	Sekunde

kDa	Kilodalton
bp	Basenpaare
MS	Massenspektrometrie
TiHo	Tierärztliche Hochschule
CFU	Colony Forming Unit
NaCl	Natriumchlorid

12.Literaturverzeichnis

- Al-Saraireh, Yousef M. J.; Sutherland, Mark; Springett, Bradley R.; Freiburger, Friedrich; Morais, Goreti Ribeiro; Loadman, Paul M. et al. (2013): Pharmacological Inhibition of polysialyltransferase ST8Siall Modulates Tumour Cell Migration. In: *PLOS ONE* 8 (8), e73366. DOI: 10.1371/journal.pone.0073366.
- Amir, Lisa H. (2014): ABM clinical protocol #4: Mastitis, revised March 2014. In: *Breastfeeding medicine : the official journal of the Academy of Breastfeeding Medicine* 9 (5), S. 239–243. DOI: 10.1089/bfm.2014.9984.
- Angata, K.; Long, J. M.; Bukalo, O.; Lee, W.; Dityatev, A.; Wynshaw-Boris, A. et al. (2004): Sialyltransferase ST8Sia-II assembles a subset of polysialic acid that directs hippocampal axonal targeting and promotes fear behavior. In: *The Journal of biological chemistry* 279 (31), S. 32603–32613. DOI: 10.1074/jbc.M403429200.
- Angata, T.; Varki, A. (2002): Chemical diversity in the sialic acids and related alpha-keto acids. An evolutionary perspective. In: *Chemical reviews* 102 (2), S. 439–469.
- Arbeitsgemeinschaft Süddeutscher Rinderzucht- und Besamungsorganisationen e.V. Online verfügbar unter <https://www.asr-rind.de/rinderrassen/deutsches-fleckvieh.html>, zuletzt geprüft am 05.12.2019.
- Bagwe, Siddhi; Tharappel, Leo J.P.; Kaur, Ginpreet; Buttar, Harpal S. (2015): Bovine colostrum. An emerging nutraceutical. In: *Journal of Complementary and Integrative Medicine* 12 (3), S. 175–185. DOI: 10.1515/jcim-2014-0039.
- Balasubramaniam, S.; Press, C. M.; Mitropoulos, K. A.; Magide, A. A.; Myant, N. B. (1976): Effect of portacaval anastomosis on the activities of hepatic enzymes related to cholesterol and bile acid metabolism in rats. In: *Biochimica et biophysica acta* 441 (2), S. 308–315.
- Boakes, Eve; Woods, Amy; Johnson, Natalie; Kadoglou, Naim (2018): Breast Infection: A Review of Diagnosis and Management Practices. In: *European journal of breast health* 14 (3), S. 136–143. DOI: 10.5152/ejbh.2018.3871.
- Branger, J.; Knapp, S.; Weijer, S.; Leemans, J. C.; Pater, J. M.; Speelman, P. et al. (2004): Role of Toll-Like Receptor 4 in Gram-Positive and Gram-Negative

- Pneumonia in Mice. In: *Infection and Immunity* 72 (2), S. 788–794. DOI: 10.1128/IAI.72.2.788-794.2004.
- Brinkmann, Volker (2018): Neutrophil Extracellular Traps in the Second Decade. In: *Journal of innate immunity* 10 (5-6), S. 414–421. DOI: 10.1159/000489829.
- Brooks, Susan A. (2006): Protein glycosylation in diverse cell systems: implications for modification and analysis of recombinant proteins. In: *Expert Review of Proteomics* 3 (3), S. 345–359. DOI: 10.1586/14789450.3.3.345.
- Brouillette, Eric; Malouin, François (2005): The pathogenesis and control of *Staphylococcus aureus*-induced mastitis. Study models in the mouse. In: *Microbes and Infection* 7 (3), S. 560–568. DOI: 10.1016/j.micinf.2004.11.008.
- Brown, Lisa; Wolf, Julie M.; Prados-Rosales, Rafael; Casadevall, Arturo (2015): Through the wall. Extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. In: *Nature Reviews Microbiology* 13 (10), S. 620–630. DOI: 10.1038/nrmicro3480.
- Bull, C.; Boltje, T. J.; van Dinther, E. A.; Peters, T.; de Am Graaf; Leusen, J. H. et al. (2015): Targeted delivery of a sialic acid-blocking glycomimetic to cancer cells inhibits metastatic spread. In: *ACS nano* 9 (1), S. 733–745. DOI: 10.1021/nn5061964.
- Bundesrasseverband Deutscher Dexter-Züchter und -Halter e.V. Online verfügbar unter <http://dexter-bddz.de/>, zuletzt geprüft am 05.12.2019.
- Burvenich, C.; Bannerman, D. D.; Lippolis, J. D.; Peelman, L.; Nonnecke, B. J.; Kehrl, M. E.; Paape, M. J. (2007): Cumulative physiological events influence the inflammatory response of the bovine udder to *Escherichia coli* infections during the transition period. In: *Journal of Dairy Science* 90 Suppl 1, E39-54. DOI: 10.3168/jds.2006-696.
- Burvenich, C.; van Merris, V.; Mehrzad, J.; Diez-Fraile, A.; Duchateau, L. (2003): Severity of *E. coli* mastitis is mainly determined by cow factors. In: *Veterinary research* 34 (5), S. 521–564. DOI: 10.1051/vetres:2003023.
- Buschiazzo, A.; Alzari, P. M. (2008): Structural insights into sialic acid enzymology. In: *Current opinion in chemical biology* 12 (5), S. 565–572. DOI: 10.1016/j.cbpa.2008.06.017.
- C. S. Petersson-Wolfe, I. K. Mullarky, G. M. Jones (2010): *Staphylococcus aureus* Mastitis: Cause, Detection, and Control. In: *Virginia Cooperative Extension*.

