



**Charakterisierung der Interaktion von Lactoferrin mit
Polysialinsäure im Zusammenspiel mit neutrophilen
extrazellulären Fallen**

Kumulativdissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Humanbiologie des
Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Andrea Kühnle geb. Tenk
aus Stadtlohn

Gießen 2020

Aus dem Fachbereich der Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Fachbereichsleiter Prof. Dr. Lienhard Schmitz

Aus der Nachwuchsgruppe für Glykobiologie
in der Abteilung für Reproduktionsbiochemie
des Leibniz Institut für Nutztierbiologie
in Dummerstorf

Gutachter: PD Dr. Sebastian P. Galuska

Gutachter: Prof. Dr. Andre Menke

Tag der Disputation:

08. September 2021

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis	3
1. Einleitung	5
1.1 Lactoferrin.....	5
1.1.1 Geschichtliche Einordnung	5
1.1.2 Struktur und Aufbau.....	6
1.1.3 Vorkommen.....	9
1.1.4 Funktionen von Lactoferrin im Überblick.....	9
1.1.5 Lactoferricin.....	13
1.2 Polysialinsäure.....	14
1.2.1 Ein Überblick	14
1.2.2 Struktur und Aufbau.....	15
1.2.3 Vorkommen.....	18
1.2.4 Eigenschaften und Funktionen	19
1.3 Neutrophile Granulozyten und neutrophile extrazelluläre Fallen.....	23
1.3.1 Neutrophile Granulozyten	23
1.3.2 Neutrophile extrazelluläre Fallen	26
1.4 Basis und Überschneidungspunkte von Lactoferrin, PolySia und NET	29
1.4.1 Lactoferrin und NET	29
1.4.2 PolySia, NET und Histone	30
1.4.3 Lactoferrin und PolySia	30
1.5 Zielsetzung	32
2. Übersicht der Publikationen.....	33
2.1 Zusammenfassung der ersten Publikation	33
2.2 Zusammenfassung der zweiten Publikation	35
2.3 Zusammenfassung der dritten Publikation	36
3. Manuskripte.....	37
4. Diskussion.....	72
4.1 In dieser Arbeit.....	72

4.1.1 Interaktion von Lactoferrin bzw. Lactoferricin und PolySia	72
4.1.2 Zusammenspiel von Lactoferrin und PolySia mit NET	77
4.1.3 Einfluss der Bindung von PolySia zu Lactoferricin	81
4.1.4 Ausblick über mögliche Zusammenspiele dreier multifunktionale Komponenten.....	82
5. Zusammenfassung.....	85
6. Summary.....	86
7. Referenzen.....	87
Liste an Publikationen.....	114
Erklärung zur Dissertation	115
Danksagung	116

Abkürzungsverzeichnis

Lactoferrin	auch Lactotransferrin
AMP	antimikrobielles Peptid
BDNF	Wachstumsfaktor (engl. Brain-derived neurotrophic factor)
CCL21	Chemokin 21 der C-C Motiv Chemokinfamilie (engl. CC-chemokine ligand 21)
CCR7	C-C-Chemokinrezeptor Typ 7 (engl. Central chemokine receptor 7)
CD	Oberflächenantigen (engl. cluster of differentiation)
CD36	Thrombozytenglykoprotein 4 (engl. Platelet glycoprotein 4)
COPD	Chronische obstruktive Lungenerkrankung (Engl. chronic obstructive pulmonary disease)
DNase	Desoxyribonuklease
DP	Polymerisationsgrad (engl. degree of polymerization)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	Enzymimmunoassay (engl. enzyme-linked immunosorbent assay)
EndoN	Endo-N-Acetylneuraminidase
ESL-1	E-Selektin Ligand-1 (engl. E-selectin ligand-1)
FGF-R	Fibroblastenwachstumsfaktor-Rezeptore
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukine
KDN	Ketodesoxynonulonsäure
LbpB	Lactoferrin bindendes Protein B
LPS	Lipopolysaccharide
LRP1	Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein 1
MPO	Myeloperoxidase

NCAM	neurales Zelladhäsionsmolekül 1, auch CD56 (engl. neural cell-adhesion molecule)
NET	neutrophilen extrazellulären Fallen (engl. neutrophil extracellular trap)
NETose	Prozess von der Aktivierung bis zur Freisetzung von NET
Neu5Ac	N-Acetylneuraminsäure
Neu5Gc	N-Glycolylneuraminsäure
Neutrophile	neutrophile Granulozyten
NG2-Gliazellen	Oligodendrozyten-Vorläuferzellen die das Proteoglykan NG2 exprimieren
NRP2	Neuropilin-2
ns	Nanosekunden
PAD4	Protein-Arginine Deiminase 4
PAMPs	Pathogen-assoziierte molekulare Muster
PMA	Phorbol-12-myristate-13-acetate
PolySia	Polysialinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (engl. reactive oxygen species)
ST8Sia IV	α 2,8-Polysialyltransferase IV, auch PST
ST8Sia II	α 2,8-Polysialyltransferase II, auch STX (engl. α -2,8-sialyltransferase 8B)
SynCAM1	synaptische Zelladhäsionsprotein (engl. synaptic cell adhesion molecule)
THP-1 Makrophagen	Makrophagen differenzierte aus einer humane monozytischen Zelllinie
WHIM-Syndrom	Warzen-Hypogammaglobulinämie-Immundefizienz-Myelokathexis-Syndrom

1. Einleitung

1.1 Lactoferrin

1.1.1 Geschichtliche Einordnung

Sorensen und Sorensen (Sorensen und Sorensen 1940) konnten 1940 in boviner Milch ein rotes Protein entdecken, das bis heute, also fast 80 Jahre später, erforscht wird. Deutlich wird das anhaltende Forschungsinteresse besonders daran, dass seit einigen Jahren im zwei-Jahres-Rhythmus sogar eine Konferenz über das Protein Lactoferrin (oft auch Lactotransferrin genannt) stattfindet (Lønnerdal 2019). Die meiste Forschung wurde dabei am humanen und bovinen Milch-Lactoferrin betrieben (Adlerova, Bartoskova, und Faldyna 2008). Lactoferrin, dessen rote Farbe von seiner Fähigkeit kommt, mittels zweier Zentren Eisen (Fe^{3+}) zu binden, gehört zur Familie der Transferrine (Metzboutigue et al. 1984, Groves 1960). Lactoferrin und Transferrin haben mit ca. 80 kDa ein ähnliches Molekulargewicht und mit ca. 60 % eine relativ hohe Sequenzidentität. Außerdem besitzen beide Proteine eine ähnliche Disulfid-Struktur und jeweils zwei Eisenbindungszentren (Abb. 1) (Aisen und Liebman 1972, Metzboutigue et al. 1984). Da Transferrin bereits als Eisentransprotein bekannt war, Lactoferrin jedoch eine wesentlich höhere Affinität zu Eisen besitzt und in großen Mengen in der Muttermilch vorkommt, wurde zunächst angenommen, dass Lactoferrin ebenfalls für den Eisentransport z. B. die Eisenaufnahme bei Neugeborenen benötigt wird (Vogel 2012, Aisen und Liebman 1972). Über die Jahre hinweg stellte sich jedoch heraus, dass Lactoferrin deutlich häufiger im Organismus vorkommt und wesentlich vielfältigere Aufgaben übernimmt. Es wurde sogar die Hypothese aufgestellt, dass Lactoferrin das am meisten polyvalente und mit dem Immunsystem assoziiert Protein in Vertebraten ist (Legrand 2016). Dieser bedeutende Unterschied zum Transferrin liegt wahrscheinlich neben der höheren Eisenaffinität hauptsächlich an einem basischem Teil im N-Terminus des Proteins, der größtenteils am humanen und bovinen Lactoferrin untersucht wurde (Vogel 2012, Gifford, Hunter, und Vogel 2005). Spannenderweise kann ein Peptid vom N-Terminus abgespalten werden, welches Lactoferricin genannt wird und unabhängig von Lactoferrin als antimikrobielles Peptid wirken kann (Gifford, Hunter, und Vogel 2005, Bellamy, Takase, Yamauchi, et al. 1992, Bellamy, Takase, Wakabayashi, et al. 1992).

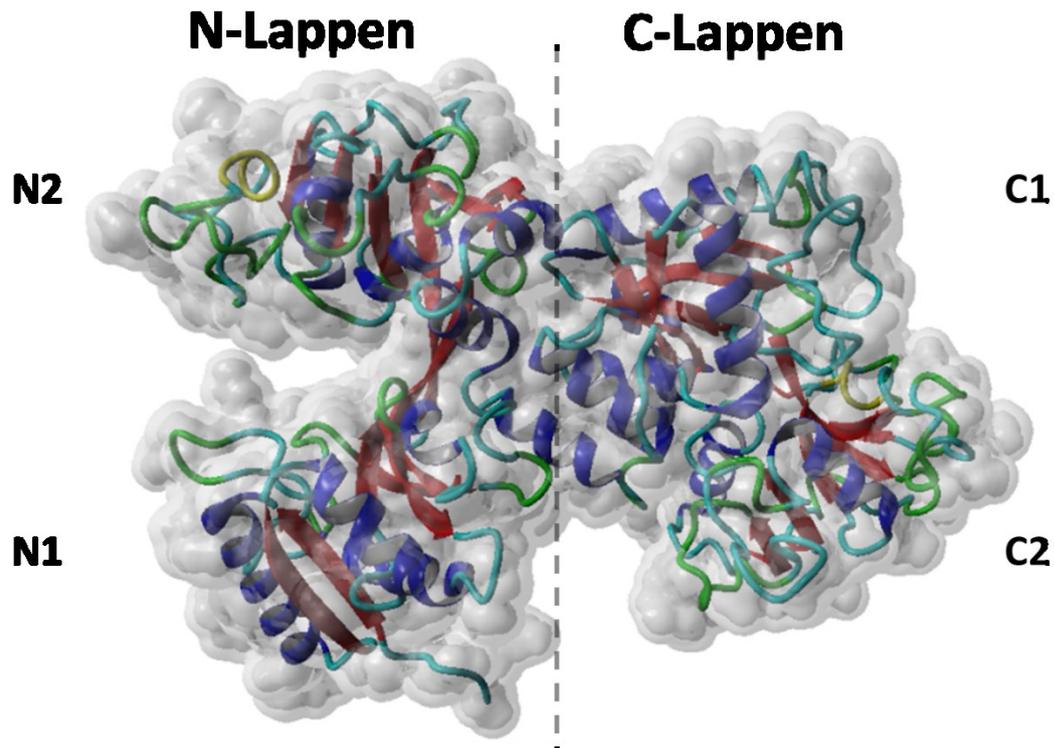


Abbildung 1: Struktur von humanem apo-Lactoferrin. Lactoferrin kann in zwei Lappen und vier Protein-Domänen unterteilt werden. Entsprechend ihrer Lokalisation sind N-terminale Teile mit dem Buchstaben N sowie C-terminale Teile mit den Buchstaben C gekennzeichnet. α -Helices sind in dunkelblau und β -Faltblätter in rot dargestellt. Zudem wird die Raumforderung der Aminosäuren durch eine dynamische Oberflächenstruktur (grau) dargestellt. Die Eisenbindungszentren von Lactoferrin sitzen jeweils in den Furchen zwischen den beiden Domänen. Die Furche zwischen N1- und N2- Domäne ist in apo-Lactoferrin weit geöffnet, während die Furche zwischen C1- und C2- Domäne eine geschlossene Konformation einnimmt. Modifiziert aus (Kühnle, Lütteke, et al. 2019) CC BY 4.0.

1.1.2 Struktur und Aufbau

Die meisten Säugetier-Lactoferrine haben ein Molekulargewicht von ca. 80 kDa und bestehen aus einer Kette von etwa 690 bis 711 Aminosäuren (Vogel 2012, Karav et al. 2017, Le Parc et al. 2014, Levay und Viljoen 1995). Generell kann man Lactoferrin in zwei vermutlich durch Genduplikation entstandene „Lappen“ unterteilen (Abb. 1) (Vogel 2012, Nazir et al. 2017, Bullen und Griffiths 1987). Diese sind zu ca. 40 % identisch und werden ihrer Aminosäureposition entsprechend als N- bzw. C-Lappen bezeichnet (Aminosäuren 1-333 und 345-691 in humanem Lactoferrin). Diese werden weiter in jeweils zwei Domänen mit den Namen N1 und N2 bzw. C1 und C2 unterteilt (Vogel 2012, Metzboutigue et al. 1984, Baker und Baker 2005). Beide Domänen zusammen formen

jeweils eine tiefe Furche, die das Eisenbindungszentrum darstellt (Baker und Baker 2005). Bei der Eisenbindung wird zusätzlich ein bindendes Carbonat-Ion (CO_3^{2-}) benötigt (Vogel 2012, Baker et al. 1994). Durch die Eisenbindung ist es Lactoferrin möglich, in zwei Konformationen vorzukommen. Der „geöffneten“ apo-Form, in der kein Eisen gebunden ist und der „geschlossenen“ holo-Form, in der Lactoferrin mit Eisen beladen ist (Baker und Baker 2012, Jameson et al. 1998, Baker et al. 1994, Baker und Baker 2005). Nur 10 bis 20 % des bovinen Milch-Lactoferrins ist normalerweise mit Eisen beladen (Wang, Timilsena, et al. 2017). Neben Eisenionen scheint Lactoferrin auch andere Ionen wie z. B. Al^{3+} , Ga^{3+} , Mn^{3+} , Co^{3+} , Cu^{2+} und Zn^{2+} binden zu können (Adlerova, Bartoskova, und Faldyna 2008, Baker et al. 1994).

Lactoferrin ist ein Glykoprotein das N-glykosidisch vorkommt. Humanes Milch-Lactoferrin besitzt drei Glykosylierungsstellen, die variierend glykosyliert sind. Dabei sind die Aminosäuren an den Positionen Asn479 in 100 %, Asn138 in 94 % und Asn624 in 9 % der Fälle glykosyliert (vanBerkel et al. 1996, Karav et al. 2017). Im Vergleich zu bovinem und murinen Lactoferrin unterscheidet sich sowohl die Anzahl als auch die Position der Glykosylierungsstellen (bovine: Asn233, 281, 368, 476, und 545; murine: Asn476) (Baker und Baker 2009, vanBerkel et al. 1996). Je nach Spezies unterscheidet sich das Glykosylierungsmuster von Lactoferrinen, die aus Milch isoliert wurden, die meisten besitzen jedoch zwei Antennen (Karav et al. 2017, Coddeville et al. 1992).

Neben den bereits beschriebenen Strukturen von Lactoferrin besitzt das Protein in der N1-Domäne, genauer am N-terminalen Teil des Proteins, eine basische Region. Die Anreicherung der Aminosäuren Lys und Arg verleihen dieser Region stark kationische Eigenschaften (Vogel 2012). Interessanterweise lassen sich in diesem basischen Teil des humanen Proteins weiter abspaltbare Peptide wie Lactoferricin (AS 1-49), Lactoferrampin (AS 266–286) sowie eine Kernlokalisationssequenz (AS 1-5) und zwei LPS-Bindungs-Motife (AS 2-4 und AS 28-34) identifizieren (Vogel 2012, Ferguson et al. 2000, Bellamy, Takase, Yamauchi, et al. 1992). Zum Vergleich wurde die strukturelle Ähnlichkeit von bovinem und humanem Milch-Lactoferrin in Abbildung 2 A dargestellt. Im Detail wird dabei auch auf das N-terminale Peptid Lactoferricin eingegangen (Abb. 2 B und C).