- Campbell RJ, Bogoch S, Scolaro MJ & Belval PC (1967): Cerebrospinal fluid glycoproteins in schizophrenia. *Am. J. Psychiatry* 123, 952–962.
- Capuco, A. V.; Bright, S. A.; Pankey, J. W.; Wood, D. L.; Miller, R. H.; Bitman, J. (1992): Increased Susceptibility to Intramammary Infection Following Removal of Teat Canal Keratin. In: *Journal of Dairy Science* 75 (8), S. 2126–2130. DOI: 10.3168/jds.s0022-0302(92)77972-7.
- Carlson SE & House SG (1986): Oral and intraperitoneal administration of N-acetylneuraminic acid: effect on rat cerebral and cerebellar N-acetylneuraminic acid. *J. Nutr.* 116, 881–886.
- Christina S. Petersson-Wolfe, John Currin (2012): *Streptococcus uberis*: A Practical Summary for Controlling Mastitis. In: *Virginia Cooperative Extension*.
- Close, B. E.; Wilkinson, J. M.; Bohrer, T. J.; Goodwin, C. P.; Broom, L. J.; Colley, K. J. (2001): The polysialyltransferase ST8Sia II/STX: posttranslational processing and role of autopolsialylation in the polysialylation of neural cell adhesion molecule. In: *Glycobiology* 11 (11), S. 997–1008.
- Cohen, Miriam; Varki, Ajit (2010): The sialome—far more than the sum of its parts. In: *OmicS : a journal of integrative biology* 14 (4), S. 455–464. DOI: 10.1089/omi.2009.0148.
- Craven, N.; Williams, M. R. (1985): Defences of the bovine mammary gland against infection and prospects for their enhancement. In: *Veterinary Immunology and Immunopathology* 10 (1), S. 71–127. DOI: 10.1016/0165-2427(85)90039-x.
- Crocker, P. R.; Paulson, J. C.; Varki, A. (2007): Siglecs and their roles in the immune system. In: *Nature reviews. Immunology* 7 (4), S. 255–266. DOI: 10.1038/nri2056.
- Crook MA, Pickup JC, Lumb PJ & Georgino F (2001): Relationship between plasma sialic acid concentration and microvascular and macrovascular complications in type 1 diabetes. *Diabetes Care* 24, 316–322.
- De GRAVES, F. J. & FETROW, J. (1993) Economics of mastitis and mastitis control. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice* 9,421-434
- Delcour, A. H. (2009): Outer Membrane Permeability and Antibiotic Resistance. In: *Biochimica et biophysica acta* 1794 (5), S. 808–816. DOI: 10.1016/j.bbapap.2008.11.005.

- Delgado, S.; Garcia, P.; Fernandez, L.; Jimenez, E.; Rodriguez-Banos, M.; del Campo R.; Rodriguez, J. M. (2011): Characterization of *Staphylococcus aureus* strains involved in human and bovine mastitis. In: *FEMS immunology and medical microbiology* 62 (2), S. 225–235. DOI: 10.1111/j.1574-695X.2011.00806.x.
- DeNise, R. S.; Ray, D. E.; Am Lane; Rundle, V. L.; Torabi, M. (1987): Relationships among udder shape, udder capacity, cow longevity and calf weights. In: *Journal of animal science* 65 (2), S. 366–372.
- Dexter Verband Deutschland e.V. Online verfügbar unter <https://www.dexter-verband-deutschland.de/index.html>, zuletzt geprüft am 05.12.2019.
- Dixon, J. Michael; Khan, Lucy R. (2011): Treatment of breast infection. In: *BMJ (Clinical research ed.)* 342, d396. DOI: 10.1136/bmj.d396.
- Eckersall, P. D.; Young, F. J.; McComb, C.; Hogarth, C. J.; Safi, S.; Fitzpatrick, J. L. et al. (2001): Acute phase proteins in serum and milk from dairy cows with clinical mastitis. In: *Veterinary Record* 148 (2), S. 35–41. DOI: 10.1136/vr.148.2.35.
- Falconer, R. A.; Errington, R. J.; Shnyder, S. D.; Smith, P. J.; Patterson, L. H. (2012): Polysialyltransferase: a new target in metastatic cancer. In: *Current cancer drug targets* 12 (8), S. 925–939. DOI: 10.2174/156800912803251225.
- Ferrero, M. A.; Aparicio, L. R. (2010): Biosynthesis and production of polysialic acids in bacteria. In: *Applied microbiology and biotechnology* 86 (6), S. 1621–1635. DOI: 10.1007/s00253-010-2531-5.
- Fox, Larry K.; Bayles, Kenneth W.; Bohach, Gregory A. (2001): *Staphylococcus aureus* Mastitis. In: Allen Honeyman, Herman Friedman und Mauro Bendinelli (Hg.): *Staphylococcus aureus* infection and disease. New York: Kluwer Academic (Infectious agents and pathogenesis), S. 271–294.
- Galuska, S. P.; Oltmann-Norden, I.; Geyer, H.; Weinhold, B.; Kuchelmeister, K.; Hildebrandt, H. et al. (2006): Polysialic acid profiles of mice expressing variant allelic combinations of the polysialyltransferases ST8SialII and ST8SialIV. In: *The Journal of biological chemistry* 281 (42), S. 31605–31615. DOI: 10.1074/jbc.M606516200.
- Galuska, S. P.; Rollenhagen, M.; Kaup, M.; Eggers, K.; Oltmann-Norden, I.; Schiff, M. et al. (2010): Synaptic cell adhesion molecule SynCAM 1 is a target for polysialylation in postnatal mouse brain. In: *Proceedings of the National*