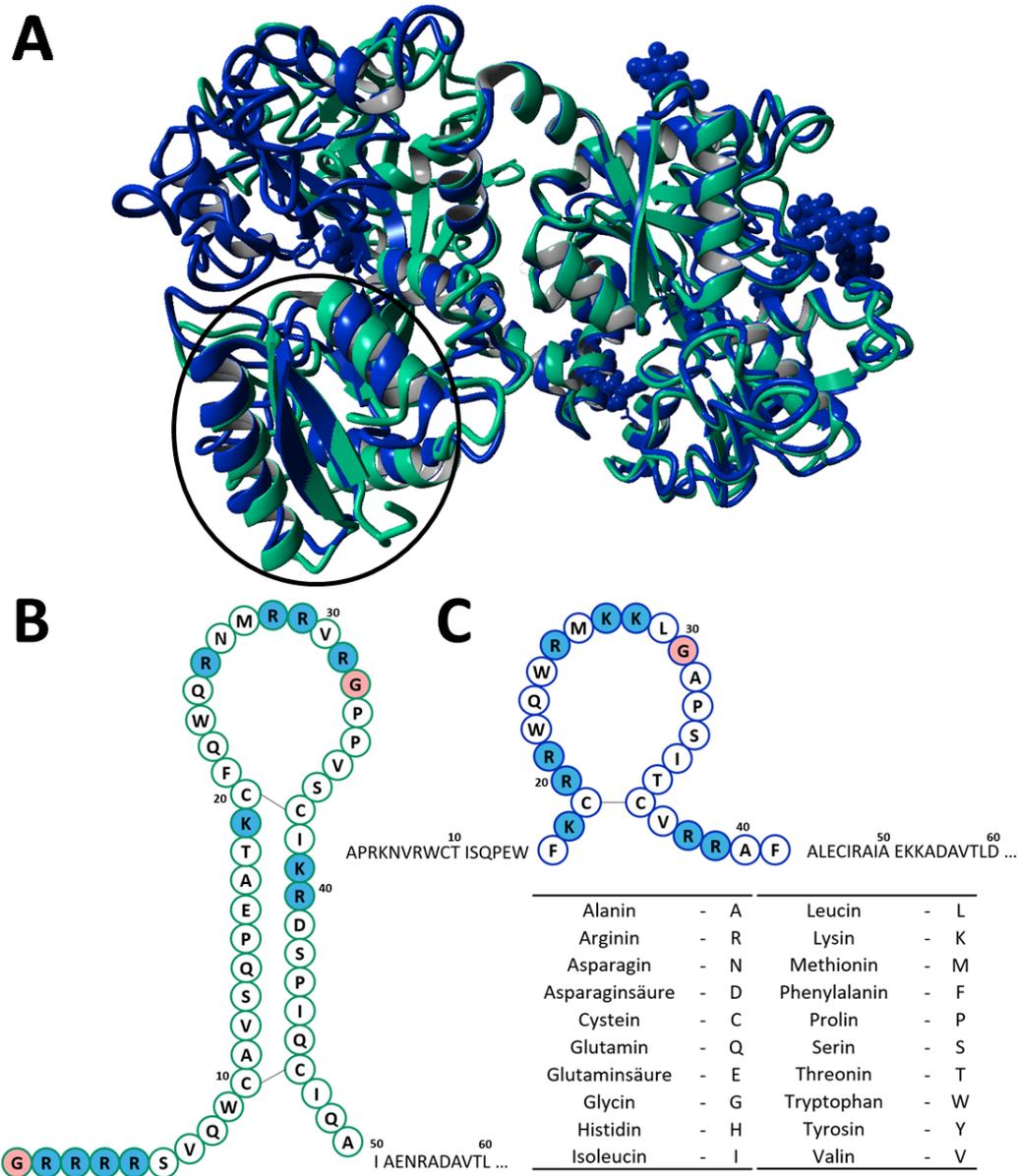


Abbildung 2: Überlagerung und Vergleich der Struktur bovinem und humanem Lactoferrin. (A) Vergleich der strukturellen Ausrichtung von bovinem (blau) und humanem (grün) Lactoferrin (PDB-Dateien: 1BLF und 1CB6). Der Kreis zeigt die in (B) und (C) dargestellten Bereiche. Modifiziert aus (Kühnle, Lütke, et al. 2019) CC BY 4.0. Schematische Darstellung der ersten 60 Aminosäuren von ausgereiftem humanem (B; grün) und bovinem (C; blau) Lactoferrin. Die jeweiligen Lactoferrin-Sequenzen wurden hervorgehoben und entsprechend ihrer Einzel-Peptidform dargestellt. Dazu wurden die verbundenen Disulfidbrücken (Verbindungsstriche) als auch basische (blau) und saure (rot) Aminosäuren hervorgehoben. Humanes Lactoferrin entspricht den Aminosäuren 1-49 und bovines Lactoferrin entspricht den Aminosäuren 17-41. Modifiziert aus (Vogel 2012, Gifford, Hunter, und Vogel 2005, Hunter et al. 2005, Hoskin 2011, The UniProt 2018).

1.1.3 Vorkommen

Mit wenigen Ausnahmen wie Ratte oder Hund konnte Lactoferrin in der Milch von den meisten Säugetieren gefunden werden und gehört taxonomisch in die Gruppe der Säugetiere (Lambert 2012, Levay und Viljoen 1995, Masson und Heremans 1971). Lactoferrin kommt hoch abundant in humaner Milch (ca. 1-3,2 mg/ml) vor. Die höchsten Konzentrationen können aber in Kolostralmilch (5-7 mg/ml) gefunden werden. Interessanterweise enthalten bovine Milchproben wesentlich geringere Lactoferrin Konzentrationen (32-486 µg/ml) (Nazir et al. 2017, Kawai et al. 1999, Cheng et al. 2008). Dabei wird Lactoferrin wie auch in vielen anderen Körperflüssigkeiten von exokrinen Drüsenepithelzellen gebildet (Masson et al. 1966, Inoue et al. 1993). Neben Milch kommt Lactoferrin beim Menschen deshalb unter anderem in Tränen-, Vaginal-, Synovial-, Samen-, und Magen-Darm-Flüssigkeiten als auch im Fruchtwasser, Bronchialsekret, Nasalsekret und Harn vor (Levay und Viljoen 1995).

Lactoferrin konnte außerdem als humaner Blutbestandteil identifiziert werden. Im Blut wird Lactoferrin durch neutrophile Granulozyten freigesetzt, dabei scheint die Anzahl der neutrophilen Granulozyten die Menge an Lactoferrin im Blutplasma deutlich zu beeinflussen, aber nicht die einzige Quelle zu sein (Kanwar, Samarasinghe, et al. 2012, Bullen und Griffiths 1987, Levay und Viljoen 1995, Nazir et al. 2017). Neutrophile speichern Lactoferrin in sekundären Granular und können diese unter anderem *via* Exozytose an Infektions- und Entzündungsherden freilassen. Somit kann es zu einer lokalen Anreicherung von Lactoferrin kommen (Legrand 2016, Maacks, Yuan, und Wood 1989, Britigan, Serody, und Cohen 1994). Lactoferrin aus dem Blut ist es möglich, mittels Rezeptor-vermittelter Transzytose die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden, wird aber ebenfalls im menschlichen Gehirn exprimiert (Kamemori et al. 2008, Fillebeen et al. 1999, Siebert und Huang 1997, Kanwar, Samarasinghe, et al. 2012).

1.1.4 Funktionen von Lactoferrin im Überblick

Lactoferrin übernimmt eine ganze Reihe von Funktionen im Organismus, vor allem aber als Komponente des angeborenen Immunsystems (Legrand 2016). Aufgrund der Fülle an vorhandenen Informationen sollen hier deshalb generelle Mechanismen und einige Beispiele ein Überblick über die Fähigkeiten von Lactoferrin geben. Für besonders interessierte Leser sind hier einige Zusammenfassungen aus der Literatur: Vogel 2012, Nazir et al. 2017, Levay und Viljoen 1995, Adlerova, Bartoskova, und Faldyna 2008, Jenssen und Hancock 2009, Brock 1995, Actor, Hwang, und Kruzel 2009, Caccavo et al. 2002, Legrand et al. 2008, Legrand 2016, Wang, Timilsena, et al. 2017. Ein möglicher

Grund für die Multifunktionalität, die Lactoferrin aufweist, ist die hohe Verfügbarkeit im Körper, da es einerseits in vielen Körperflüssigkeiten vorkommt und andererseits durch die Ausschüttung mittels chemotaktischen neutrophilen Granulozyten eine riesige Reichweite besitzt (Levay und Viljoen 1995, Actor, Hwang, und Kruzel 2009, Ward 1970, Siebert und Huang 1997, Keller und Sorkin 1968, Lönnerdal 2013). Des Weiteren hat Lactoferrin unter anderem durch seinen basischen N-Terminus gute Bindungseigenschaften zu einer großen Menge an Rezeptoren, die entweder Signalkaskaden oder Endozytose vermitteln. Zusätzlich bindet Lactoferrin Makromoleküle wie Lipopolysaccharide (genauer Lipide A), Heparin oder DNA und interagiert mit Enzymen wie z. B. Lysozym (Vogel 2012, Liao, Jiang, und Lönnerdal 2012, Suzuki, Lopez, und Lönnerdal 2005, van Berkel et al. 1997, Levay und Viljoen 1995, Drago-Serrano et al. 2012). Viele Funktionen werden außerdem von der Fähigkeit, Lactoferrins hoch affin Eisen zu binden, vermittelt (Preeti et al. 2018).

Als Milchkomponente gelangt Lactoferrin in den unausgereiften Verdauungstrakt des Säuglings. Dort kommt es vermutlich bis zu vier Monaten nach der Geburt unverdaut vor, da es bis zu diesem Alter im Stuhl der Säuglinge nachgewiesen werden kann (Davidson und Lönnerdal 1987, Lönnerdal 2013, Broussard 1995). Lactoferrin hilft im Verdauungstrakt bei der Proliferation und Differenzierung von Dünndarmzellen. Vor allem von Rezeptoren auf Kryptenzellen und Enterozyten wird Lactoferrin erkannt und kann unterschiedliche Signalkaskaden als auch Endozytose auslösen. Nach der Aufnahme in die Zelle dient es unter anderem als Transkriptionsfaktor (Liao, Jiang, und Lönnerdal 2012). Aber auch in Erwachsenen scheinen bioaktive Fragmente von Lactoferrin wie z. B. Lactoferricin im Darm zu entstehen (Liao, Jiang, und Lönnerdal 2012, Kuwata et al. 1998). Interessanterweise wurde in neugeborenen und 6 Wochen alten Ferkeln nachgewiesen, dass intaktes bovines Lactoferrin über den Darm sogar (Farnaud und Evans 2003) in die Blutbahn aufgenommen werden kann (Harada et al. 1999).

Durch Lactoferrins antimikrobielle Eigenschaften reguliert es nicht nur die Entwicklung des Darmmikrobioms, sondern unterstützt auch das systemische Immunsystem. Lactoferrin wirkt antibakteriell gegen eine ganze Reihe an grampositiven als auch gramnegativen Bakterien. Außerdem ist es Lactoferrin durch die Bindung von LPS als auch Lipoteichonsäure möglich mit bakteriellen Membranen zu interagieren (Jenssen und Hancock 2009, Donovan 2016). Dadurch kann Lactoferrin Zellschäden verursachen, beispielsweise durch das Erhöhen der Zellpermeabilität und der daraus folgenden Herauslösung von LPS (Ellison, Giehl, und LaForce 1988, Jenssen und Hancock 2009, Kanwar et al. 2015). Vermutlich kann Lactoferrin zusätzlich durch unterschiedliche Mechanismen bakterielles Wachstum und Biofilmbildung inhibieren. Hauptsächlich kann

Lactoferrin die Zugänglichkeit von Eisen durch seine hoch affine Eisenbindung für essenzielle bakterielle Prozesse beeinflussen. Des Weiteren kann es Bakterien zu einer vermehrten Bewegungsform namens „twitching“ (zucken) anregen, wodurch eine Bindung an Säugerzellen unterbunden wird (Nazir et al. 2017, Singh et al. 2002). Lactoferrin ist aber auch in der Lage, die Oberflächenadhäsion von Bakterien auf Epithelzellen oder der Darmschleimhaut zu stören, um dadurch Biofilmbildung zu vermeiden (Yamauchi et al. 1993, Jenssen und Hancock 2009). Der gleiche Mechanismus wird auch gegen die Interaktion von Viren und Parasiten angewandt. Dabei wird von Lactoferrin eine kompetitive Bindung an Molekülen der Wirtszellen (z. B. Glykosaminoglykane) oder der Pathogenoberfläche aufgebaut und somit ein anlagern an Zellen bzw. ein Eindringen in Zellen inhibiert (Ward, Paz, und Conneely 2005, Vogel 2012, Valenti und Antonini 2005, Sinnis et al. 1996).

Neben diesen direkten Möglichkeiten, gegen Bakterien, Viren, Parasiten und Pilzen vorzugehen, kann Lactoferrin auch das Immunsystem auf unterschiedliche Weise regulieren (Legrand 2016). Auf den ersten Blick scheint Lactoferrin widersprüchliche Wirkungen auf das Immunsystem zu haben. Einerseits sorgt es für die Proliferation, Differenzierung und Rekrutierung von unterschiedlichen Immunzellen wie z. B. allen polymorphonuklearen Leukozyten als auch natürlichen Killerzellen und T-Zellen (Vogel 2012, Kanwar et al. 2015). Zusätzlich kann es beispielsweise Prozesse wie die Phagozytose von Neutrophilen und Makrophagen bei Infektionen stimulieren, wobei auch eine Aktivierung des Komplementsystems eine Rolle spielen kann (Legrand et al. 2006, Kai et al. 2002, Sherman et al. 2012). Andererseits wirkt es anti-inflammatorisch auf Immunzellen, indem es erstens die Produktion von pro-inflammatorischen Substanzen wie z. B. Zytokinen, Interleukinen wie IL-1 β und IL-6 einschränkt und anti-inflammatorische Substanzen wie Interleukin IL-10 oder IL-4 erhöht (Legrand 2016, Vogel 2012, Adlerova, Bartoskova, und Faldyna 2008). Zweitens kann es mit Pathogen-assoziierten molekularen Mustern (PAMPs) wie LPS oder die für die Erkennung nötigen Rezeptoren (z. B. Glykoprotein CD14) interagieren (Legrand et al. 2006, Baveye et al. 2000). Diese Bindung inhibiert die PAMP-Erkennung und reguliert somit die Immunantwort (Legrand 2016). Als Letztes ist Eisen nicht nur eine essenzielle Substanz für Bakterien, sondern auch ein Katalysator bei der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in Leukozyten. Somit kann Lactoferrin auch Eisen für Leukozyten unzugänglich machen, wodurch die Produktion von ROS reduziert wird (Ward, Paz, und Conneely 2005). Zusammengefasst wirkt Lactoferrin als Modulator des Immunsystems, der es durch den Aufbau stärkt, es aber auch vor einer Überreaktion (z. B. einem septischen Schock) schützen kann und dessen gezielte Aktivierung reguliert (Kanwar, Sun, et al. 2012, Vogel 2012).

Wie bereits angedeutet wird Lactoferrin durch sehr viele verschiedene Rezeptoren im Körper erkannt (Suzuki, Lopez, und Lönnerdal 2005). Diese werden in sehr vielen unterschiedlichen Organen und Geweben exprimiert, darunter sind unter anderem Herz, Gehirn, Dünndarm, Leber, Hoden, Lymphknoten und Speicheldrüsen (Suzuki, Lopez, und Lönnerdal 2005, Lönnerdal 2013). Ein Beispiel für diese Rezeptoren ist das Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein 1 (LRP1), dieses wird unter anderem auf Knochen bildenden Osteoblasten exprimiert (Grey et al. 2004). Lactoferrin kann über diesen Rezeptor die Differenzierung, die Mitogenese und das Überleben der Osteoblasten fördern. Das zeigt eine weitere Fähigkeit von Lactoferrin, die Auslösung einer vermehrten Knochenbildung (Cornish et al. 2004, Adlerova, Bartoskova, und Faldyna 2008).

Interessanterweise ist über die Funktion der Glykane von Lactoferrin wenig bekannt (Le Parc et al. 2017, Karav et al. 2017). Es wird allerdings berichtet, dass die Glykosylierung von bovinem Lactoferrin einen Schutz vor einem Proteaseverdau mittels Trypsin bietet. Bei humanem Lactoferrin konnte ein solcher Effekt nicht beobachtet werden, allerdings ist dieses generell stabiler gegenüber einem tryptischen Verdau (van Veen et al. 2004). Die Absättigung von Lactoferrin mit Eisen führt ebenfalls zu einer höheren Resistenz gegenüber dem Enzym Trypsin (Karav et al. 2017). Zu ergänzen ist zudem, dass auch die Eisenbeladung einen Effekt auf die Funktion von Lactoferrin haben kann. Beispielsweise kann eisengesättigtes bovines Lactoferrin das Tumorwachstum von Mäusen mit EL-4 Lymphomen komplett aufhalten, wohingegen natives Lactoferrin das Wachstum nur behindert (Kanwar et al. 2008).

Als Letztes sollen hier einige der vielen Möglichkeiten zur Anwendung von Lactoferrin angesprochen werden, die sich aus den zuvor beschriebenen Eigenschaften ergeben. Lactoferrin wird in der Lebensmittelindustrie als Nahrungsergänzungsmittel vor allem für Säuglingsanfangsnahrung angewendet und weiter untersucht (Tomita et al. 2009). Dabei soll Lactoferrin präventiv gegen Symptome wie beispielsweise Spätsepsis und Diarrhoe in Studien mit Frühgeborenen, Säuglingen oder Kleinkindern wirken (Nazir et al. 2017, He, Cao, und Yu 2018). Durch die lokale Anreicherung an Infektionsherden wird es bei einigen Krankheiten (z. B. zystischer Fibrose, chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen oder rheumatoider Arthritis) als Diagnose-Marker diskutiert (Nazir et al. 2017, Vogel 2012, Gonsalves et al. 2013, Buderus, Boone, und Lentze 2015). Lactoferrin besitzt vermutlich durch seine immunregulatorischen Eigenschaften die Fähigkeit gegen Tumore in unterschiedlichen Organen (z. B. Lunge, Leber, Gehirn, Dickdarm, Bauchspeicheldrüse) vorzugehen (Kanwar, Samarasinghe, et al. 2012). Dafür unterstützt Lactoferrin beispielsweise die Aktivierung von natürlichen Killerzellen und Neutrophilen, regt Makrophagen zur Produktion von Zytokinen und ROS an und aktiviert

Apoptose-Signalwege von Dickdarmkrebs-, Lungenkrebs- sowie Leukämiezellen (Kanwar, Samarasinghe, et al. 2012, Mader et al. 2005, Fujita et al. 2004). Da Lactoferrin über die Blut-Hirn-Schranke gelangt, können Nanopartikel bedeckt mit Lactoferrin und beladen mit unterschiedlichen Medikamenten, nicht nur für Gehirntumore angewendet werden, sondern zusätzlich für Krankheiten wie Parkinson oder Alzheimer Verwendung finden (Kanwar, Samarasinghe, et al. 2012, Li et al. 2018, Xu et al. 2017, Yan et al. 2018, Kanwar et al. 2015). Außerdem wurden Versuche durchgeführt, um die Knochenregeneration zu steigern, indem man unterschiedliche Biomaterialien mit Lactoferrin beschichtet oder belädt (Shi et al. 2017, Görmez et al. 2015). Aufgrund des sich daraus ergebenden wachsenden medizinischen und industriellen Interesses wurden interessanterweise bereits transgenetische Kühe erzeugt, mittels derer es möglich ist, rekombinantes humanes Lactoferrin mit einer Milchkonzentration von 4.5-13.6 g/l zu produzieren (Wang, Sun, et al. 2017).

1.1.5 Lactoferricin

Der basische N-terminale Teil von Lactoferrin ist für viele Eigenschaften von Lactoferrin verantwortlich. Besonders interessant ist deshalb das Freisetzen eines antimikrobiellen Peptids Namens Lactoferricin aus dieser Domäne des Proteins. Bovines Lactoferricin hat eine Länge von 25 Aminosäuren (AS 17-41), wohingegen humanes Lactoferricin mit 49 Aminosäuren (AS 1-49) deutlich länger ist (Abb. 2) (Gifford, Hunter, und Vogel 2005, Bellamy, Takase, Yamauchi, et al. 1992, Vogel 2012). Lactoferricin teilt viele Funktionen und Eigenschaften des Mutterproteins. Es ist bioaktiv und wirkt gegen Bakterien, Viren, Parasiten, Pilze und Tumore. Zudem besitzt Lactoferricin immunmodulatorische Eigenschaften (Gifford, Hunter, und Vogel 2005). Wissenswert ist ebenfalls das Lactoferricin in vielen Fällen wirksamer ist als Lactoferrin, beispielsweise wirkt es im Vergleich zu Lactoferrin wesentlich effektiver gegen eine Vielzahl von Bakterien (Gifford, Hunter, und Vogel 2005, Bellamy, Takase, Wakabayashi, et al. 1992, Yamauchi et al. 1993). Lactoferricin kann durch Proteolyse von Lactoferrin unter sauren Bedingungen mit Pepsin hergestellt werden (Bellamy, Takase, Yamauchi, et al. 1992). *In vivo* ist die Freisetzung von Lactoferricin bereits nachgewiesen worden. Einerseits entsteht es beispielsweise im Magen andererseits konnte es in Patienten mit zystischer Fibrose und gleichzeitiger *Pseudomonas aeruginosa* Infektion in der Lunge nachgewiesen werden (Britigan et al. 1993, Kuwata et al. 1998). Was die Annahme nahe legte, dass es generell an Entzündungsherden mittels bakterieller oder endogener Proteasen freigesetzt werden kann (Vogel 2012, Gifford, Hunter, und Vogel 2005). Bovines Lactoferricin besitzt ein basisches RRQWQR-Motif, das dem Peptid besonders starke antibakterielle

Eigenschaften zu verleihen scheint (Lars H. Vorland 1998, Vogel 2012). Lactoferricin bindet dabei beispielsweise die LPS in den Membranen von *E. coli*-Bakterien (*Escherichia coli*). Diese Bindung sorgt wahrscheinlich für eine Umstrukturierung und Schädigung der äußeren Bakterienmembranen (Mohanty et al. 2016, Aguilera et al. 1999). Aus diesem Grund wird Lactoferricin unter anderem in Kombination mit unterschiedlichen Antibiotika als antimikrobielles Peptid (AMP) im Einsatz gegen resistente Bakterienstämme untersucht (Theolier et al. 2014).

1.2 Polysialinsäure

1.2.1 Ein Überblick

In Vertebraten konnten große Mengen an Polysialinsäure (PolySia) erstmals durch Finne und Kollegen 1982, gekoppelt an das neurale Zelladhäsionsmolekül (NCAM) in jungen Mäusen entdeckt werden (Finne 1982, Rutishauser et al. 1985, Rutishauser 2008). Wie der Name PolySia schon vermuten lässt, handelt es sich hierbei um ein lineares Polysaccharid aus Sialinsäurebausteinen. Da PolySia oft nur aus einem Typ von Sialinsäure aufgebaut ist; z. B. aus der Sialinsäure N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac) beim Menschen und weil alle Sialinsäuren eine Familie bilden, wird es häufig als Homopolymer beschrieben (Kallolimath et al. 2016, Colley, Kitajima, und Sato 2014, Irie et al. 1998, Chou et al. 1998). Aber im Gegensatz zu anderen bekannten Polysaccharidketten wie Glykogen, Chitin, Stärke oder Zellulose, die z. B. als Energiespeicher oder zur Strukturbildung dienen, wird PolySia in Vertebraten als posttranslationale Modifikation ganz spezifischen Trägerproteinen angehängt. Es wurden bisher 8 PolySia-Trägerproteine identifiziert, von denen NCAM als erstes entdeckt wurde und am häufigsten als PolySia-Träger im Gehirn von Vertebraten zu finden ist (Tabelle 1), weshalb NCAM auch das am besten beschriebenen und charakterisierten Protein ist (Galuska, Lütteke, und Galuska 2017, Rutishauser 2008, Colley, Kitajima, und Sato 2014, Hildebrandt, Mühlhoff, und Gerardy-Schahn 2010). Aufgrund der vielfältigen Literatur über NCAM im Gehirn könnte man deshalb vermuten, dass sich die Aufgaben von PolySia ausschließlich auf die Entwicklung und Erhaltung der Plastizität des Gehirns beschränkt. Dabei übernimmt PolySia interessanterweise ebenfalls multifunktionale Aufgaben im gesamten Organismus, unter anderem bei der Entwicklung anderer Organe (wie Herz, Leber oder Nieren). Außerdem hat es viele immunmodulatorische Funktionen (Galuska, Lütteke, und Galuska 2017, Janas und Janas 2011, Rutishauser 2008, Mühlhoff et al. 2013). Aufgrund seiner Funktionen wird

es aber auch häufig im Zusammenhang mit Hirnkrankheiten wie Schizophrenie oder Metastasen bildenden Tumoren genannt (Sato und Kitajima 2013, Schnaar, Gerardy-Schahn, und Hildebrandt 2014). Alle Funktionen beruhen auf speziellen Eigenschaften von PolySia. Es hat eine sehr flexible Länge und einen hohen möglichen Polymerisierungsgrad (DP für degree of polymerisation), zudem ist es stark negativ geladen und besitzt eine hohe Rotations- bzw. Bewegungsfreiheit (Sato und Kitajima 2013, Janas und Janas 2011).

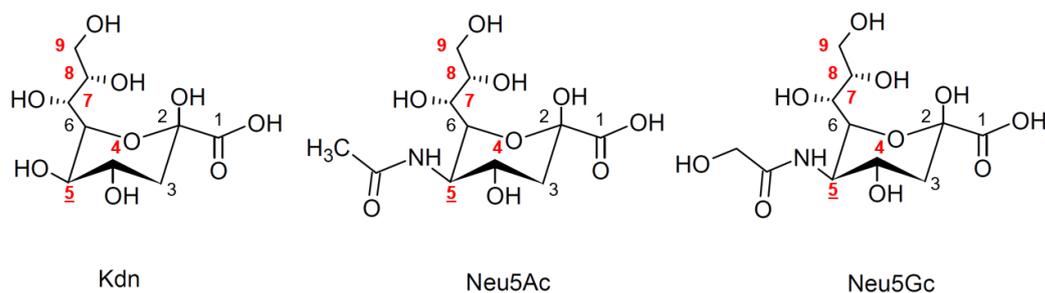


Abbildung 3: Die drei am häufigsten in der Natur vorkommenden Sialinsäuren. Dargestellt ist jeweils das aus 9 Kohlenstoffatomen bestehende Grundgerüst der Sialinsäuren, Ketodesoxyonulonsäure (KDN), N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac) und N Glycolylneuraminsäure (Neu5Gc). Die variabel modifizierbaren Positionen sind in rot dargestellt. Die Position C5 wurde zusätzlich unterstrichen, da hier am häufigsten Veränderungen vorkommen. ChemSketch (Version 12.01) und modifiziert aus (Tiralongo et al. 2013, Schnaar, Gerardy-Schahn, und Hildebrandt 2014).

1.2.2 Struktur und Aufbau

Um den Aufbau von PolySia zu verstehen, ist zuerst ein Blick auf die Grundbausteine, die Sialinsäuren nötig. Sialinsäuren bezeichnet eine Gruppe von 50 natürlicherweise vorkommenden Monosacchariden, die zu einer Familie zusammengefasst werden können (Angata und Varki 2002, Schauer 2009). Allen Sialinsäuren ist gemein, dass sie zu den α -Ketosäuren gehören und im Gegensatz zu den meisten anderen Monosacchariden aus einer fortlaufenden Kette von 9 miteinander verbunden Kohlenstoffatomen bestehen (Angata und Varki 2002). Sialinsäuren sind besonders dafür bekannt, dass diese in Wirbeltieren meist den terminalen Abschluss einer Glykanstruktur bilden (Cohen und Varki 2010, Schnaar, Gerardy-Schahn, und Hildebrandt 2014). Die Vielfältigkeit der Sialinsäure-Familie kommt dadurch zustande, dass Sialinsäuren an Kohlenstoffatomen der Positionen C4, C5, C7, C8 und C9

variierend modifiziert werden können z. B. durch O-Acetylierung oder Sulfatierung (Abb. 3) (Angata und Varki 2002). Besonders häufig sind dabei Veränderungen an der Position C5. Trotz der vielen Variationsmöglichkeiten kommen in der Natur am häufigsten die Sialinsäuren Neu5Ac, N-Glycolylneuraminsäure (Neu5Gc) und Ketodesoxyonulonsäure (KDN) vor (Schnaar, Gerardy-Schahn, und Hildebrandt 2014). Die Carboxylgruppe an Position C1 stellt bei physiologischen pH-Werten eine relativ starke Säuregruppe dar (Schnaar, Gerardy-Schahn, und Hildebrandt 2014, Janas und Janas 2011).

Das besondere an Sialinsäuren ist zudem, dass aus ihnen lange Homopolymere gebildet werden können. Je nach Polymerisationsgrad unterscheidet man deshalb in Mono- (DP 1), Di- (DP 2), Oligo- (DP 3-7) und Polysialinsäuren (DP \leq 8) (Sato und Kitajima 2013, Sato und Kitajima 1999, Sato 2004). In Meningitis verursachenden Bakterienstämmen konnten bereits PolySia mit einem Polymerisationsgrad von bis zu 400 Sialinsäuren gefunden werden (Sato und Kitajima 2013, Sato 2004). Je nach Organismus kann PolySia mittels unterschiedlich positionierter Kohlenstoffatomen verlinkt sein (α 2,4- α 2,5_{O_{glycolyl}}- α 2,8- α 2,9- und α 2,8/9-Verbindungen). In Vertebraten scheint allerdings, mit Ausnahme einiger Tumorzellen, die Verlinkung auf eine α 2,8 glykosidische Bindung begrenzt zu sein (Sato und Kitajima 2013, Janas und Janas 2011, Simon et al. 2013). Der Verlinkungstyp sowie auch die Länge haben einen Einfluss auf die strukturelle Konformation, die PolySia ausbilden kann, sodass sich über diese Merkmale vermutlich die Funktion steuern lässt (Sato und Kitajima 2013). In Säugern sind die α 2,8-Polysialyltransferasen ST8SialI (auch STX) und ST8SialIV (auch PST) zuständig für die Verknüpfung der Sialinsäurebausteine. Im Golgi-Apparat wird dazu zuerst eine N- oder O- Glykanstruktur mit einer endständigen Sialinsäure an einem PolySia-Trägerprotein aufgebaut. An dieses Grundgerüst können dann die beiden Polysialyltransferasen weitere Sialinsäuren ankoppeln (Abb. 4) (Schnaar, Gerardy-Schahn, und Hildebrandt 2014, Marx et al. 2007, Galuska, Lütteke, und Galuska 2017, Johnson et al. 2005). Für die PolySia-NCAM Verbindung ist bekannt, dass diese an die Immunglobulindomäne 5 des Proteins an zwei N-Glykosylierungsstellen mit 2-4 Antennen erfolgen kann (Sato und Kitajima 2013, Liedtke et al. 2001, Schnaar, Gerardy-Schahn, und Hildebrandt 2014). Neben NCAM sind in Vertebraten weitere Trägerproteine bekannt, die in Tabelle 1 zusammengefasst sind. Von diesen 8 Proteinen sind alle zumindest temporär auf der Zelloberfläche integriert, sodass PolySia im Normalfall einen Teil der Glykokalyx bilden kann (Janas und Janas 2011).

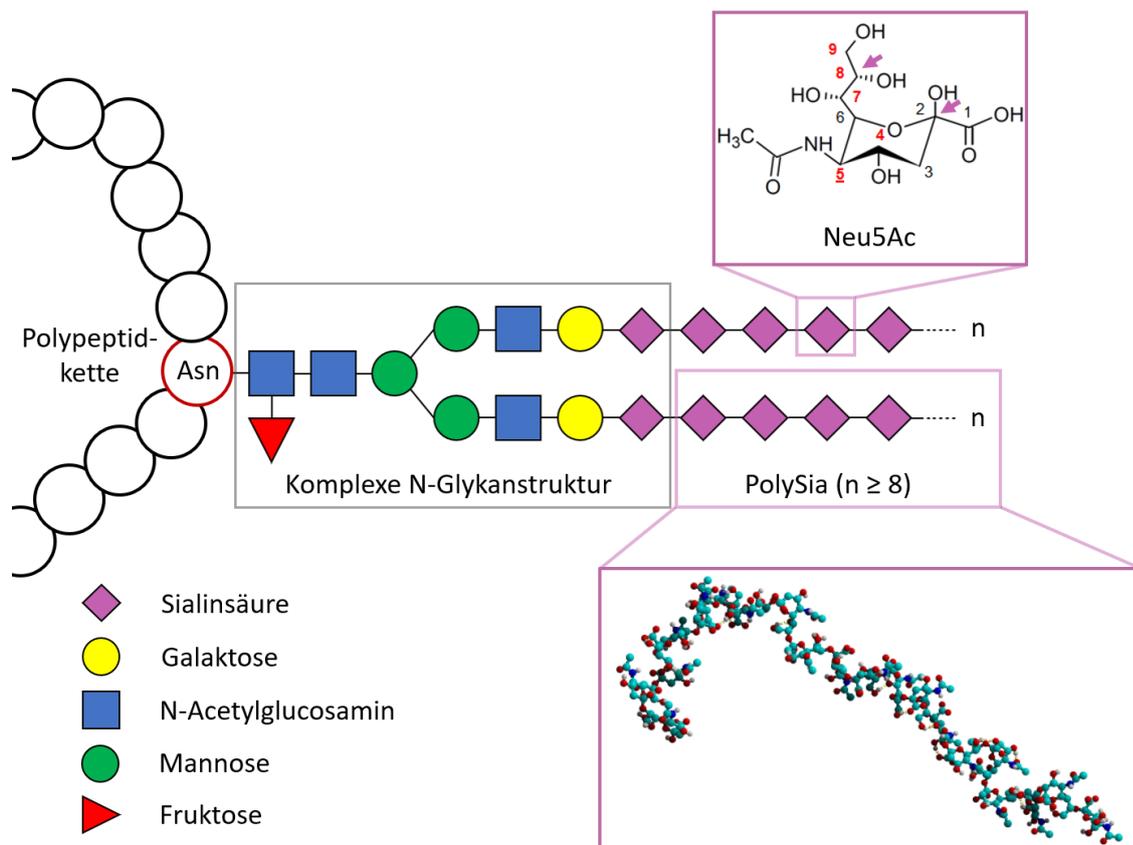


Abbildung 4: Schematischer Aufbau von PolySia an einem Trägerprotein mittels einer N-Glykosylierungsstelle. PolySia wird dabei in zwei Darstellungsvarianten gezeigt. Unteren anderem ist PolySia übersichtlich als komplexe N-Glykanstruktur (grauer Kasten) mit zwei Polysialinsäureketten aus jeweils mindestens 8 Sialinsäurebausteinen dargestellt. Diese werden mittels folgender Glykan-Symbole, Sialinsäure (rosa Raute), Galaktose (gelber Kreis), N-Acetylglucosamin (blaues Quadrat), Mannose (grüner Kreis) und Fruktose (rotes Dreieck) veranschaulicht. Die komplexe N-Glykanstruktur ist über die Aminosäure Asparagin (Asn) angeheftet an die Polypeptidkette eines PolySia-Trägerproteins (z. B. NCAM). Oberhalb der Polysialinsäureketten ist der Aufbau des Sialinsäurebausteins N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac) zu sehen. Markiert sind durch Pfeile die beiden Kohlenstoffatome, die über die α 2,8 glykosidische Bindung zu PolySia verknüpft werden. Unterhalb der Polysialinsäureketten ist als simuliertes Molekül-Strukturmodell eine mögliche Konformation von PolySia (aus 20 Sialinsäuren) als Kugel-Stab-Modell dargestellt. Dabei werden die Atome Wasserstoff (grau), Sauerstoff (rot), Kohlenstoff (türkis) und Stickstoff (blau) farblich differenziert. Diese Darstellungsform zeigt besonders gut die hohe Wendigkeit und Flexibilität von PolySia. Datenquellen (Schnaar, Gerardy-Schahn, und Hildebrandt 2014, Tiralongo et al. 2013) und modifiziert aus (Kühnle, Lütke, et al. 2019) CC BY 4.0.