- Academy of Sciences of the United States of America* 107 (22), S. 10250–10255. DOI: 10.1073/pnas.0912103107
- Galuska, C. E.; Lütteke, T.; Galuska, S. P. (2017): Is Polysialylated NCAM Not Only a Regulator during Brain Development But also during the Formation of Other Organs? In: *Biology* 6(2):27. DOI: 10.3390/biology6020027
- Gill, J. J.; Pacan, J. C.; Carson, M. E.; Leslie, K. E.; Griffiths, M. W.; Sabour, P. M. (2006): Efficacy and Pharmacokinetics of Bacteriophage Therapy in Treatment of Subclinical *Staphylococcus aureus* Mastitis in Lactating Dairy Cattle†. In: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50 (9), S. 2912–2918. DOI: 10.1128/AAC.01630-05.
- Gong, L.; Zhou, X.; Yang, J.; Jiang, Y.; Yang, H. (2017): Effects of the regulation of polysialyltransferase ST8Siall on the invasiveness and metastasis of small cell lung cancer cells. In: *Oncology reports* 37 (1), S. 131–138. DOI: 10.3892/or.2016.5279.
- Goudswaard, J.; Bakker-de Koff, E. C.; van Ravenswaaij-Kraan, H. P. (1978): Lysozyme and its presence in bovine milk and serum. In: *Tijdschrift voor diergeneeskunde* 103 (8), S. 445–450.
- Hallemeesch, Marcella M.; Janssen, Ben J. A.; Jonge, Wouter J. de; Soeters, Peter B.; Lamers, Wouter H.; Deutz, Nicolaas E. P. (2003): NO production by cNOS and iNOS reflects blood pressure changes in LPS-challenged mice. In: *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* 285 (4), E871-E875. DOI: 10.1152/ajpendo.00004.2002.
- Harduin-Lepers, Anne; Vallejo-Ruiz, Veronica; Krzewinski-Recchi, Marie-Ange; Samyn-Petit, Bénédicte; Julien, Sylvain; Delannoy, Philippe (2001): The human sialyltransferase family. In: *Biochimie* 83 (8), S. 727–737. DOI: 10.1016/S0300-9084(01)01301-3.
- Harduin-Lepers, Anne; Krzewinski-Recchi, Marie-Ange; Colomb, Florent; Foulquier, Francois; Groux-Degroote, Sophie; Delannoy, Philippe (2012): Sialyltransferases functions in cancers. In: *Frontiers in bioscience (Elite edition)* 4, S. 499–515. DOI: 10.2741/396.
- Haselhorst, Thomas; Stummeyer, Katharina; Mühlenhoff, Martina; Schaper, Wiebke; Gerardy-Schahn, Rita; Itzstein, Mark von (2006): Endosialidase NF appears to bind polySia DP5 in a helical conformation. In: *Chembiochem : a European*

- journal of chemical biology 7 (12), S. 1875–1877. DOI: 10.1002/cbic.200600252.
- Hildebrandt, H.; Becker, C.; Müräu, M.; Gerardy-Schahn, R.; Rahmann, H. (1998): Heterogeneous expression of the polysialyltransferases ST8Sia II and ST8Sia IV during postnatal rat brain development. In: *Journal of neurochemistry* 71 (6), S. 2339–2348. DOI: 10.1046/j.1471-4159.1998.71062339.x.
- Hildebrandt, Herbert; Muhlenhoff, Martina; Weinhold, Birgit; Gerardy-Schahn, Rita (2007): Dissecting polysialic acid and NCAM functions in brain development. In: *Journal of neurochemistry* 103 Suppl 1, S. 56–64. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2007.04716.x.
- Honeyman, Allen; Friedman, Herman; Bendinelli, Mauro (Hg.) (2001): *Staphylococcus aureus infection and disease*. MyiLibrary. New York: Kluwer Academic (Infectious agents and pathogenesis).
- Hutchins, Jeff T.; Reading, Christopher L. (1988): Characterization of mono-, di-, and tri-O-acetylated sialic acids on human cells. In: *Journal of Cellular Biochemistry* 37 (1), S. 37–48. DOI: 10.1002/jcb.240370105.
- Jäckh, Rudolf (1976): Chemie und Biologie der Sialinsäuren. In: *Chemie in unserer Zeit* 10 (5), S. 139–146. DOI: 10.1002/ciuz.19760100503.
- Kean, Edward L. (1991): Sialic acid activation. In: *Glycobiology* 1 (5), S. 441–447. DOI: 10.1093/glycob/1.5.441.
- Kiermaier, E.; Moussion, C.; Veldkamp, C. T.; Gerardy-Schahn, R.; Vries, I. de; Williams, L. G. et al. (2016): Polysialylation controls dendritic cell trafficking by regulating chemokine recognition. In: *Science (New York, N.Y.)* 351 (6269), S. 186–190. DOI: 10.1126/science.aad0512.
- Kitchen, Barry J. (1981): Bovine mastitis. Milk compositional changes and related diagnostic tests. In: *Journal of Dairy Research* 48 (1), S. 167–188. DOI: 10.1017/S0022029900021580.
- Knight CH & Peaker M 1984 Mammary development and regression during lactation in goats in relation to milk secretion. *Quarterly Journal of Experimental Physiology* 69 331–338
- Krocher, T.; Malinovskaja, K.; Jurgenson, M.; Aonurm-Helm, A.; Zharkovskaya, T.; Kalda, A. et al. (2015): Schizophrenia-like phenotype of polysialyltransferase