1.2.3 Vorkommen

Bekannte Mikroorganismen und Invertebraten, die PolySia synthetisieren, sind zumeist pathogene gramnegative Bakterien und Seeigel (Sato und Kitajima 2013, Barry und Goebel 1957, Egan et al. 1977, SeGall und Lennarz 1979). Dagegen konnte PolySia in Vertebraten wie Lachsfische (Salmonidae), Vögeln, Amphibien, Reptilien und Säugetieren wesentlich häufiger identifiziert werden (Sato und Kitajima 2013, Kitajima, Inoue, und Inoue 1986). Das Vorkommen von PolySia in Bakterien scheint eine spezifische Anpassung an den Wirtsorganismus darzustellen. Zum Beispiel soll PolySia an der Oberfläche von Bakterien der neuroinvasiven Gattung *Neisseria* als Maskierung dienen und somit die Erkennung durch das Immunsystem verringern (Adlam et al. 1987, Sato und Kitajima 2013, Vimr et al. 2004). In Seeigeln und Lachsfischen konnte PolySia vermehrt an reproduktiven Organen wie beispielsweise Eiern oder Spermien festgestellt werden (Sato und Kitajima 2013). Interessanterweise konnte ebenfalls auf humanen Spermien PolySia entweder an NCAM oder ST8Siall gekoppelt identifiziert werden (Simon et al. 2013).

In Vertebraten ist polysialyliertes NCAM häufig in sich entwickelnden Organen zu finden vor allem aber im Gehirn (Sato und Kitajima 2013, Galuska, Lütteke, und Galuska 2017). Dies lässt sich gut mittels der Expression der beiden $\alpha 2,8$ -Polysialyltransferasen im Gehirn von Mäusen nachvollziehen. Diese steigt deutlich an Embryonaltag 11 und verringert sich ca. ab dem 8. Tag nach der Geburt wieder. In Abhängigkeit zur Expression der beiden Polysialyltransferasen steigt bzw. sinkt dann der Polysialylierungsgrad von NCAM (Schnaar, Gerardy-Schahn, und Hildebrandt 2014, Oltmann-Norden et al. 2008, Schiff et al. 2009). Dabei wird angenommen, dass die meisten Nervenzellen irgendwann in ihrer Entwicklung PolySia bilden (Schnaar, Gerardy-Schahn, und Hildebrandt 2014, Bonfanti 2006). Wie bereits angedeutet ist polysialyliertes NCAM nicht nur im Gehirn zu finden, sondern vermutlich auch an der Entwicklung von Herz, Nieren, Testis, Epididymis, Placenta, Bauchspeicheldrüse und dem Respirationstrakt beteiligt (Galuska, Lütteke, und Galuska 2017, Simon et al. 2013, Thiery et al. 1982, Lackie, Zuber, und Roth 1994, 1991, Lackie, Zuber, und Roth 1990, Simon et al. 2015). Zusammenfassend lässt sich polysialyliertes NCAM vor allem während der Embryonalentwicklung im gesamten Organismus finden. Später wird es im Gehirn von Erwachsenen primär in Regionen mit hoher Plastizität wie beispielsweise dem Hippocampus oder Bulbus olfactorius gebildet (Kiselyov 2010, Seki und Arai 1993, Rothbard et al. 1982, Chuong und Edelman 1984).

Auch einige der anderen PolySia-Trägerproteine sind im Gehirn lokalisiert. Allerdings finden sich einige der Proteine unter anderem auch auf Immunzellen wie Neuropilin-2

und CCR7 (C-C-Chemokinrezeptor Typ 7) auf dendritischen Zellen oder E-Selectin Ligand-1 auf Makrophagen (Kiermaier et al. 2016, Werneburg et al. 2016, Curreli et al. 2007). Interessanterweise scheint PolySia-NCAM ebenfalls auf natürlichen Killerzellen vorzukommen (Drake et al. 2008).

Zudem soll es möglich sein, dass PolySia gebunden an das Thrombozytenglykoprotein 4 (CD36), einem Protein, welches normalerweise an der Oberfläche von Thrombozyten zu finden ist, in Milch von Mäusen und Menschen durch Brustepithelzellen sekretiert wird (Yabe et al. 2003, Mather 2000). Dies ist nicht das einzige Beispiel für PolySia-Trägerproteine die nicht an eine Membran gebunden vorkommen. Durch Ectodomain-Shedding (auch Abspaltung der Ektodomäne genannt) ist es möglich, PolySia-E-Selectin Ligand-1 und PolySia-Neuropilin-2 aus Mikroglia oder THP-1 Makrophagen freizusetzen (Werneburg et al. 2016). Ein ähnlicher Prozess wird für die Isoform PolySia-NCAM-140 aus Lungeneithelzellen beschrieben (Ulm et al. 2013).

1.2.4 Eigenschaften und Funktionen

Eine Besonderheit ist, dass PolySia im Gegensatz zu anderen Glykanstrukturen durch die beiden α 2,8-Polysialyltransferasen in Säugern nur an ein paar ganz spezifische Trägerproteine angeheftet wird (Tabelle 1) (Galuska, Lütteke, und Galuska 2017). Aufgrund dieser spezifischen Synthese scheint PolySia je nach Bedarf in der Lage zu sein, multifunktionalen Aufgaben in Organismen zu übernehmen. Ganz spezielle Eigenschaften helfen PolySia dabei bestimmte Funktionen ausführen. Zum einen fügt jede eingebaute Sialinsäure durch die Carboxylgruppen eine negative Ladung hinzu, wodurch man bei PolySia auch von einem polyanionischen Glykan sprechen kann (Schnaar, Gerardy-Schahn, und Hildebrandt 2014, Galuska, Lütteke, und Galuska 2017). Des Weiteren kann der Polymerisierungsgrad von PolySia sehr hoch sein. In den Gehirnen von Mäusen konnte beispielsweise eine Kettenlänge von über 90 Sialinsäureresten an NCAM detektiert werden (Galuska et al. 2008). Die Kettenlänge von PolySia ist aber je nach Gewebe und Bedarf sehr verschieden, so beträgt PolySia auf humanen Spermien oder durch Lungeneithelzellen gebildetes PolySia einen Polymerisationsgrad von über 40 Sialinsäuren (Sato und Kitajima 2013, Simon et al. 2013, Isomura, Kitajima, und Sato 2011, Ulm et al. 2013). Die Bedeutung der Kettenlänge wird besonders bei der Untersuchung der mutierten Polysialyltransferase vom Typ ST8Sia II aus Schizophrenie Patienten klar, die unter anderem verkürzte PolySia-Ketten synthetisieren (Isomura, Kitajima, und Sato 2011). Als Letztes hat PolySia aufgrund der rotierbaren Sialinsäure-Bindungen je nach Länge einen hohen Freiheitsgrad und kann entsprechend unterschiedliche Strukturen einnehmen (Sato und

Kitajima 2013). Gut erkennbar ist dieser Freiheitsgrad an der Interaktion von PolySia mit anderen Proteinstrukturen. Eine davon ist die Endo-N-Acetylneuraminidase (EndoN) aus Bakteriophagen, die in der Lage ist, PolySia zu schneiden. Ein anderes Beispiel sind die Histoneoktamere, in dessen Furchen sich anstatt von DNA auch PolySia anlagern kann. Normalerweise scheint PolySia in einer Helikalen-Struktur vorzukommen bei Proteinbindung scheint es PolySia möglich zu sein, seine Passform weitestgehend an die jeweiligen Proteinbindestellen anzupassen (Schnaar, Gerardy-Schahn, und Hildebrandt 2014, Galuska, Dambon, et al. 2017, Schulz et al. 2010, Yamasaki und Bacon 1991).

Wie sich alle diese Eigenschaften auf die Funktion von PolySia auswirken, lässt sich gut an Beispielen zu NCAM im Säugergehirn darstellen. NCAM wird nicht immer durch PolySia posttranslational modifiziert. Ist NCAM ohne PolySia auf der Zelloberfläche, interagiert es unter anderem mit benachbarten NCAM-Proteinen auf anderen Zellen oder mit Proteoglykanen der extrazellulären Matrix. Dadurch sorgt es z. B. für stabile Interaktionen mit den umliegenden Zellen und Geweben. PolySia dient dabei als Negativ-Regulator von Zellinteraktionen. Wird NCAM mit PolySia modifiziert gebildet, kann diese Interaktion mit anderen Zellen nicht eingegangen werden bzw. kann gelöst werden (Schnaar, Gerardy-Schahn, und Hildebrandt 2014, Rutishauser et al. 1985, Rutishauser et al. 1988). Die langen flexiblen Ketten bilden dabei ein Art Schild um NCAM. Dies geschieht, indem die negative Ladung an den Carboxylgruppen von PolySia besonders viel Wasser binden. Diese Hydratation von PolySia-NCAM nimmt ein großes Volumen ein, das durch die Länge und den Freiheitsgrad von PolySia noch erhöht wird (Rutishauser 2008, Schnaar, Gerardy-Schahn, und Hildebrandt 2014). Mehrere PolySia-Ketten an einem Protein bewirken zusätzliche repulsive Wechselwirkung und verstärken dadurch den beschriebenen Effekt (Schnaar, Gerardy-Schahn, und Hildebrandt 2014, Sapon et al. 2018).

Zusätzlich ist es möglich, dass die Bindung von PolySia an NCAM andere Interaktionen mit unterschiedlichen Proteinen und Rezeptoren beeinflusst. Darunter fällt z. B. die Erkennung durch den Fibroblastenwachstumsfaktor-Rezeptor (FGF-R). Bei einer Bindung von PolySia an diesen Rezeptor kann dessen Signaltransduktion unterbrochen werden (Kiselyov 2010, Kiselyov et al. 2003, Williams et al. 1994). Natürlich ist es PolySia auch möglich, eigenständige Interaktionen beispielsweise mit dem extrazellulären Histon H1 oder dem Wachstumsfaktor BDNF (Brain-derived neurotrophic factor) einzugehen (Janas und Janas 2011, Mishra et al. 2010). BDNF ist ein Neurotrophin und sorgt bei Bindung an den p75 Neurotrophin Rezeptor unter anderem für das Wachstum und die Entwicklung unreifer Neuronen als auch das Überleben von ausgewachsenen Neuronen. Es wird vermutet, dass BDNF durch die Bindung an

PolySia angereichert und gespeichert wird, um danach leichter von den höher affinen Rezeptoren erkannt zu werden (Sato und Kitajima 2013, Ono et al. 2012). Diese Bindungspartner zeigen, dass sich die Funktionen von NCAM grundlegend verändern können, je nachdem, ob es mit oder ohne PolySia gebildet wird. Dadurch ist es PolySia-NCAM möglich, viele Prozesse im Nervensystem zu beeinflussen. Darunter sind unter anderem Zellmigration, neuronale Plastizität, Wachstum von Axonen und Neurogenese, so wie die Aktivierung neuronaler Reparaturmechanismen (Bonfanti 2006, Janas und Janas 2011, Rutishauser et al. 1988). In Mäusen mit veränderter PolySia wirken sich diese Prozesse übergeordnet vermutlich auch auf die Lern- und Gedächtnisfähigkeiten als auch den circadianen Rhythmus und das Sozialverhalten aus (Sato und Kitajima 2015, Rutishauser 2008). PolySia negative Mäuse, bei denen beide Polysialyltransferasen ausgeschaltet sind, überleben hingegen maximal 8 Wochen und haben ein reduziertes Gewicht im Vergleich zu Mäusen mit jeweils nur einem defekten Allel (Weinhold et al. 2005, Angata et al. 2007, Sato und Kitajima 2013).

Weitere Untersuchungen an Mausmutanten, denen die ST8Sia IV fehlte, ergaben, dass CCR7 ein weiteres Trägerprotein von PolySia ist, welches auf dendritischen Zellen zu finden ist. Dabei stellte man zuerst eine verringerte Zelldichte in den sekundären lymphatischen Organen fest. Diese beruhte darauf, dass CCR7 nur mit der Modifikation durch PolySia seinen Liganden CCL21 binden kann (Kiermaier et al. 2016). CCL21 wird durch Zellen in die sekundären lymphatischen Organe ausgeschüttet und dient normalerweise zur chemotaktischen Wanderung der dendritischen Zellen in die sekundären lymphatischen Organe (Förster, Davalos-Miszlitz, und Rot 2008). In ST8Sia IV-Mutanten Mäusen wird diese Wanderung inhibiert, was unter anderem zu einer verringerten Reaktion auf inflammatorische Signale führt (Kiermaier et al. 2016). Interessanterweise kommt auch polysialyliertes Neuropilin-2 auf dendritischen Zellen vor und scheint ebenfalls Einfluss auf die Zellmigration mittels CCL21 zu haben (Rey-Gallardo et al. 2011, Curreli et al. 2007). Wird PolySia von dendritischen Zellen mittels EndoN entfernt, werden mehr T-Zellen aktiviert (Curreli et al. 2007).

PolySia ist aber nicht nur in der Lage das Immunsystem zu beeinflussen, indem es die Migration von Zellen beeinflusst. Eine weitere Regulationsmöglichkeit, stellt die bereits erwähnte Freisetzung von polysialyliertem E-Selectin Ligand-1 und Neuropilin-2 aus dem Golgi-Apparat von Mikroglia und THP-1 Makrophagen dar (Werneburg et al. 2016). Beide polysialylierten Proteine kommen im Golgi-Apparat der Zellen vor und werden nach Stimulation eines pro-inflammatorischen Reizes mittels LPS an die Zelloberfläche transportiert. Metalloproteasen schneiden dabei vermutlich die auf der Zelloberfläche assoziierten und polysialylierten Domänen der Proteine ab. Danach kommt es durch das freigesetzte PolySia zu einem negativen Feedback-Mechanismus, der die

pro-inflammatorische Reaktion verringert (Werneburg et al. 2016). Ein ähnlicher Mechanismus, der unter anderem ebenfalls durch LPS ausgelöst werden kann, ist in Lungenepithelzellen beschrieben worden. Hierbei wird die polysialylierte Isoform NCAM-140 mittels Metalloproteasen abgeschnitten. Dadurch kann die verkürzte Isoform NCAM-110 extrazellulär freigesetzt werden (Ulm et al. 2013). Der positive Effekt dieser Freisetzung könnte ein Schutz vor zytotoxischen extrazellulären Histonkomplexen oder Nukleosomen darstellen, die unter anderem von neutrophilen Granulozyten unter pro-inflammatorischen Bedingungen freigesetzt werden können (Ulm et al. 2013, Villanueva et al. 2011).

Das synaptische Zelladhäsionsprotein (SynCAM1) ist ein weiteres Protein, das im Gehirn von postnatalen Mäusen gebildet wird und mit PolySia modifiziert ist (Galuska et al. 2010). SynCAM1 gehört zur gleichen Immunglobulin-Superfamilie wie NCAM. Es besitzt ähnliche adhäsive Eigenschaften zu benachbarten SynCAM1 Molekülen, die bei polysialylierten-SynCAM1 ebenfalls durch repulsive Wechselwirkung ersetzt werden können. Es wird in Oligodendrozyten-Vorläuferzellen (auch NG2-Gliazellen) gebildet (Galuska et al. 2010, Mühlhoff et al. 2013). Diese Zellen können sich zu myelinisierenden Oligodendrozyten, Astrozyten oder Neuronen entwickeln (Giza und Biederer 2010, Zhu, Bergles, und Nishiyama 2008, Belachew et al. 2003). Interessanterweise scheint polysialylierten SynCAM1 wie auch polysialyliertes Neuropillin oder E-Selectin Ligand-1 in (Subpopulation) diesen Zellen im Golgi-Apparat gelagert zu werden. Durch Depolarisation dieser Zellen ist es möglich, dass PolySia-SynCAM1 zuerst an die Zelloberfläche transportiert wird. Später ist es dann nicht mehr detektierbar. Wodurch PolySia von der Zelloberfläche verschwindet, ist nicht bekannt (Werneburg et al. 2016, Werneburg et al. 2015). Generell scheint PolySia aber durch unterschiedliche Reize aus dem Golgi-Apparat an die Zelloberfläche befördert werden zu können. Zusammengefasst sprechen die wenigen Trägerproteine als auch die zuvor erwähnte spezifische Bildung und Freisetzung von PolySia für eine hohe Funktionsspezifität und exakte Verwendungsziele, die vermutlich durch die beiden Polysialyltransferasen reguliert werden.

Neben den vielen Organismus unterstützenden Fähigkeiten von PolySia können es einige Bakterien wie bereits erwähnt nutzen, um sich vor dem Immunsystem zu schützen. Dazu kommt noch, dass auch in vielen Metastasen bildenden Krebsarten und neuronalen Krankheiten, PolySia fehlreguliert vorkommt (Ting Zhang 2014, Sato und Kitajima 2013).