- ST8SIA2-deficient mice. In: *Brain structure & function* 220 (1), S. 71–83. DOI: 10.1007/s00429-013-0638-z.
- Kühnle, Andrea; Galuska, Christina E.; Zlatina, Kristina; Galuska, Sebastian P. (2019a): The Bovine Antimicrobial Peptide Lactoferricin Interacts with Polysialic Acid without Loss of Its Antimicrobial Activity against *Escherichia coli*. In: *Animals : an open access journal from MDPI* 10 (1). DOI: 10.3390/ani10010001.
- Kühnle, Andrea; Lütteke, Thomas; Bornhöfft, Kim F.; Galuska, Sebastian P. (2019b): Polysialic Acid Modulates the Binding of External Lactoferrin in Neutrophil Extracellular Traps. In: *Biology* 8 (2). DOI: 10.3390/biology8020020.
- Kühnle A., Veelken R., Galuska C.E., Saftenberger M., Verleih M., Schuppe H.C., Rudloff S., Kunz C., Galuska S.P.(2019c) Polysialic acid interacts with lactoferrin and supports its activity to inhibit the release of neutrophil extracellular traps. *Carbohydr.Polym.* 2019;208:32–41. doi: 10.1016/j.carbpol.2018.12.033.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227(5259): 680-5.
- Leigh, J. A. (1999): *Streptococcus uberis*. A permanent barrier to the control of bovine mastitis? In: *Veterinary journal (London, England : 1997)* 157 (3), S. 225–238. DOI: 10.1053/tvj.1998.0298.
- Leon, Lisa R.; Kozak, Wieslaw; Rudolph, Karin; Kluger, Matthew J. (1999): An antipyretic role for interleukin-10 in LPS fever in mice. In: *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 276 (1), R81-R89. Online verfügbar unter <http://ajpregu.physiology.org/content/ajpregu/276/1/R81.full.pdf>.
- Lérias, Joana R.; Hernández-Castellano, Lorenzo E.; Suárez-Trujillo, Aridany; Castro, Noemí; Pourlis, Aris; Almeida, André M. (2014): The mammary gland in small ruminants. Major morphological and functional events underlying milk production – a review. In: *Journal of Dairy Research* 81 (3), S. 304–318. DOI: 10.1017/S0022029914000235.
- Li, Jie; Xu, Xiaotian; Cai, Xiaoying; Weng, Yinlun; Wang, Yiping; Shen, Qingyu; Shi, Xiaolei (2019): Milk Fat Globule-Epidermal Growth Factor-Factor 8 Reverses Lipopolysaccharide-Induced Microglial Oxidative Stress. In: *Oxidative medicine and cellular longevity* 2019, S. 2601394. DOI: 10.1155/2019/2601394.

- Li, Xiaojuan; Li, Lian; Sun, Yu; Wu, Jie; Wang, Genlin (2016): Comparison of the effect of recombinant bovine wild and mutant lipopolysaccharide-binding protein in lipopolysaccharide-challenged bovine mammary epithelial cells. In: *Cell Stress & Chaperones* 21 (3), S. 439–452. DOI: 10.1007/s12192-016-0671-y.
- Li, Y.; Chen, X. (2012): Sialic acid metabolism and sialyltransferases. Natural functions and applications. In: *Applied microbiology and biotechnology* 94 (4), S. 887–905. DOI: 10.1007/s00253-012-4040-1.
- Marín, María; Arroyo, Rebeca; Espinosa-Martos, Irene; Fernández, Leónides; Rodríguez, Juan M. (2017): Identification of Emerging Human Mastitis Pathogens by MALDI-TOF and Assessment of Their Antibiotic Resistance Patterns. In: *Frontiers in microbiology* 8, S. 1258. DOI: 10.3389/fmicb.2017.01258.
- McManaman, James L.; Neville, Margaret C. (2003): Mammary physiology and milk secretion. In: *Advanced Drug Delivery Reviews* 55 (5), S. 629–641. DOI: 10.1016/S0169-409X(03)00033-4.
- McVeagh P & Miller JB (1997): Human milk oligosaccharides: only the breast. *J. Paediatr. Child. Health* 33, 281–286.
- Milewich, L.; Gant, N. F.; Schwarz, B. E.; Prough, R. A.; Chen, G. T.; Athey, B.; Macdonald, P. C. (1977): Initiation of human parturition. VI. Identification and quantification of progesterone metabolites produced by the components of human fetal membranes. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 45 (3), S. 400–411. DOI: 10.1210/jcem-45-3-400.
- Morgan BL & Winick M (1980a): Effects of administration of N– acetylneuraminic acid (NANA) on brain NANA content and behavior. *J. Nutr.* 110, 416–424.
- Mortensen EL, Michaelsen KF, Sanders SA & Reinisch JM (2002): The association between duration of breastfeeding and adult intelligence. *JAMA* 287(18), 2365–2371.
- Nagae, Masamichi; Ikeda, Akemi; Hane, Masaya; Hanashima, Shinya; Kitajima, Ken; Sato, Chihiro; Yamaguchi, Yoshiki (2013): Crystal structure of anti-polysialic acid antibody single chain Fv fragment complexed with octasialic acid: insight into the binding preference for polysialic acid. In: *The Journal of biological chemistry* 288 (47), S. 33784–33796. DOI: 10.1074/jbc.M113.496224.

- Nakata, Daisuke; Zhang, Lirong; Troy, Frederic A. (2006): Molecular basis for polysialylation: a novel polybasic polysialyltransferase domain (PSTD) of 32 amino acids unique to the alpha 2,8-polysialyltransferases is essential for polysialylation. In: *Glycoconjugate journal* 23 (5-6), S. 423–436. DOI: 10.1007/s10719-006-6356-5.
- Nakayama, J.; Fukuda, M. N.; Fredette, B.; Ranscht, B.; Fukuda, M. (1995): Expression cloning of a human polysialyltransferase that forms the polysialylated neural cell adhesion molecule present in embryonic brain. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (15), S. 7031–7035.
- Nickel R, Schummer A & Seiferle E 1981 *The Anatomy of the Domestic Animals*. Berlin, Germany: Verlag Paul Parey
- Ogola, H.; Shitandi, A.; Nanua, J. (2007): Effect of mastitis on raw milk compositional quality. In: *Journal of veterinary science* 8 (3), S. 237–242.
- Ohtsubo, K.; Marth, J. D. (2006): Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. In: *Cell* 126 (5), S. 855–867. DOI: 10.1016/j.cell.2006.08.019.
- Okubo, Koshu; Kamiya, Mako; Urano, Yasuteru; Nishi, Hiroshi; Herter, Jan M.; Mayadas, Tanya et al. (2016): Lactoferrin Suppresses Neutrophil Extracellular Traps Release in Inflammation. In: *EBioMedicine* 10, S. 204–215. DOI: 10.1016/j.ebiom.2016.07.012.
- Oltmann-Norden, Imke; Galuska, Sebastian P.; Hildebrandt, Herbert; Geyer, Rudolf; Gerardy-Schahn, Rita; Geyer, Hildegard; Mühlenhoff, Martina (2008): Impact of the Polysialyltransferases ST8SialII and ST8SialIV on Polysialic Acid Synthesis during Postnatal Mouse Brain Development. In: *J. Biol. Chem.* 283 (3), S. 1463–1471. DOI: 10.1074/jbc.M708463200.
- Osorio, Johan S.; Lohakare, Jayant; Bionaz, Massimo (2016): Biosynthesis of milk fat, protein, and lactose. Roles of transcriptional and posttranscriptional regulation. In: *Physiological Genomics* 48 (4), S. 231–256. DOI: 10.1152/physiolgenomics.00016.2015.
- Owen, C. A.; Campbell, E. J. (1999): The cell biology of leukocyte-mediated proteolysis. In: *Journal of leukocyte biology* 65 (2), S. 137–150. DOI: 10.1002/jlb.65.2.137.