Tabelle 1: Übersicht der PolySia-Trägerproteine. Aufgelistet sind alle Proteine inklusive Abkürzungen und die entsprechenden Veröffentlichungen sortiert nach Jahreszahl ihrer Entdeckung. Zusätzlich wird dargestellt, wie hoch der Anteil an PolySia-Trägerproteinen ist, der einen Einfluss auf das Immunsystem hat und als Zelloberflächenprotein bekannt ist. Zur besseren Nachverfolgbarkeit sind die Proteinamen in Englisch aufgeführt. Modifiziert aus (Galuska, Lütteke, und Galuska 2017).

	<u>Trägerproteine</u>	<u>Entdeckung</u>	<u>Einfluss auf das Immunsystem</u>	<u>Zelloberflächenprotein</u>
1	Neural cell-adhesion molecule (NCAM auch CD56)	(Finne 1982, Finne et al. 1983)	x	x
2	Sodium channel α -subunit	(Zuber et al. 1992)	-	x
3	Platelet glycoprotein 4 (CD36)	(Yabe et al. 2003)	vielleicht	x
4	Neuropilin-2 (NRP2)	(Curreli et al. 2007)	x	x
5	Synaptic cell adhesion molecule (SynCAM1)	(Galuska et al. 2010)	(x)	x
6	α -2,8-sialyltransferase 8B (ST8Siall)	(Simon et al. 2013)	x	(x)
7	E-selectin ligand-1 (ESL-1)	(Werneburg et al. 2016)	x	x
8	Central chemokine receptor 7 (CCR7)	(Kiermaier et al. 2016)	x	x

1.3 Neutrophile Granulozyten und neutrophile extrazelluläre Fallen

1.3.1 Neutrophile Granulozyten

Neutrophile Granulozyten, häufig auch nur Neutrophile genannt, sind Zellen der Immunabwehr, die sich aus Stammzellen im Knochenmark entwickeln und ausdifferenziert im Blutkreislauf von Vertebraten zirkulieren (Kruger et al. 2015, Leiding 2017). Neben Monozyten, eosinophilen und basophilen Granulozyten stammen

Neutrophile von myeloischen Vorläuferzellen ab (Branzk und Papayannopoulos 2013). Im Blut machen Neutrophile bis zu 70 % der Leukozyten aus und sind damit die häufigsten weißen Blutzellen. Neutrophile überleben dabei meist nur einen kurzen Zeitraum von durchschnittlich 5,4 Tagen (Pillay et al. 2010, Nissen 2019).

Angelockt und aktiviert von Zytokinen und anderen Chemoattraktoren migrieren sie meist als erste Zellen an Infektionsherde im ganzen Organismus und gehören somit zur angeborenen Immunantwort (Nissen 2019, Keller und Sorkin 1968, Branzk und Papayannopoulos 2013). Dabei besitzen sie einige nützliche Eigenschaften und Funktionen im Kampf gegen Pathogene. Neutrophile haben einen polymorphkernigen Nukleus mit 3-5 lappenförmigen Segmenten, der vermutlich benötigt wird, um besser durch enge Zellzwischenräume wandern zu können (Abb. 5) (Skinner und Johnson 2017). Die Proteinexpression ist in ausdifferenzierten Neutrophilen sehr gering. Aus diesem Grund besitzen Neutrophile eine Vielzahl von Vesikeln, die Granula genannt werden und mit über 700 unterschiedlichen, vor allem antimikrobiellen Proteinen gefüllt sind (Kruger et al. 2015, Rørvig et al. 2013). Man kann die Granula nach ihrem Inhalt in mindestens vier Typen einteilen. Primäre oder azurophile Granula enthalten unter anderem viele proteolytische Enzyme wie Myeloperoxidase (MPO), neutrophile Elastase, Lysozym, Hydrolasen, Serinproteasen und Defensine. Sekundäre oder spezifische Granula kommen nur in Neutrophilen vor und enthalten vor allem antimikrobielle Komponenten wie Lactoferrin und Lysozym. Tertiäre oder auch gelatinase Granula enthalten, wie der Name schon sagt, vor allem die Metalloprotease Gelatinase. Als Letztes werden noch sekretorische Vesikel beschrieben, die hauptsächlich für die Lagerung von Membranen-Rezeptoren und Zytokinen verantwortlich sind (Faurischou und Borregaard 2003, Branzk und Papayannopoulos 2013, Borregaard, Sørensen, und Theilgaard-Mönch 2007). Durch diese gute Vorbereitung haben Neutrophile relativ schnell die Möglichkeit, mittels unterschiedlicher Mechanismen Pathogene zu bekämpfen (Borregaard, Sørensen, und Theilgaard-Mönch 2007). Sie sind z. B. in der Lage, Mikroorganismen zu phagozytieren. Dabei werden die Mikroorganismen durch Einstülpung der Membranen verschlungen und es bildet sich ein Phagosom. Dieses wird danach vor allem mit primären und sekundären Granula fusioniert, wodurch es möglich ist, die aufgenommenen Zellen zu lysieren (Kruger et al. 2015, Brinkmann und Zychlinsky 2007). Aufgrund dieser Fähigkeit werden Neutrophile auch zu den Phagozyten gezählt. Zusätzlich können Neutrophile ihre Granula und damit alle antimikrobiellen Proteine und Enzyme freisetzen, um direkt gegen Pathogene zu wirken. Dieser Prozess wird auch Degranulation genannt (Brinkmann und Zychlinsky 2007, Borregaard, Sørensen, und Theilgaard-Mönch 2007). Einen weiteren Abwehrmechanismus stellt die Produktion und Freisetzung von reaktiven

Sauerstoffspezies (ROS) dar. Verantwortlich dafür ist im ersten Schritt die Etablierung des membranständigen NADPH Oxidase-Komplexes, der molekularen Sauerstoff zu Hydroperoxid-Anionen umwandelt. Durch weitere Umsetzung mittels Enzymen wie der Superoxid-Dismutase und der Myeloperoxidase entstehen weitere sehr reaktive und kurzlebige Sauerstoffspezies. Diese können z. B. Proteine, Nukleinsäuren und andere Moleküle durch Oxidation schädigen (Winterbourn, Kettle, und Hampton 2016, Brinkmann und Zychlinsky 2007). Als vierten und letzten Mechanismus können Neutrophile einen sogenannten „Suizid“ begehen, der zur Freisetzung von neutrophilen extrazellulären Fallen (NET) führt. Dabei werden einige der vorher beschriebenen Fähigkeiten kombiniert, um ein Netz aus dekondensierter DNA gespickt mit antimikrobiellen Proteinen freizusetzen (Abb. 6), das Mikroorganismen und Pathogene immobilisiert und attackiert (Brinkmann et al. 2004, Brinkmann 2018) (Dieser Prozess soll im folgenden Kapitel 1.3.2 weiter beleuchtet werden). Welcher dieser Abwehrmechanismen aktiviert wird muss jedoch extrem gut reguliert werden, weshalb auch genetische Defekte und fehlregulierte Neutrophile sich in Krankheiten wie Infektionen, unterschiedliche Neutropenien, septische Granulomatose, dem Leukozytenadhäsionsdefekt, dem Mangel an spezifischen Granula oder dem WHIM-Syndrom ausprägen können (Kruger et al. 2015, Leiding 2017).

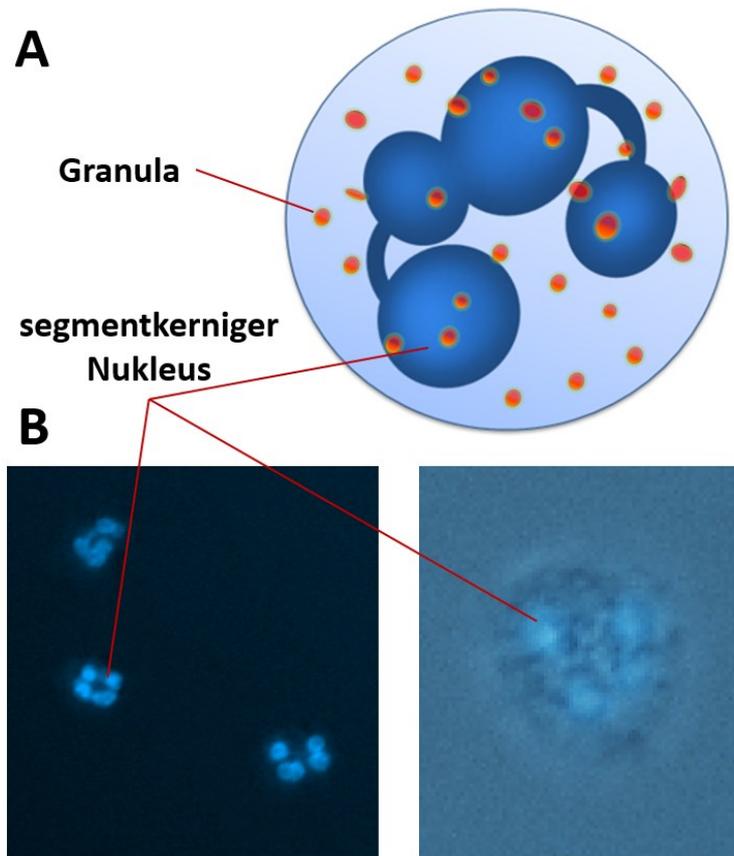


Abbildung 5: Aufbau von neutrophilen Granulozyten. Schematischer Aufbau eines Granulozyten (A) mit segmentiertem Zellkern und Granular (Vesikeln). Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von neutrophilen Granulozyten (B). Anfärbung der Kernstruktur mittels Hoechst (links) und Darstellung der Zelldimensionen und der Kernstrukturen mittels Hoechst und Durchlicht (rechts). Modifiziert aus (Kühnle, Lütteke, et al. 2019) CC BY 4.0.

1.3.2 Neutrophile extrazelluläre Fallen

Die zelluläre Ausschüttung eines klebrigen Netzwerkes aus langen DNA-Fasern und antimikrobiellen Proteinen wurde zuerst durch Brinkmann et. al. 2004 beschrieben (Brinkmann et al. 2004). Dabei scheint die Freisetzung von neutrophilen extrazellulären Fallen aus neutrophilen Granulozyten eine generelle Fähigkeit des angeborenen Immunsystems von Vertebraten zu sein und kommt beispielsweise bei Menschen, Pferden, Mäusen, Kühen oder Fischen vor. Interessanterweise gilt die NETose jedoch ebenfalls als Modulator der adaptiven Immunantwort (Brinkmann und Zychlinsky 2007, Hasler, Giaglis, und Hahn 2016). Induziert wird die Freisetzung zumeist von den Organismen, gegen die diese Netze gerichtet sind. Darunter fallen Bakterien, Pilze, Viren, und Parasiten (Branzk und Papayannopoulos 2013). Aber auch viele andere

Substanzen wie Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA), körpereigene Zytokine oder Fremdzellen wie Spermien im weiblichen Reproduktionstrakt können zur Induktion von NETose führen (Brinkmann et al. 2004, Branzk und Papayannopoulos 2013, Alghamdi und Foster 2005, de Buhr und von Köckritz-Blickwede 2016).

NETose stellt ein aktives, vorteilhaftes Zellsuizid-Programm dar, welches sich klar von anderen Prozessen wie Nekrose oder Apoptose abgrenzen lässt (Fuchs et al. 2007, Goldmann und Medina 2013). Der rezeptorunabhängige Mechanismus der NETose, vermittelt durch PMA, soll im folgendem übersichtlich beschrieben werden (Brinkmann 2018). Generell wird NET jedoch über unterschiedliche, sich kreuzende Mechanismen und Wege ausgeschüttet (Kenny et al. 2017, Goldmann und Medina 2013). Neutrophile sind im ersten Schritt in der Lage, PMA über die Protein-Kinase C zu binden. Es kommt unter anderem zur Ca Freisetzung und zur Aktivierung der NADPH Oxidase die daraufhin mit der Produktion von ROS beginnt (Goldmann und Medina 2013, Brinkmann 2018, Fuchs et al. 2007). Durch diese ROS Produktion ist es möglich, mittels der MPO, neutrophile Elastase aus einem Membranen-ständigen Komplex der azurophilen Granula herauszulösen. Die neutrophile Elastase wandert daraufhin in den Zellkern und die DNA im Nukleus wird dekondensiert (Papayannopoulos et al. 2010, Metzler et al. 2014, Parker et al. 2012). Parallel kommt es im Zytoplasma zur Autophagie und zur Vakuolisierung der Granula (Remijnsen et al. 2011). Zusätzlich sorgt das zytoplasmatische Ca für die Aktivierung der Protein-Arginine Deiminase 4 (PAD4). Diese wandert ebenfalls in den Zellkern und beginnt mit der Citrullinierung der Histon-assoziierte Aminosäure Arginin. Infolge dessen kommt es zur verstärkten Dekondensierung der DNA-Fasern (Wang et al. 2009, Neeli, Khan, und Radic 2008, Neeli et al. 2009). Anschließend kommt es einerseits zum Zerfall der Kernmembranen und andererseits zur Freisetzung der Granula Proteine ins Zytoplasma. Letztendlich werden die antimikrobiellen Proteine mit der DNA gemischt. Daraufhin kommt es zur Ruptur der Plasmamembranen und zur Freisetzung von NET (vergleiche z. B. Abb. 9 oder Publikation 1 Abbildung 7) (Fuchs et al. 2007, Goldmann und Medina 2013, Brinkmann 2018). Die Volumenexpansion von NET kann um das 10 bis 15-Fache größer sein als das ursprüngliche Zellvolumen (vergleiche Maßstäbe der Abb. 6 und 7 B) (Brinkmann und Zychlinsky 2012).

Der Mechanismus zur Ausschüttung von NET kann je nach Art und Menge der Induktionsquelle von einigen Minuten bis zu einigen Stunden dauern (Okubo et al. 2016, Parker et al. 2012, Brinkmann et al. 2004). Bei der Induktion mittels PMA wird jedoch von einer Zeit von etwa 2-4 Stunden ausgegangen (Fuchs et al. 2007, Brinkmann 2018, Branzk und Papayannopoulos 2013). Der Vollständigkeit halber ist zu erwähnen, dass eine schnellere Freisetzung von NET (5-60 min), beispielsweise durch das Bakterium

Staphylococcus aureus, ausgelöst werden kann. Dabei wird nur ein kleiner Teil der DNA ausgeschüttet (Pilszczek et al. 2010, Branzk und Papayannopoulos 2013, Phillipson und Kubes 2011). Außerdem sind Prozesse bekannt, bei denen die Zellen erhalten bleiben und nur mitochondriale DNA ausgeschüttet wird (Phillipson und Kubes 2011, Yousefi et al. 2009). Eosinophile, Mastzellen und Makrophagen können einen ähnlichen Prozess, der „ETose“ genannt wird, durchführen (Branzk und Papayannopoulos 2013). Von einigen Bakterien ist bereits bekannt, dass sie wirkungsvolle Mechanismen gegen NET entwickelt haben. Einer der einfachsten dürfte die Freisetzung von DNasen sein, um sich aus dem klebrigen DNA-Fasern zu befreien (Brinkmann und Zychlinsky 2007, 2012).

Die Hauptkomponenten von NET stellen DNA und Histone dar. Die Histone liegen in NET teilweise dekondensiert und citrulliniert vor. Diese frei zugänglichen Histone werden zu den zytotoxischen Komponenten von NET gezählt (Saffarzadeh et al. 2012, Brinkmann et al. 2004). Daneben kommen interessanterweise vor allem Proteine der vier beschriebenen Granulatypen vor, jedoch kaum zytoplasmatische Proteine (Brinkmann et al. 2004). Einige weitere Hauptkomponenten von NET sind die MPO, sowie die Serinproteasen: neutrophile Elastase, Proteinase 3 und Cathepsin G. Zusätzlich kommen antimikrobielle Komponenten wie Lactoferrin, Lysozym, α -Defensine, Azurocidin, Calprotectin und bakterien-permeabilisierendes Protein vor (Nel et al. 2016, Brinkmann et al. 2004).

Zusammengefasst zeigt sich besonders, dass die Regulation von NET von hoher Bedeutung ist (Amulic und Hayes 2011, Brinkmann 2018). Einerseits die vielen Induktionsmöglichkeiten und intrazellulären Reaktionswege, andererseits die enorme Menge an Proteinen, Peptiden und DNA, die freigesetzt wird und potenziell auf andere Prozesse unter anderem andere Immunzellen im Organismus wirken können (Brinkmann et al. 2004, Hasler, Giaglis, und Hahn 2016). Beides macht die NETose zu einem hoch komplexen Prozess, der den direkten Vorteil bietet, dass viele Pathogene immobilisiert und abtötet werden. Die NETose und ihre Mechanismen haben allerdings auch einige Nachteile. Diese häufig auch „dunkle Seite von NET“ genannten Nachteile bestehen vor allem aus der möglichen Ausprägung oder Verstärkung von Autoimmunkrankheiten wie systemischer Lupus erythematoses oder Gicht, von Unfruchtbarkeit, von Lungenkrankheiten wie zystische Fibrose oder chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD), von septischen Entzündungsreaktionen und von Herz-Kreislauf-Erkrankungen z. B. Thrombosen (Amulic und Hayes 2011, Brinkmann und Zychlinsky 2007, 2012, Brinkmann 2018, Hahn et al. 2012, Kaplan und Radic 2012, Hasler, Giaglis, und Hahn 2016, Nel et al. 2016, Ulm et al. 2013, Brinkmann et al. 2004). Aus diesem Grund ist ein Anliegen der aktuellen Wissenschaft mehr über NET zu

erfahren, als auch Faktoren zu finden, die Einfluss auf NET haben oder es komplett inhibieren können (Brinkmann 2018, Nel et al. 2016).