- Paulrud, C. O. (2005): Basic concepts of the bovine teat canal. In: *Veterinary research communications* 29 (3), S. 215–245. DOI: 10.1023/b:verc.0000047496.47571.41.
- Pedersen, L. H.; Aalbaek, B.; Rontved, C. M.; Ingvartsen, K. L.; Sorensen, N. S.; Heegaard, P. M.; Jensen, H. E. (2003): Early pathogenesis and inflammatory response in experimental bovine mastitis due to *Streptococcus uberis*. In: *Journal of comparative pathology* 128 (2-3), S. 156–164.
- Petersson-Wolfe, C. S., I. K. Mullarky, and G. M. Jones. 2010. *Staphylococcus aureus* mastitis: Cause, detection, and control. Virginia Cooperative Extension:1–7. Accessed Jul. 18, 2017.
- Petersson-Wolfe CS, Currin J (2012) *Streptococcus uberis*—a practical summary for controlling mastitis.
- Petzl, Wolfram; Zerbe, Holm; Günther, Juliane; Yang, Wei; Seyfert, Hans-Martin; Nürnberg, Gerd; Schuberth, Hans-Joachim (2008): *Escherichia coli*, but not *Staphylococcus aureus* triggers an early increased expression of factors contributing to the innate immune defense in the udder of the cow. In: *Veterinary research* 39 (2), S. 18. DOI: 10.1051/vetres:2007057.
- Prashanth, K.; Rao, K. R.; Reddy, P. V.; Saranathan, R.; Makki, A. R. (2011): Genotypic Characterization of *Staphylococcus aureus* Obtained from Humans and Bovine Mastitis Samples in India. In: *Journal of Global Infectious Diseases* 3 (2), S. 115–122. DOI: 10.4103/0974-777X.81686.
- Puppel, Kamila; Gołębiewski, Marcin; Grodkowski, Grzegorz; Slószarz, Jan; Kunowska-Slószarz, Małgorzata; Solarczyk, Paweł et al. (2019): Composition and Factors Affecting Quality of Bovine Colostrum: A Review. In: *Animals : an open access journal from MDPI* 9 (12). DOI: 10.3390/ani9121070.
- Pyörälä, S. (2008): Mastitis in Post-Partum Dairy Cows. In: *Reproduction in Domestic Animals* 43 (s2), S. 252–259. DOI: 10.1111/j.1439-0531.2008.01170.
- Quartu, Marina; Serra, Maria Pina; Boi, Marianna; Ibba, Viviana; Melis, Tiziana; Fiacco, Marina Del (2008): Polysialylated-neural cell adhesion molecule (PSA-NCAM) in the human trigeminal ganglion and brainstem at prenatal and adult ages. In: *BMC Neuroscience* 9 (1), S. 108. DOI: 10.1186/1471-2202-9-108.

- Raetz, C. R.H.; Whitfield, C. (2002): Lipopolysaccharide Endotoxins. In: *Annual review of biochemistry* 71, S. 635–700. DOI: 10.1146/annurev.biochem.71.110601.135414.
- Rainard, Pascal; Riollet, Céline (2006): Innate immunity of the bovine mammary gland. In: *Veterinary research* 37 (3), S. 369–400. DOI: 10.1051/vetres:2006007.
- Reichardt, H. M.; Horsch, K.; Grone, H. J.; Kolbus, A.; Beug, H.; Hynes, N.; Schutz, G. (2001): Mammary gland development and lactation are controlled by different glucocorticoid receptor activities. In: *European journal of endocrinology* 145 (4), S. 519–527.
- Rollenhagen, Manuela; Buettner, Falk F. R.; Reismann, Marc; Jirmo, Adan Chari; Grove, Melanie; Behrens, Georg M. N. et al. (2013): Polysialic acid on neuropilin-2 is exclusively synthesized by the polysialyltransferase ST8SialV and attached to mucin-type o-glycans located between the b2 and c domain. In: *The Journal of biological chemistry* 288 (32), S. 22880–22892. DOI: 10.1074/jbc.M113.463927.
- Rosenberg A (1995): *Biology of the Sialic Acids*. New York: Plenum Press.
- Royster, E.; Wagner, S. (2015): Treatment of mastitis in cattle. In: *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice* 31 (1), 17-46, v. DOI: 10.1016/j.cvfa.2014.11.010.
- Rutishauser U, Watanabe M, Silver J, Troy FA, Vimr ER. Specific alteration of NCAM-mediated cell adhesion by an endoneuraminidase. *J Cell Biol.* 1985;101:1842–1849.
- Rutishauser, Urs (2008): Polysialic acid in the plasticity of the developing and adult vertebrate nervous system. In: *Nature reviews. Neuroscience* 9 (1), S. 26–35. DOI: 10.1038/nrn2285.
- Saffarzadeh, Mona; Juenemann, Christiane; Queisser, Markus A.; Lochnit, Guenter; Barreto, Guillermo; Galuska, Sebastian P. et al. (2012): Neutrophil extracellular traps directly induce epithelial and endothelial cell death: a predominant role of histones. In: *PloS one* 7 (2), e32366. DOI: 10.1371/journal.pone.0032366.
- Saffarzadeh, Mona; Preissner, Klaus T. (2013): Fighting against the dark side of neutrophil extracellular traps in disease: manoeuvres for host protection. In: *Current opinion in hematology* 20 (1), S. 3–9. DOI: 10.1097/MOH.0b013e32835a0025.

- Sato, C.; Kitajima, K. (2013): Impact of structural aberrancy of polysialic acid and its synthetic enzyme ST8SIA2 in schizophrenia. In: *Frontiers in Cellular Neuroscience* 7. DOI: 10.3389/fncel.2013.00061.
- Sato, C.; Kitajima, K.; Tazawa, I.; Inoue, Y.; Inoue, S.; Troy, F. 2ndA (1993): Structural diversity in the alpha 2--8-linked polysialic acid chains in salmonid fish egg glycoproteins. Occurrence of poly(Neu5Ac), poly(Neu5Gc), poly(Neu5Ac, Neu5Gc), poly(KDN), and their partially acetylated forms. In: *The Journal of biological chemistry* 268 (31), S. 23675–23684.
- Schauer, R. (2004): Sialic acids. Fascinating sugars in higher animals and man. In: *Zoology (Jena, Germany)* 107 (1), S. 49–64. DOI: 10.1016/j.zool.2003.10.002.
- Schauer, R. (2009): Sialic acids as regulators of molecular and cellular interactions. In: *Current opinion in structural biology* 19 (5), S. 507–514. DOI: 10.1016/j.sbi.2009.06.003.
- Schauer R & Kamerling JP (1997): Chemistry, biochemistry and biology of sialic acids. In *Glycoproteins II*, ed. H Schachter, J Montreuil & JFG Vliegenthart, Vol. 19B, pp 243–372. Amsterdam, New York:Elsevier.
- Schnaar, Ronald L.; Gerardy-Schahn, Rita; Hildebrandt, Herbert (2014): Sialic acids in the brain: gangliosides and polysialic acid in nervous system development, stability, disease, and regeneration. In: *Physiological reviews* 94 (2), S. 461–518. DOI: 10.1152/physrev.00033.2013.
- Schwarzer, D., K. Stummeyer, T. Haselhorst, F. Freiburger, B. Rode, M. Grove, T. Scheper, M. von Itzstein, M. Muhlenhoff and R. Gerardy-Schahn (2009). "Proteolytic release of the intramolecular chaperone domain confers processivity to endosialidase F." *J Biol Chem* 284(14): 9465-74.
- Schwarzkopf, Martina; Knobloch, Klaus-Peter; Rohde, Elvira; Hinderlich, Stephan; Wiechens, Nicola; Lucka, Lothar et al. (2002): Sialylation is essential for early development in mice. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (8), S. 5267–5270. DOI: 10.1073/pnas.072066199.
- Sears, Philip M.; McCarthy, Kate K. (2003): Management and treatment of staphylococcal mastitis. In: *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 19 (1), S. 171–185. DOI: 10.1016/s0749-0720(02)00079-8.
- Shah NP. Effects of milk-derived bioactives: an overview. *Br J Nutr* 2000;84:3–10.

- Shahraz, Anahita; Kopatz, Jens; Mathy, Rene; Kappler, Joachim; Winter, Dominic; Kapoor, Shoba et al. (2015): Anti-inflammatory activity of low molecular weight polysialic acid on human macrophages. In: *Scientific reports* 5, S. 16800. DOI: 10.1038/srep16800.
- Shariat, S. F.; Semjonow, A.; Lilja, H.; Savage, C.; Vickers, A. J.; Bjartell, A. (2011): Tumor markers in prostate cancer I. Blood-based markers. In: *Acta oncologica (Stockholm, Sweden)* 50 (Suppl 1), S. 61–75. DOI: 10.3109/0284186X.2010.542174.
- Shaw L & Schauer R (1988): The biosynthesis of N-glycolylneuraminic acid occurs by hydroxylation of the CMP-glycoside of N-acetylneuraminic acid. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* 369, 477–486.
- Simon, P.; Baumner, S.; Busch, O.; Rohrich, R.; Kaese, M.; Richterich, P. et al. (2013): Polysialic acid is present in mammalian semen as a post-translational modification of the neural cell adhesion molecule NCAM and the polysialyltransferase ST8Siall. In: *The Journal of biological chemistry* 288 (26), S. 18825–18833. DOI: 10.1074/jbc.M113.451112.
- Sorbi S, Piacentini S & Amaducci L (1987): Intralaminar distribution of neurotransmitter-related enzymes in cerebral cortex of Alzheimer's disease. *Gerontology* 33, 197–202.
- Sordillo, L. M.; Pighetti, G. M.; Davis, M. R. (1995): Enhanced production of bovine tumor necrosis factor- α during the periparturient period. In: *Veterinary Immunology and Immunopathology* 49 (3), S. 263–270. DOI: 10.1016/0165-2427(95)05465-0.
- Sordillo, Lorraine M.; Streicher, Katie L. (2002): Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. In: *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 7 (2), S. 135–146. DOI: 10.1023/a:1020347818725.
- Steenefeld, W.; van Werven, T.; Barkema, H. W.; Hogeveen, H. (2011): Cow-specific treatment of clinical mastitis. An economic approach. In: *Journal of dairy science* 94 (1), S. 174–188. DOI: 10.3168/jds.2010-3367.
- Stelwagen K, Carpenter E, Haigh B, Hodgkinson A, Wheeler TT. Immune components of bovine colostrum and milk. *J Anim Sci* 2009;87:3–9.
- Stummeyer, Katharina; Dickmanns, Achim; Mühlenhoff, Martina; Gerardy-Schahn, Rita; Ficner, Ralf (2005): Crystal structure of the polysialic acid-degrading