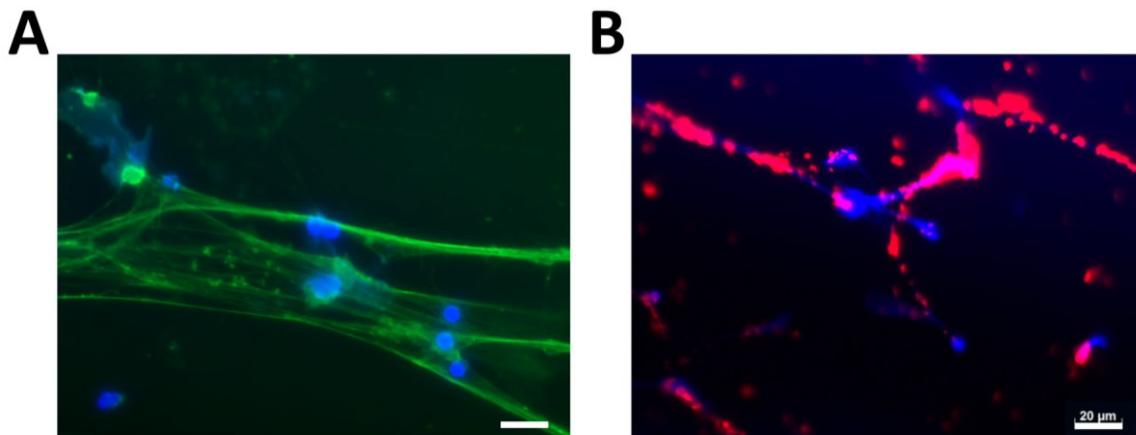


Abbildung 6: Mikroskopische Aufnahmen durch neutrophile Granulozyten freigesetzter NET-Fasern. Darstellung der NET-Fasern mittels DNA in blau, Lactoferrin in grün (A) und polysialylierten rot fluoreszierende Beads (B). Maßstabes jeweils 20 µm. (A) Eigene Aufnahme. (B) Modifiziert aus (Kühnle, Lütteke, et al. 2019) CC BY 4.0.

1.4 Basis und Überschneidungspunkte von Lactoferrin, PolySia und NET

Als Übersicht mit Beginn dieser Arbeit waren bereits folgende wissenschaftliche Publikationen und Daten bekannt, die Einfluss auf die Forschung dieser Arbeit hatten.

1.4.1 Lactoferrin und NET

Okubo et. al. 2016 konnte zeigen, dass exogenes Lactoferrin allein die Freisetzung von NET-Fasern aus Neutrophilen inhibiert (Abb. 7 B) (Okubo et al. 2016). Dabei konnte die Gruppe nachweisen, dass die zu Beginn ablaufenden Signalkaskaden der NETose nicht beeinflusst wurden. Darunter fallen beispielsweise die Produktion von ROS, die Histone H3 Citrullinierung mittels PAD4 oder die Histondegradation, vermittelt durch die neutrophile Elastase. Stattdessen konnte gezeigt werden, dass Lactoferrin eine Art Schild um Neutrophile bildet, der die Freisetzung von NET durch die Instandhaltung der Zellmembranen inhibiert. Dadurch bestand ein klarer Zusammenhang zwischen der NET-Inhibition und Lactoferrin.

Interessanterweise vermutete die Gruppe ebenfalls eine Interaktion von Lactoferrin mit der bereits freigesetzten NET-DNA über Ladungswechselwirkungen mit der Lactoferricin-Domäne (Okubo et al. 2016).

1.4.2 PolySia, NET und Histone

Histone sind eine der toxischsten Komponenten der NETose und liegen in NET-Fasern teilweise dekomponiert vor. Dadurch sind Histone nicht nur zytotoxisch für bakterielle Zellen, sondern auch für endogene Zellen und stehen deshalb besonders unter dem Verdacht, viele der mit NET im Zusammenhang stehenden Krankheiten zu beeinflussen (Ulm et al. 2013, Saffarzadeh et al. 2012). PolySia ist es allerdings möglich, Histone zu binden und deren zytotoxische Eigenschaften zu neutralisieren (Saffarzadeh et al. 2012, Zlatina, Lütteke, und Galuska 2017). Dabei binden die Zuckerketten auch Bereiche der Histone, die für die Interaktion mit der DNA verantwortlich sind (Abb. 7 A) (Ulm et al. 2013, Saffarzadeh et al. 2012, Galuska, Dambon, et al. 2017, Zlatina et al. 2018). Die potenzielle biologische Bedeutung der PolySia-abhängigen Inaktivierung der zytotoxischen Wirkung von Histonen aus NET wurde bereits in Zusammenhang mehrerer physiologischer und pathologischer Prozesse diskutiert (Ulm et al. 2013, Simon et al. 2015, Zlatina et al. 2018). Ein Beispiel hierfür ist die Protektion von Spermien nach der Kopulation, wobei es zur Rekrutierung von Neutrophilen kommt. Die Bildung von NET könnte die Fertilität negativ beeinflussen, indem zu viele Spermien nach der Paarung im DNA-Netzwerk gefangen und abgetötet werden (Hahn et al. 2012). Es wird jedoch angenommen, dass die im Ejakulat nachgewiesenen DNasen für die Freisetzung der Spermien und die auf Spermien frei vorkommenden PolySia für die Protektion gegen extrazelluläre Histone sorgen. Da solche funktionellen Nachbarschaften aus NET und PolySia auch im Zusammenhang mit anderen inflammatorischen Prozessen stehen, wurden bereits Strategien erdacht, um polysialylierte Nanopartikel oder Muzine als zytoprotektive Makromoleküle gegen extrazelluläre Histone einzusetzen (Galuska, Galuska, et al. 2017, Zlatina und Galuska 2019, Galuska, Dambon, et al. 2017, Zlatina, Lütteke, und Galuska 2017, Zlatina et al. 2018).

1.4.3 Lactoferrin und PolySia

Sowohl Lactoferrin als auch PolySia kommen in zahlreichen Körperflüssigkeiten vor und sind beide in inflammatorische Prozesse wie die NETose involviert. Der erste Zusammenhang zwischen Lactoferrin und PolySia kam jedoch erst dadurch zustande, dass nach der Isolierung von PolySia aus Milch, Blut und Ejakulaten auch Lactoferrin im Präzipitat durch Rhea Veelken nachgewiesen wurde (Kühnle, Veelken, et al. 2019). Da Lactoferrin selbst keine PolySia-Ketten trägt, war eine mögliche Interaktion zwischen den Biomolekülen denkbar.

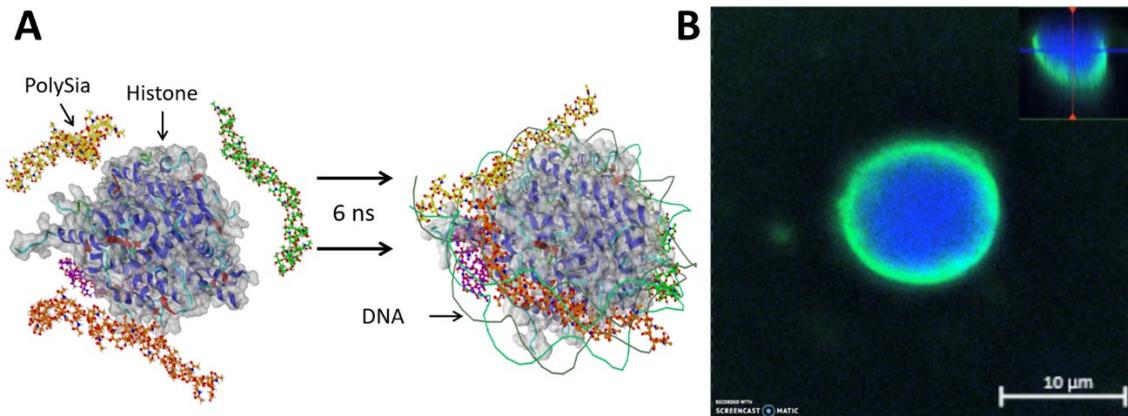


Abbildung 7: Überblick bekannter Fähigkeiten von PolySia und Lactoferrin. (A) Molekulardynamische Simulation von 4 PolySia-Ketten (mit je 20 Sialinsäurebausteinen) die nach 6 ns ein Histonoktamer binden. Die überlagerte DNA veranschaulicht, dass PolySia sehr ähnliche Regionen der Histone bindet. α -Helices sind in dunkelblau und β -Faltblätter sind in rot dargestellt. Die Raumforderung der Aminosäuren wird durch eine dynamische Oberflächenstruktur (grau) angedeutet. (B) Übersicht einer NET stimulierten Zelle nach Zugabe von Lactoferrin. Diese stellen eine Wiederholung und Bestätigung der Experimente nach Okobu et al. 2016 dar (Okubo et al. 2016). Einzelausschnitt eines Videostapels von einem neutrophilen Granulozyten nach der Induktion mit PMA und Behandlung mit Lactoferrin. Die Position des Bildes in der Zelle ist rechts oben (blaue Linie) als Querschnitt abgebildet. Die DNA (blau) ist über das ganze Zellinnere verteilt. Extrazelluläres Lactoferrin (grün) lagert sich an der Zelloberfläche an. Der Maßstab beträgt 10 μm . Modifiziert aus (Kühnle, Veelken, et al. 2019, Galuska, Dambon, et al. 2017) beide CC BY 4.0.

1.5 Zielsetzung

Aus den in Kapitel 1.4 beschriebenen Überschneidungspunkten zwischen NET, Lactoferrin und PolySia ergaben sich folgenden Fragestellungen, die innerhalb meiner Doktorarbeit bearbeitet wurden:

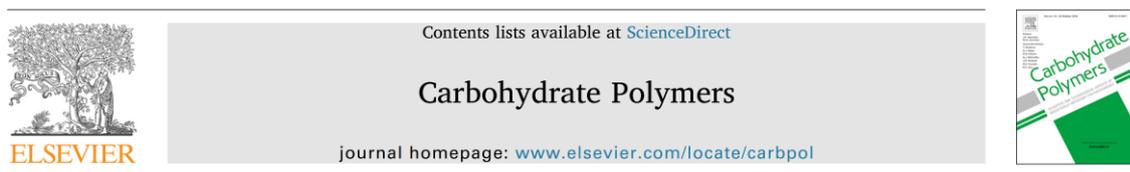
1. Können Lactoferrin und PolySia miteinander interagieren und wie sieht diese Interaktion im Detail aus?
2. Haben die Bereiche von Lactoferrin eine biologische Aktivität und wird diese durch die Interaktion beeinflusst?
3. Welchen Einfluss hat das Zusammenspiel zwischen Lactoferrin und PolySia auf die NETose sowie auf NET?

2. Übersicht der Publikationen

2.1 Zusammenfassung der ersten Publikation

„Polysialic acid interacts with lactoferrin and supports its activity to inhibit the release of neutrophil extracellular traps“

In der ersten Veröffentlichung wird die Interaktion von PolySia mit Lactoferrin in humaner Milch, Ejakulat und Blutserum nachgewiesen. Die nicht kovalente Bindung konnte daraufhin näher charakterisiert werden, indem der für die Bindung nötige Polymerisationsgrad von PolySia bestimmt und Lactoferricin als mögliches Bindungsmotiv identifiziert wurde. Als Letztes konnte gezeigt werden, dass PolySia die Eigenschaft von Lactoferrin, die NET-Freisetzung zu inhibieren, noch verstärken kann.



Polysialic acid interacts with lactoferrin and supports its activity to inhibit the release of neutrophil extracellular traps



Andrea Kühnle^{a,b,1}, Rhea Veelken^{b,c,1}, Christina E. Galuska^{a,b}, Max Saftenberger^b, Marieke Verleih^d, Hans-Christian Schuppe^e, Silvia Rudloff^f, Clemens Kunz^f, Sebastian P. Galuska^{a,b,*}

^a Institute of Reproductive Biology, Leibniz Institute for Farm Animal Biology (FBN), Wilhelm-Stahl-Allee 2, 18196 Dummerstorf, Germany

^b Institute of Biochemistry, Justus-Liebig-University, Friedrichstr. 24, 35392 Giessen, Germany

^c University Hospital Leipzig, Section of Hepatology, Clinic of Gastroenterology and Rheumatology, Liebigstr. 20, 04103 Leipzig, Germany

^d Institute of Genome Biology, Leibniz Institute for Farm Animal Biology (FBN), Wilhelm-Stahl-Allee 2, 18196 Dummerstorf, Germany

^e Department of Urology, Pediatric Urology, and Andrology, Faculty of Medicine, Justus Liebig University, 35392 Giessen, Germany

^f Institute of Nutritional Sciences, Justus-Liebig-University, Wilhelmstr. 20, 35392 Giessen, Germany

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.12.033>

Eigenanteil: Andrea Kühnle hat alle Experimente zur biochemischen Charakterisierung der Polysialinsäure/Lactoferrin-Interaktion durchgeführt. Hierzu gehörten die Interaktionsanalyse mittels nativer Gelelektrophorese, die sie methodisch aufgebaut, durchgeführt und ausgewertet hat (Abbildungen 2, 5 und 6; ergänzende Abbildung S3). Die ELISA-Experimente wurden ebenfalls von Andrea Kühnle entwickelt und durchgeführt (Abbildung 6). Zudem wurden alle Zellexperimente von Andrea Kühnle durchgeführt, methodisch durchdacht und ausgewertet (Abbildungen 7 und 8; ergänzende Abbildungen S4 und S5). Die Lebendzellmikroskopie-Experimente wurden von Andrea Kühnle in Zusammenarbeit mit Marieke Verleih durchgeführt (Abbildung 7; ergänzende Abbildung S4). Darüber hinaus hat Andrea Kühnle die grafischen

Darstellungen der analysierten Mechanismen entworfen (darunter auch Abbildungen 7, 8 und 9).

Rhea Veelken hat die Experimente zur Identifizierung der Interaktion zwischen PolySia und Lactoferrin durchgeführt (Abbildungen 1 und 4; ergänzende Abbildung S1 und S2). Die Kettenlängenanalysen (Abbildung 3) wurden von Dr. Max Saftenberger und Rhea Veelken in Zusammenarbeit mit Dr. Christina Galuska durchgeführt. Alle weiteren Autoren haben keine Experimente durchgeführt, sondern haben essenzielle Proben zur Verfügung gestellt und/oder waren bei der Konzeption der Versuche und Interpretation der Ergebnisse beteiligt.

Der Originalentwurf des Manuskripts, welcher abschließend von allen Autoren editiert wurde, ist von Andrea Kühnle und Dr. Sebastian P. Galuska verfasst worden.

2.2 Zusammenfassung der zweiten Publikation

„Polysialic Acid Modulates the Binding of External Lactoferrin in Neutrophil Extracellular Traps“

In der zweiten Veröffentlichung wurde die Interaktion von humanem Lactoferrin mit PolySia mittels einer Molekulardynamik-Simulation detaillierter untersucht. Durch native Gelelektrophorese konnte gezeigt werden, dass humanes und bovines Lactoferrin vergleichbar mit PolySia interagieren. Bei beiden Proteinen scheint dabei Lactoferrin die Hauptinteraktionsdomäne von PolySia zu sein. PolySia beeinflusst die Bindung von Lactoferrin an NET.



Article

Polysialic Acid Modulates the Binding of External Lactoferrin in Neutrophil Extracellular Traps

Andrea Kühnle ^{1,2}, Thomas Lütke ^{3,†} , Kim F. Bornhöfft ^{1,2} and Sebastian P. Galuska ^{1,2,*} 

¹ Institute of Reproductive Biology, Leibniz Institute for Farm Animal Biology (FBN), Wilhelm-Stahl-Allee 2, 18196 Dummerstorf, Germany; kuehnle@fbn-dummerstorf.de (A.K.); bornhoefft@fbn-dummerstorf.de (K.F.B.)

² Institute of Biochemistry, Faculty of Medicine, Justus-Liebig-University, Friedrichstr. 24, 35392 Giessen, Germany

³ Institute of Veterinary Physiology and Biochemistry, Justus-Liebig-University Giessen, Frankfurter Str. 100, 35392 Giessen, Germany; thomas@lueetteke-online.de

* Correspondence: galuska.sebastian@fbn-dummerstorf.de; Tel.: +49-38208-68-769

† Current Address: GIP Gesellschaft für innovative Personalwirtschaftssysteme mbH, Strahlenbergerstr. 112, 63067 Offenbach, Germany.

DOI: <https://doi.org/10.3390/biology8020020>

Eigenanteil: Bis auf die in Abbildung 1 und 2 (sowie den ergänzenden Abbildungen S1 bis S4) dargestellten Experimenten, die von Kim F. Bornhöfft und Dr. Thomas Lütke durchgeführt worden sind, wurden alle beschriebenen Versuche von Andrea Kühnle erarbeitet, durchgeführt und ausgewertet (Abbildungen 3 bis 6; ergänzende Abbildung S5).