- endosialidase of bacteriophage K1F. In: *Nature structural & molecular biology* 12 (1), S. 90–96. DOI: 10.1038/nsmb874.
- Sugano, G.; Bernard-Pierrot, I.; Laé, M.; Battail, C.; Allory, Y.; Stransky, N. et al. (2011): Milk fat globule—epidermal growth factor—factor VIII (MFG8)/lactadherin promotes bladder tumor development. In: *Oncogene* 30 (6), S. 642–653. DOI: 10.1038/onc.2010.446.
- Takeuchi, Osamu; Hoshino, Katsuaki; Kawai, Taro; Sanjo, Hideki; Takada, Haruhiko; Ogawa, Tomohiko et al. (1999): Differential Roles of TLR2 and TLR4 in Recognition of Gram-Negative and Gram-Positive Bacterial Cell Wall Components. In: *Immunity* 11 (4), S. 443–451. DOI: 10.1016/S1074-7613(00)80119-3.
- Takeda, K., T. Kaisho, and S. Akira. 2003. Toll-like receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 21:335-376.
- Tamaki, S.; Sato, T.; Matsushashi, M. (1971): Role of lipopolysaccharides in antibiotic resistance and bacteriophage adsorption of *Escherichia coli* K-12. In: *Journal of bacteriology* 105 (3), S. 968–975.
- Tanaka, F.; Otake, Y.; Nakagawa, T.; Kawano, Y.; Miyahara, R.; Li, M. et al. (2000): Expression of polysialic acid and STX, a human polysialyltransferase, is correlated with tumor progression in non-small cell lung cancer. In: *Cancer research* 60 (11), S. 3072–3080.
- Taniuchi K, Chifu K, Hayashi N, Nakamachi Y, Yamaguchi N, Miyamoto Y et al (1981): A new enzymatic method for the determination of sialic acid in serum and its application for a marker of acute phase reactants. *Kobe J. Med. Sci.* 27, 91–102.
- Teclé, Eillen; Gagneux, Pascal (2015): Sugar-coated sperm: Unraveling the functions of the mammalian sperm glycocalyx. In: *Molecular reproduction and development* 82 (9), S. 635–650. DOI: 10.1002/mrd.22500.
- Teppa, Roxana E.; Petit, Daniel; Plechakova, Olga; Cogez, Virginie; Harduin-Lepers, Anne (2016): 10.1089/omi.2009.0148. In: *International journal of molecular sciences* 17 (8). DOI: 10.3390/ijms17081286.
- Tokuyama H, Tokuyama Y, Migita S. Isolation of two new proteins from bovine colostrum which stimulate epidermal growth factor-dependent colony formation of NRK-49f cells. *Growth Factors* 1990;3:105–14.

- Troy FAI (1995): Sialobiology and the polysialic acid glycotope: occurrence, structure, function, synthesis, and glycopathology. In *Biology of the Sialic Acids*. ed. A Rosenberg, Vol. xv, p 378. New York: Plenum Press
- Troy FA, 2004. Polysialic acid in molecular medicine. *Encyclopedia Biol. Chem.* 3:407-14
- Tsuchiya, A.; Lu, W. Y.; Weinhold, B.; Boulter, L.; Stutchfield, B. M.; Williams, M. J. et al. (2014): Polysialic acid/neural cell adhesion molecule modulates the formation of ductular reactions in liver injury. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 60 (5), S. 1727–1740. DOI: 10.1002/hep.27099.
- Ulm, C.; Saffarzadeh, M.; Mahavadi, P.; Muller, S.; Prem, G.; Saboor, F. et al. (2013): Soluble polysialylated NCAM. A novel player of the innate immune system in the lung. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 70 (19), S. 3695–3708. DOI: 10.1007/s00018-013-1342-0.
- Uruakpa, F.O; Ismond, M.A.H; Akobundu, E.N.T (2002): Colostrum and its benefits: a review. In: *Nutrition Research* 22 (6), S. 755–767. DOI: 10.1016/S0271-5317(02)00373-1.
- Varki, A. (1992): Diversity in the sialic acids. In: *Glycobiology* 2 (1), S. 25–40.
- Varki, A. (1997): Sialic acids as ligands in recognition phenomena. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 11 (4), S. 248–255.
- Varki, Ajit (2007): Glycan-based interactions involving vertebrate sialic-acid-recognizing proteins. In: *Nature* 446 (7139), S. 1023–1029. DOI: 10.1038/nature05816.
- Varki, Ajit; Schauer, Roland (2009): *Sialic Acids*: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Viguié, C.; Arora, S.; Gilmartin, N.; Welbeck, K.; O'Kennedy, R. (2009): Mastitis detection. Current trends and future perspectives. In: *Trends in biotechnology* 27 (8), S. 486–493. DOI: 10.1016/j.tibtech.2009.05.004.
- Von Itzstein M & Thomson RJ (1997): Sialic acids and sialic acidrecognising proteins: drug discovery targets and potential glycopharmaceuticals. *Curr. Med. Chem.* 4, 185–210.
- Wang, B. (2009): Sialic acid is an essential nutrient for brain development and cognition. In: *Annual review of nutrition* 29, S. 177–222. DOI: 10.1146/annurev.nutr.28.061807.155515.

- Wang, B.; Brand-Miller, J. (2003): The role and potential of sialic acid in human nutrition. In: *European journal of clinical nutrition* 57 (11), S. 1351–1369. DOI: 10.1038/sj.ejcn.1601704.
- Wang B, Brand-Miller J, McVeagh P, Petocz P. Concentration and distribution of sialic acid in human milk and infant formulas. *Am J Clin Nutr.* 2001;74(4):510-515. doi:10.1093/ajcn/74.4.510
- Wang, B.; Yu, B.; Karim, M.; Hu, H.; Sun, Y.; McGreevy, P. et al. (2007): Dietary sialic acid supplementation improves learning and memory in piglets. In: *The American journal of clinical nutrition* 85 (2), S. 561–569.
- Warren L (1994): Bound Carbohydrates in Nature. Cambridge; New York, NY, USA: Cambridge University Press.
- Weinhold, Birgit; Seidenfaden, Ralph; Röckle, Iris; Mühlenhoff, Martina; Schertzinger, Frank; Conzelmann, Sidonie et al. (2005): Genetic ablation of polysialic acid causes severe neurodevelopmental defects rescued by deletion of the neural cell adhesion molecule. In: *The Journal of biological chemistry* 280 (52), S. 42971–42977. DOI: 10.1074/jbc.M511097200.
- Weiss, D.; Weinfurtner, M.; Bruckmaier, R. M. (2004): Teat anatomy and its relationship with quarter and udder milk flow characteristics in dairy cows. In: *Journal of dairy science* 87 (10), S. 3280–3289. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(04)73464-5.
- Werneburg, Sebastian; Buettner, Falk F. R.; Erben, Larissa; Mathews, Mona; Neumann, Harald; Mühlenhoff, Martina; Hildebrandt, Herbert (2016): Polysialylation and lipopolysaccharide-induced shedding of E-selectin ligand-1 and neuropilin-2 by microglia and THP-1 macrophages. In: *Glia* 64 (8), S. 1314–1330. DOI: 10.1002/glia.23004.
- Westermeier, R.; Elektrophorese-Praktikum; Weinheim, 1990; VCH;
- Wright, S. D., R. A. Ramos, P. S. Tobias, R. J. Ulevitch, and J. C. Mathison. 1990. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 249:1431-1433.
- Xu, Wei; van Knegsel, Ariette; Saccenti, Edoardo; van Hoeij, Renny; Kemp, Bas; Vervoort, Jacques (2020): Metabolomics of milk reflects a negative energy balance in cows. In: *Journal of proteome research*. DOI: 10.1021/acs.jproteome.9b00706.

- Yabe, U.; Sato, C.; Matsuda, T.; Kitajima, K. (2003): Polysialic acid in human milk. CD36 is a new member of mammalian polysialic acid-containing glycoprotein. In: *The Journal of biological chemistry* 278 (16), S. 13875–13880. DOI: 10.1074/jbc.M300458200.
- Yin, C.; Wong, J.H.; Ng, T.B. Recent studies on the antimicrobial peptides lactoferricin and lactoferrampin. *Curr Mol Med* 2014, 14, 1139-1154.
- Yoshida, Y.; Kojima, N.; Tsuji, S. (1995): Molecular cloning and characterization of a third type of N-glycan alpha 2,8-sialyltransferase from mouse lung. In: *Journal of biochemistry* 118 (3), S. 658–664.
- Zhang, Ye; Lee, Yuan C. (1999): Acid-catalyzed Lactonization of α 2,8-Linked Oligo/Polysialic Acids Studied by High Performance Anion-exchange Chromatography. In: *J. Biol. Chem.* 274 (10), S. 6183–6189. DOI: 10.1074/jbc.274.10.6183.
- Zhao, X.; Lacasse, P. (2008): Mammary tissue damage during bovine mastitis: causes and control. In: *Journal of animal science* 86 (13 Suppl), S. 57–65. DOI: 10.2527/jas.2007-0302.
- Zhao, Yang; Wang, Qian; Zang, Bin (2019): Milk fat globule-epidermal growth factor 8 (MFG-E8) attenuates sepsis-induced acute kidney injury by inhibiting NF- κ B signaling pathway¹. In: *Acta chirurgica brasileira* 34 (2), e201900209. DOI: 10.1590/s0102-8650201900209.
- Zimecki, Michal; Artym, Jolanta (2005): Therapeutic properties of proteins and peptides from colostrum and milk. In: *Postepy higieny i medycyny doswiadczalnej (Online)* 59, S. 309–323.
- Zlatina, Kristina; Galuska, Sebastian P. (2019): Polysialic Acid Modulates Only the Antimicrobial Properties of Distinct Histones. In: *ACS Omega* 4 (1), S. 1601–1610. DOI: 10.1021/acsomega.8b02222.
- Zlatina, Kristina; Lütkeke, Thomas; Galuska, Sebastian P. (2017): Individual Impact of Distinct Polysialic Acid Chain Lengths on the Cytotoxicity of Histone H1, H2A, H2B, H3 and H4. In: *Polymers* 9 (12). DOI: 10.3390/polym9120720.
- Zlatina, Kristina; Saftenberger, Max; Kühnle, Andrea; Galuska, Christina E.; Gärtner, Ulrich; Rebl, Alexander et al. (2018): Polysialic Acid in Human Plasma Can Compensate the Cytotoxicity of Histones. In: *International journal of molecular sciences* 19 (6). DOI: 10.3390/ijms19061679.

13. Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, Julia Hinterseher, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift (Julia Hinterseher)

14.Danksagung

Hiermit möchte ich allen Personen danken, die direkt oder indirekt an meiner Doktorarbeit beteiligt gewesen sind.

Zuerst möchte ich meinem Doktorvater PD Dr. Sebastian Galuska dafür danken, dass er mir stets mit guten Ratschlägen zur Seite stand, zu jeder Zeit ansprechbar war und mir bei jedem aufkommenden Problem geholfen hat. Besser hätte ich es mir nicht wünschen können!

Weiterhin möchte ich allen Kollegen aus "meiner" Arbeitsgruppe vom FBN in Dummerstorf (Rostock) danken. Hier vorallem Gesine Krüger, die sehr dazu beigetragen hat, dass die Versuche gut funktioniert haben und dafür, dass sie immer bei jedem Problem ansprechbar war. Auch danke ich ganz besonders Juliane Günther, aber auch allen Anderen aus dem Bereich der "Reproduktionsbiochemie".

Ganz besonders möchte ich mich bei Jan Philipp Huisl, Dr. Wolfgang Huisl und Dr. Heinke Huisl bedanken, die mit vielen guten Ratschlägen und Korrekturlesungen der Dissertation ebenfalls viel Zeit geopfert haben.

Als Letztes möchte ich noch meinen Eltern Dr. Walter Hinterseher und Marie-Luise Hinterseher dafür danken, dass sie mich während des ganzen Studiums und natürlich besonders während der Doktorarbeit so gut unterstützt haben. Ich könnte mir keine besseren Eltern vorstellen!!