Der Originalentwurf des Manuskripts, welcher abschließend von allen Autoren editiert wurde, ist von Andrea Kühnle und Dr. Sebastian P. Galuska verfasst worden.

2.3 Zusammenfassung der dritten Publikation

„The Bovine Antimicrobial Peptide Lactoferricin Interacts with Polysialic Acid without Loss of Its Antimicrobial Activity against *Escherichia coli*“

In der dritten Veröffentlichung wurde es möglich, durch die Fraktionierung von PolySia in spezifische DP von nur 1-2 Sialinsäurebausteinen unterschied, die nötige Bindungslänge zu bovinem Lactoferrin (DP 20-21) und Lactoferricin (DP 10-11) noch besser einzugrenzen. Außerdem wurde der Einfluss von PolySia auf Lactoferricins Fähigkeit untersucht, das Wachstum von *E. coli* zu inhibieren. Weder ein PolySia-Mix, kurz-kettige PolySia-Fraktionen noch lang-kettige Fraktionen hatte einen Einfluss auf die antimikrobiellen Eigenschaften von Lactoferricin gegen *E. coli*.



animals



Communication

The Bovine Antimicrobial Peptide Lactoferricin Interacts with Polysialic Acid without Loss of Its Antimicrobial Activity against *Escherichia coli*

Andrea Kühnle^{1,2}, **Christina E. Galuska**^{1,2}, **Kristina Zlatina**¹  and **Sebastian P. Galuska**^{1,2,*}

¹ Institute of Reproductive Biology, Leibniz Institute for Farm Animal Biology (FBN), Wilhelm-Stahl-Allee 2, 18196 Dummerstorf, Germany; kuehnle@fbn-dummerstorf.de (A.K.); Galuska.christina@fbn-dummerstorf.de (C.E.G.); Zlatina@fbn-dummerstorf.de (K.Z.)

² Institute of Biochemistry, Faculty of Medicine, Justus-Liebig-University, Friedrichstr. 24, 35392 Giessen, Germany

* Correspondence: galuska.sebastian@fbn-dummerstorf.de; Tel.: +49-38208-68-769

DOI: <https://doi.org/10.3390/an i10010001>

Eigenanteil: Andrea Kühnle hat alle dargestellten Experimente erarbeitet, durchgeführt und ausgewertet (alle Abbildungen). Bei den Bakterien-Assays wurde sie zu Beginn von Dr. Kristina Zlatina unterstützt und bei der Auswertung beraten. Die Kettenlängenfraktionierungen wurden teilweise von Dr. Christina E. Galuska durchgeführt.

Der Originalentwurf des Manuskripts, welcher abschließend von allen Autoren editiert wurde, ist von Andrea Kühnle und Dr. Sebastian P. Galuska verfasst worden.

3. Manuskripte

Carbohydrate Polymers 208 (2019) 32–41



Contents lists available at ScienceDirect

Carbohydrate Polymers

journal homepage: www.elsevier.com/locate/carbpol



Polysialic acid interacts with lactoferrin and supports its activity to inhibit the release of neutrophil extracellular traps



Andrea Kühnle^{a,b,1}, Rhea Veelken^{b,c,1}, Christina E. Galuska^{a,b}, Max Saftenberger^b, Marieke Verleih^d, Hans-Christian Schuppe^e, Silvia Rudloff^f, Clemens Kunz^f, Sebastian P. Galuska^{a,b,*}

^a Institute of Reproductive Biology, Leibniz Institute for Farm Animal Biology (FBN), Wilhelm-Stahl-Allee 2, 18196 Dummerstorf, Germany

^b Institute of Biochemistry, Justus-Liebig-University, Friedrichstr. 24, 35392 Giessen, Germany

^c University Hospital Leipzig, Section of Hepatology, Clinic of Gastroenterology and Rheumatology, Liebigstr. 20, 04103 Leipzig, Germany

^d Institute of Genome Biology, Leibniz Institute for Farm Animal Biology (FBN), Wilhelm-Stahl-Allee 2, 18196 Dummerstorf, Germany

^e Department of Urology, Pediatric Urology, and Andrology, Faculty of Medicine, Justus Liebig University, 35392 Giessen, Germany

^f Institute of Nutritional Sciences, Justus-Liebig-University, Wilhelmstr. 20, 35392 Giessen, Germany

ARTICLE INFO

Keywords:

Polysialic acid
Lactoferrin
Neutrophil extracellular trap
Innate immune system

ABSTRACT

Polysialic acid (polySia) is a linear carbohydrate polymer consisting of N-acetylneuraminic acid residues and is involved in several physiological processes. In the present study, we identified the multifunctional protein lactoferrin as a novel interaction partner for polySia. Lactoferrin co-precipitated when polySia was isolated from human blood, milk, and semen samples. The interaction between polySia and lactoferrin was verified using a native gel electrophoresis application, demonstrating that such interaction depends on the degree of polymerization. The interaction between the molecules could be inhibited by an antibody against lactoferrin (LFcin), which suggests that the LFcin domain of lactoferrin represents the potential binding area for sialic acid polymers. Because lactoferrin inhibits the formation of neutrophil extracellular traps (NETs), the potential impact of polySia on this function of lactoferrin was tested. Intriguingly, we observed that polySia increases the efficiency of lactoferrin to prevent the release of NET fibers. PolySia alone shows no activity. Therefore, together with lactoferrin, polySia may represent a natural regulatory system of NET release.

1. Introduction

Polysialic acid (polySia) is a negatively charged polysaccharide that can be generated by two polysialyltransferases (ST8SialII and ST8SialIV) on distinct proteins in mammals (Colley, Kitajima, & Sato, 2014; Harduin-Lepers et al., 2008). The best studied and main polySia carrier is the neural cell adhesion molecule (NCAM) (Colley, 2010; Colley et al., 2014; Hildebrandt, Mühlenhoff, & Gerardy-Schahn, 2010). Many studies have demonstrated that polySia is involved in the development of the brain and may also contribute to the formation of other organs, such as the liver, the heart, and the reproductive tract (reviewed in Galuska, Lutteke, & Galuska, 2017; Schnaar, Gerardy-Schahn, & Hildebrandt, 2014)). During organogenesis, polySia modulates several migration and differentiation processes on the cellular surface due to its anti-adhesive properties (Colley et al., 2014; Hildebrandt et al., 2010; Mühlenhoff, Rollenhagen, Werneburg, Gerardy-Schahn, & Hildebrandt,

2013; Rutishauser, 2008; Sato & Kitajima, 2013).

In addition, polySia directly interacts with diverse neuronal growth factors, which can enrich growth factors on the cellular surface (reviewed in Colley et al., 2014; Sato & Kitajima, 2013)). The binding of various interaction partners might be possible because of the flexible structure of polySia, including the chain length and the rotatability of the glycosidic linkages between the sialic acid residues (Galuska, Dambon et al., 2017; Lenman et al., 2018; Nagae et al., 2013; Ulm et al., 2013; Zlatina, Lutteke, & Galuska, 2017).

PolySia is present not only on cell surfaces but also in bodily fluids. For instance, soluble polysialylated proteins are found in human blood, milk, and ejaculate (Gluer, Wunder, Schelp, Radtke, & Gerardy-Schahn, 1998; Simon et al., 2013; Szecsi, Dalgaard, Stakemann, Wagner, & Foltmann, 1989; Yabe, Sato, Matsuda, & Kitajima, 2003). However, the function of polySia as a soluble component is mostly unknown. Regarding semen and blood, it has already been speculated that polySia

* Corresponding author: Institute of Reproductive Biology, Leibniz Institute for Farm Animal Biology (FBN), Germany.

E-mail address: galuska.sebastian@fbn-dummerstorf.de (S.P. Galuska).

¹ Contributed equally.

<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.12.033>

Received 27 August 2018; Received in revised form 11 December 2018; Accepted 11 December 2018

Available online 12 December 2018

0144-8617/ © 2018 The Author(s). Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

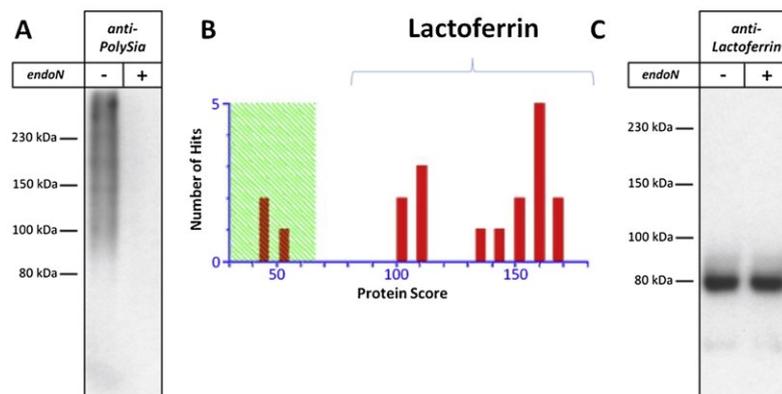


Fig. 1. Lactoferrin is co-precipitated with polySia. Using affinity precipitation (AP), polySia chains and putative carrier-/interacting proteins were isolated using human milk samples. (A) Purified samples were separated by SDS-PAGE for western blotting with or without endoN pre-treatment. Immunostaining was performed with an anti-polySia mAb. (B) Peptide mass fingerprints of tryptic digests were obtained by MALDI-TOF-MS, leading to the identification of lactoferrin. For the complete database report and mass list, see Supplemental 1 and Supplemental 2, respectively. (C) Using AP, purified samples with and without endoN pre-treatment were visualized with an anti-lactoferrin mAb.

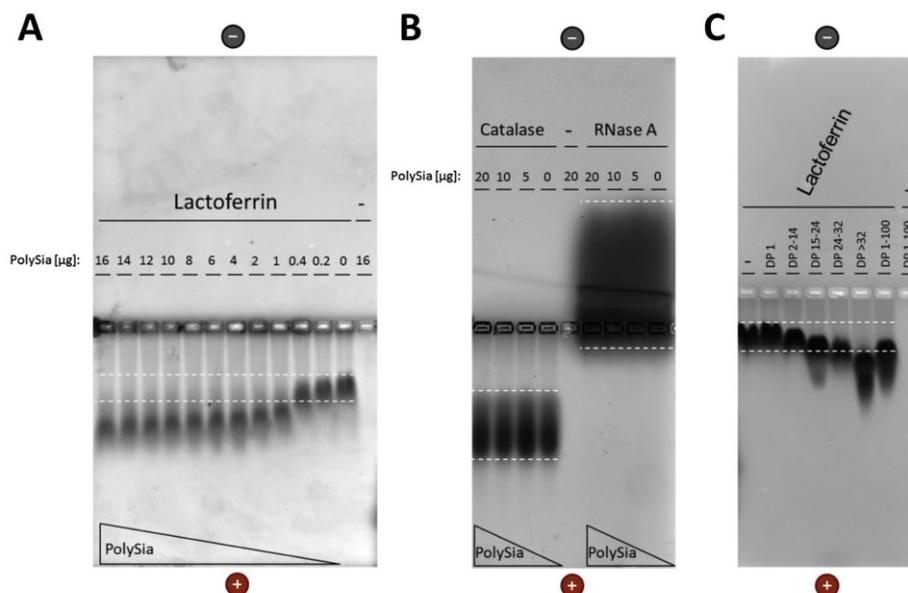


Fig. 2. The interaction between polySia and lactoferrin depends on the degree of polymerization. The interaction of polySia with (A) lactoferrin (8 μg/line) and (B) control proteins catalase and RNase A (10 μg/line) was analyzed using a native agarose gel system. Proteins were incubated with different amounts of negatively charged polySia and subsequently separated by electrophoresis. (C) The effect of polySia fractions (5 μg/line) consisting of different degrees of polymerization (DP) on the migration characteristics of lactoferrin (10 μg/line). Unfractionated polySia was used as a control.

may have a possible cytoprotective function against the cytotoxicity of extracellular histones (Simon et al., 2013; Zlatina et al., 2018).

One source of such toxic extracellular histones can be neutrophil extracellular traps (NETs) (Brinkmann & Zychlinsky, 2007; Saffarzadeh & Preissner, 2013). NETs act as a defense mechanism of neutrophil granulocytes (Brinkmann & Zychlinsky, 2007; Brinkmann et al., 2004, 2012). After the induction of NET formation, the nuclear DNA of neutrophils is decondensed, and the nucleus changes its structure and fuses with granular vesicles that contain antimicrobial components, such as elastase and lactoferrin (Fuchs et al., 2007). In the later steps of this process, the DNA fibers and their binding partners are released. The resulting meshwork forms an effective “snare” to catch and kill pathogens. However, the excessive presence of extracellular histones has been discussed as a trigger of several pathological processes, such as sepsis (Camicia, Pozner, & de Larranaga, 2014; Hashiba et al., 2015; Xu

et al., 2009). This is because extracellular histones are toxic to endogenous cells (Saffarzadeh et al., 2012; Xu et al., 2009). Intriguingly, polySia can bind histones and neutralize their cytotoxicity in a chain-length-dependent manner (Galuska, Dambon et al., 2017; Galuska, Galuska et al., 2017; Saffarzadeh et al., 2012; Zlatina et al., 2017). Thus, polySia in semen, milk, and blood might serve as a buffer against these cytotoxic components of NETs.

In the present study, we identified a novel binding partner of polySia, lactoferrin, that is also able to modulate NET processes. Lactoferrin is an iron-binding protein belonging to the transferrin family. Interestingly, its affinity for iron is 260 times stronger than that of transferrin (Aisen & Liebman, 1972; Metzboutigue et al., 1984). Due to its ability to capture iron, lactoferrin inhibits bacterial growth (Bullen, Rogers, & Leigh, 1972; Nazir, Nasir, Yasmeen, & Usman, 2017). However, lactoferrin is more than just an iron binder (Legrand, 2016; Nazir

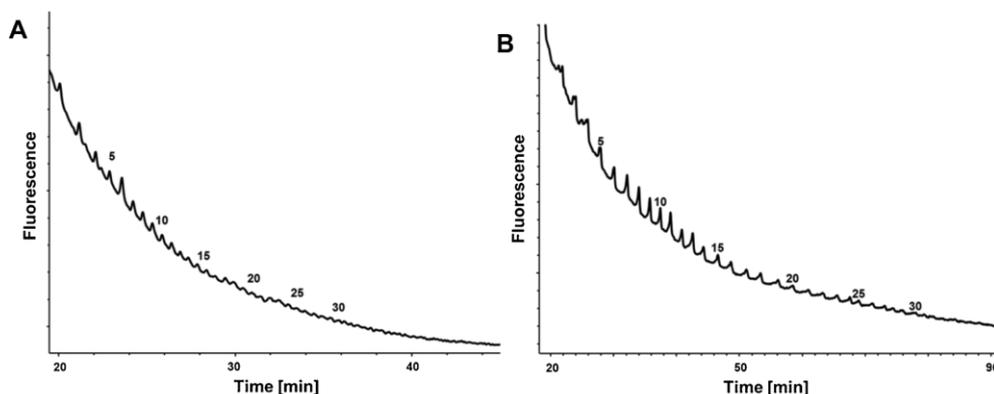


Fig. 3. PolySia can consist of more than 30 sialic acid residues in human milk and serum. PolySia from human milk and serum was isolated by AP using inactive endoN coupled to magnetic beads. The polySia fraction was used for “mild” DMB labeling. Resulting fluorescently labelled sialic acid polymers of (A) human milk and (B) serum were separated via anion-exchange chromatography. The chain length is given for selected peaks.

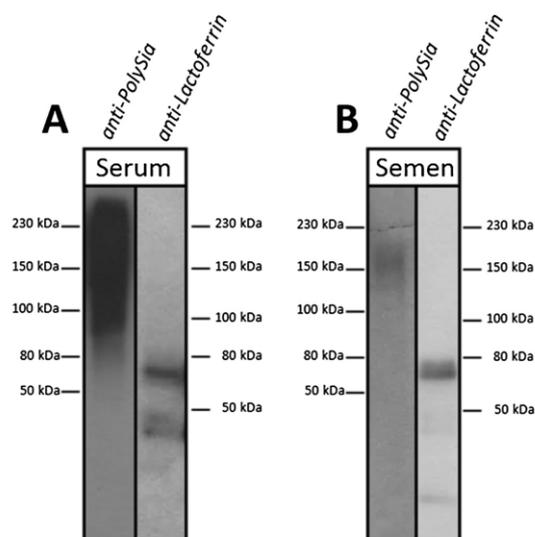


Fig. 4. PolySia interacts with lactoferrin in human serum and ejaculates. After AP against polySia, samples purified from (A) serum, and (B) seminal plasma were analyzed by western blots using mAb against polySia or lactoferrin.

et al., 2017; Vogel, 2012). For instance, lactoferrin contains a small positively charged region at the N-terminus called lactoferricin (LFcin) (Gifford, Hunter, & Vogel, 2005). During inflammatory processes, this domain can act as an antimicrobial peptide after its release either by pepsin (Kuwata, Yip, Tomita, & Hutchens, 1998) or other endogenous/bacterial proteases (Britigan, Hayek, Doebbeling, & Fick, 1993). Intriguingly, a recent study showed that lactoferrin forms a “shell” around activated neutrophils, thus inhibiting the release of NET fibers, the last step of NETosis (Okubo et al., 2016). Based on the findings of Hirahashi and colleagues, we tested the possible involvement of polySia in such a mechanism. The results suggest that interaction with the carbohydrate polySia increases the capacity of lactoferrin to prevent the release of NET fibers.



Fig. 5. PolySia interacts with LFcin. The interaction of polySia with LFcin (5 μg/line) was analyzed using a native agarose gel system. LFcin was incubated with different amounts of polySia and subsequently separated by electrophoresis.

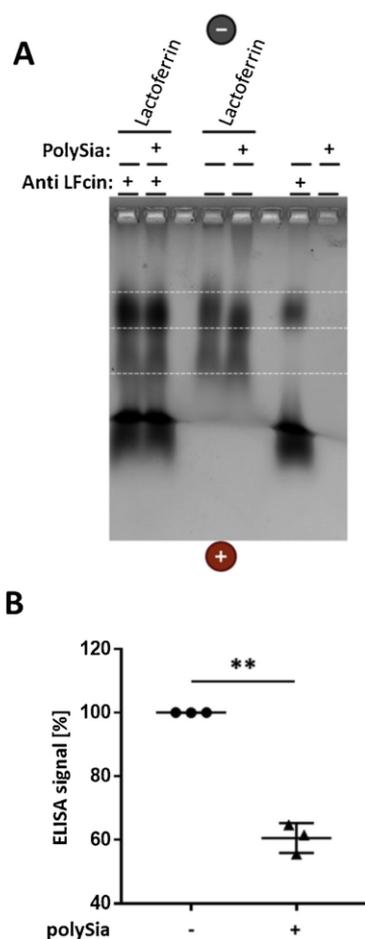


Fig. 6. PolySia binds LFCin domain of lactoferrin. A) The interaction of polySia with lactoferrin was tested in the presence of an antibody against LFCin. Different sample settings were loaded and separated by electrophoresis: lactoferrin 5 $\mu\text{g}/\text{lane}$; antibody 1 $\mu\text{g}/\text{lane}$; polySia 5 $\mu\text{g}/\text{lane}$. B) ELISA plates were coated with lactoferrin. To detect lactoferrin, an antibody against LFCin (-polySia) was applied. In addition, polySia was added before adding the antibody (+polySia). Control (-polySia) was set to 100%. Mean values and standard deviations of the three independent experiments are displayed in the diagram. Data sets were analyzed by paired t-test, and the significant difference is given: ** $p < 0.01$.

2. Material and methods

2.1. Materials

All reagents used were of analytical grade. For all cell culture experiments, lipopolysaccharides (LPS) were removed from polySia (colominic acid; Gerbu, Heidelberg, Germany) as described previously (Galuska, Dambon et al., 2017).

2.2. Human milk, semen and blood samples

All volunteers provided written informed consent for semen, milk and blood sample analysis and all samples were anonymized. The

experiment was approved by the local ethics office of the University of Giessen, School of Medicine (IDs 05/00; 77/00; 67/09).

2.3. Isolation of polySia and western blotting

For affinity precipitation, inactivated endosialidase (endoN), which can bind but not degrade polySia, was coupled to tosyl-activated magnetic DynabeadsM-280 (Invitrogen, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's instructions, as described in (Simon et al., 2013), and added to the respective samples. After washing, polySia was eluted using 100 mM triethylamine and 150 mM NaCl and dried in a vacuum concentrator.

Purified proteins were separated by 7.5% SDS-PAGE under reducing conditions and transferred onto a PVDF membrane. The binding of anti-polySia (mAb 735; 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and anti-lactoferrin (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany; 1:3000) was visualized by using a secondary antibody conjugated with horseradish peroxidase (Dako, Hamburg, Germany) and a chemiluminescence SuperSignal kit (Thermo Fisher Scientific, Kehl, Germany) as described previously (Hänsch et al., 2014; Simon et al., 2013, 2015). For the degradation of polySia, aliquots were treated with endoN (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 3 h on ice.

2.4. Glycoproteomics approach

PolySia was isolated as mentioned above and separated by electrophoresis on 10% ready-to-use SDS gels (Bio-Rad, Hercules, CA), followed by in-gel digestion with trypsin (Promega, Mannheim, Germany) as previously described in detail (Galuska et al., 2010; Simon et al., 2013). The resulting peptides were separated with a reversed-phase (RP) column (PepMap, 3 m, 75 m, 100 mm, Dionex, Idstein, Germany) using an Ultimate Nano LC system (Dionex). A linear gradient was applied from 10% acetonitrile, 0.1% formic acid to 60% acetonitrile, and 0.1% formic acid as described in (Simon et al., 2013). Peptides were transferred by a Probot (Dionex) onto a prespotted MALDI-TOF target (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) during RP-HPLC run. Peptide mass fingerprints of tryptic digests were obtained using an Ultraflex I TOF/TOF MS (Bruker Daltonics). MS-spectra were analyzed using FlexAnalysis software 3.0 (both Bruker Daltonics). The obtained peak lists were used for a Mascot database search (Supplement 1). Peptide masses of potential contamination, such as trypsin, keratin, and actin, were excluded.

2.5. Native agarose gel electrophoresis

For native agarose gels, polySia were separated according to the chain length and collected as previously described (Galuska, Dambon et al., 2017; Galuska, Galuska et al., 2017). Unfractionated polySia and fractionized polySia in addition to inactive endoN were preincubated with lactoferrin from human milk (Sigma-Aldrich), LFCin (B25; Bachem, Bubendorf, Switzerland), catalase from bovine liver (Serva, Heidelberg, Germany), and RNase A (Thermo Fisher Scientific) for 1 h at 30 °C in 50 mM Tris buffer (w/v) on a shaker. Furthermore, lactoferrin was applied that was previously incubated with an antibody against bovine LFCin (Acris Antibody, Herford, Germany) overnight at 4 °C. For electrophoreses, 2% agarose (w/v; peqGOLD Universal Agarose, peqLab, Erlangen, Germany) was dissolved in a running buffer (19.2 mM glycine, 25 mM Tris/HCl [pH 8.5]). The resulting gels were loaded with samples and Native Marker Liquid Mix (Serva). Samples were separated by constant voltage (80 V) for 4–5 h (Kim, Yokota, & Kim, 2000). A fixation solution (45% methanol [v/v]; 7.5% acetic acid [v/v]) was used for the overnight fixation of proteins. The staining of proteins was done with Roti-blue (Carl Roth, Karlsruhe, Germany) according to the manufacturer's instructions.

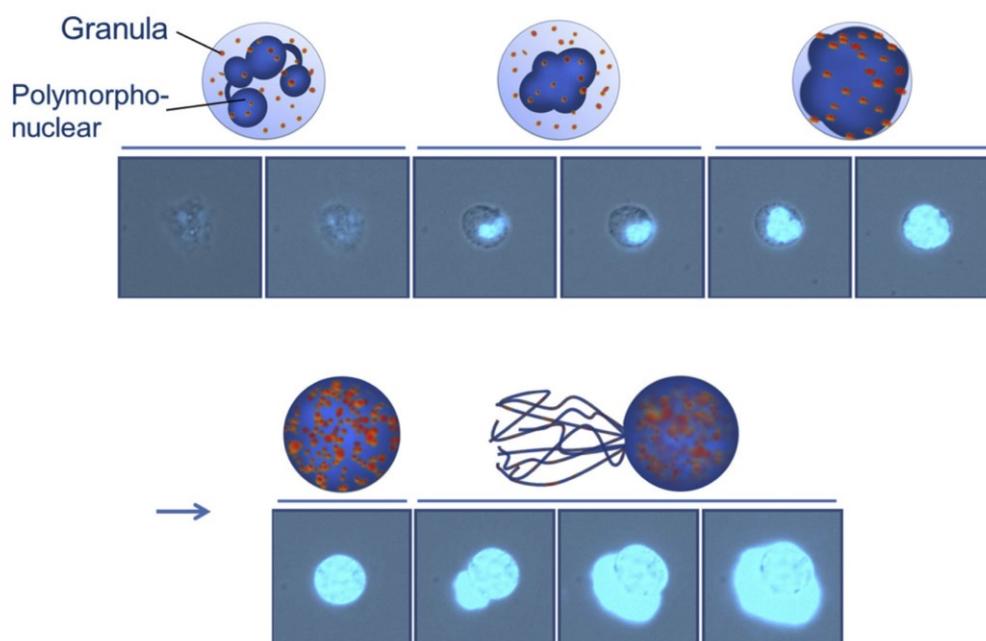


Fig. 7. Visualization of NET formation. The schematic and observed formation of NET is displayed. An important part of the visualized process is a reconstruction of the DNA, which will, inter alia, be decondensed. During a late process, the nucleus membrane disintegrates. As a consequence, antimicrobial granule proteins and chromatin fibers are mixed in the cytoplasm. Finally, the cell membrane will disrupt, releasing a sticky meshwork of DNA fibers peppered with antimicrobial components. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article).

2.6. Competitive ELISA

The workflow is based on an ELISA protocol created by Abcam (Cambridge, UK). The ELISA plate (medium binding, F; Sarstedt, Nümbrecht, Germany) was coated with 20 µg/ml lactoferrin (Sigma-Aldrich) in a coating buffer (15 mM Na₂CO₃, 35 mM NaHCO₃, pH 9.6). After 2 h, wells were washed twice with TBS (pH 7.4). In the next step, lactoferrin was either incubated with 160 µg/ml polySia (colominic acid) or PBS for 2 h. Following this, 1% IgG-free albumin (v/w) was added and incubated for 2 h to block unspecific binding. Thereafter, a murine anti-LFcin antibody (0.5 µg/ml) was added (overnight at 4 °C). After three washing steps, an anti-mouse-HRP antibody (0.4 µg/ml; Dako, Santa Clara, CA, USA) as a secondary antibody was applied for 2 h. After three washing steps, HRP-conjugate TMB-substrate (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) was added. After 30 min, the reaction was stopped with 2 M HCl, and absorbance was measured at 460 nm.

2.7. HPLC analysis

The chain length of polySia was analyzed using 1,2-diamino-4,5-methylenedioxybenzene (DMB)-HPLC analysis (Inoue & Inoue, 2001, 2003). After isolating polySia from milk and serum, dried samples were dissolved in DMB reaction buffer and incubated for 48 h at 11 °C. The reaction was stopped by adding 1 M NaOH. The fluorescently labeled polySia chains were separated on a DNAPac PA-100 column (4 × 250 mm; 13 µm; Dionex). MilliQ water (E1) and ammonium acetate buffer (4 M and 2 M in the case of milk and serum samples, respectively; E2) were used as eluents at a flow rate of 1 ml/min, and the following gradient was run as follows: 0 min = 0% E2; 5 min = 0% E2; 15 min = 8% E2; 20 min = 11% E2; 35 min = 14% E2; 55 min = 16% E2; 100 min = 20% E2; 130 min = 23% E2; and 131 min = 100%

E2 (Galuska, Dambon et al., 2017; Galuska, Galuska et al., 2017; Simon et al., 2013).

2.8. NETose - live cell imaging microscopy

The isolation process of neutrophil granulocytes was previously described by Saffarzadeh et al. (Saffarzadeh et al., 2012). For all experiments, isolated cells were preincubated in RPMI-Mix (Thermo Fisher Scientific; 1% penicillin/ streptomycin [v/v]; 1% FBS [v/v]) for 1 h at 37 °C in a CO₂ incubator. A microscopy culture dish was seeded with 50,000 cells. To detect DNA, the preincubated cells were stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; 2 µg/ml; Sigma-Aldrich) and placed under a Zeiss Axio Observer Z1 microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) at 37 °C. After induction of NETosis with 50 mM phorbol myristate acetate (PMA), cells were monitored using a shooting interval of 1 picture/2 min.

2.9. NETose - fluorescence detection of neutrophils

Poly-L-lysine-coated glass cover slips in a 24-well plate were seeded with 80,000 cells. Lactoferrin (200 µg/ml) and polySia (100 µg/ml) were directly added after the induction of NETosis using 25 nM PMA. The incubation step was completed after 4 h at 37 °C in the CO₂ incubator. For all subsequent steps, reagents were dissolved in PBS (pH 7.4), and cells were washed three times with PBS between every step. For the fixation of cells onto the cover slips, 4% paraformaldehyde (w/v) was used for 20 min at 37 °C. After fixation, the cells were permeabilized with 0.5% Triton X-100 (v/v) for 1 min and washed again. To block unspecific binding of antibodies (Ab), cells were incubated with 2% IgG-free albumin (Carl Roth) for 30 min at 37 °C. The staining of lactoferrin was done in the first step with rbAb (1:250; Jackson ImmunoResearch Inc, West Grove, PA, USA) and in the second step

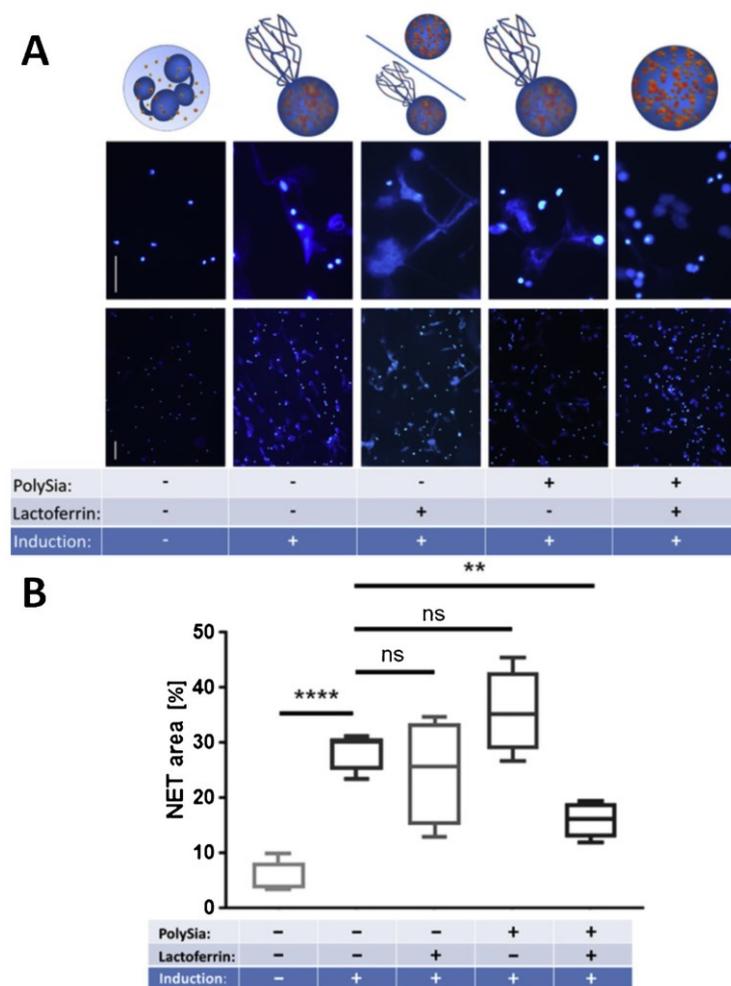


Fig. 8. PolySia supports the inhibition capacity of lactoferrin for the release of NET fibers. Neutrophils were stimulated using PMA. In a parallel test-setting, lactoferrin and/or polySia was added. Neutrophils and NETs were monitored by fluorescence microscopy (A). The DNA fibers were stained with DAPI (blue). Scale bars: 50 μm (above); 100 μm (below). The pictures were quantified by calculating the NETosis area (B) with Arivis Vision4D software. Box & Whisker plot plots (median; min to max) are shown for four independent experiments. Data sets were analyzed using two-way ANOVA with Tukey post-tests for multiple comparisons. Significant differences are given: ns, not significant; ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$ (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article).

with FITC-conjugated mAb against rb (1:600; Dianova, Hamburg, Germany). In addition, cellular DNA was stained with DAPI (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$; Carl Roth) for 6 min, fixed again with 2% paraformaldehyde (w/v) for 20 min, and mounted on a microscope slide. Lactoferrin cell video stacks were taken with a LSM 800 confocal laser scanning microscope and adjusted with Zen software (Carl Zeiss).

2.10. Quantification of NETosis area and statistical analyses

Images were captured with a Zeiss Axio Imager A1 (Carl Zeiss). Four pictures were taken for every cover slip, and data of three different experimental approaches were summarized. The NETosis area was calculated with Arivis Vision 4D (Version: 2.12.6 \times 64; Rostock, Germany).

2.11. Statistical analysis

Data sets were analyzed by GraphPad Prism 7 software using two-way ANOVA with Tukey post-tests for multiple comparisons or paired t-tests. Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$.

Significant differences are given: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

3. Results and discussion

3.1. Lactoferrin is co-precipitated during the isolation of polySia

The presence of polySia in human milk was described 15 years ago (Yabe et al., 2003). To identify potential interaction partners of polySia, we applied inactivated endoN coupled to magnetic beads for polySia-specific isolation using human milk. The applied inactivated form of endoN can only bind polySia, but its catalytic activity to degrade polySia is deactivated (Haselhorst et al., 2006; Stummeyer, Dickmanns, Mühlenhoff, Gerardy-Schahn, & Ficner, 2005). The precipitated fraction was tested for polySia. As shown in Fig. 1A, we observed the typical smear for polysialylated proteins when western blots against polySia were performed. The staining was abolished after the application of the polySia-specific enzyme endoN. The obtained western blot against polySia confirmed the presence of polySia, which was originally described by Kitajima et al. (Yabe et al., 2003).

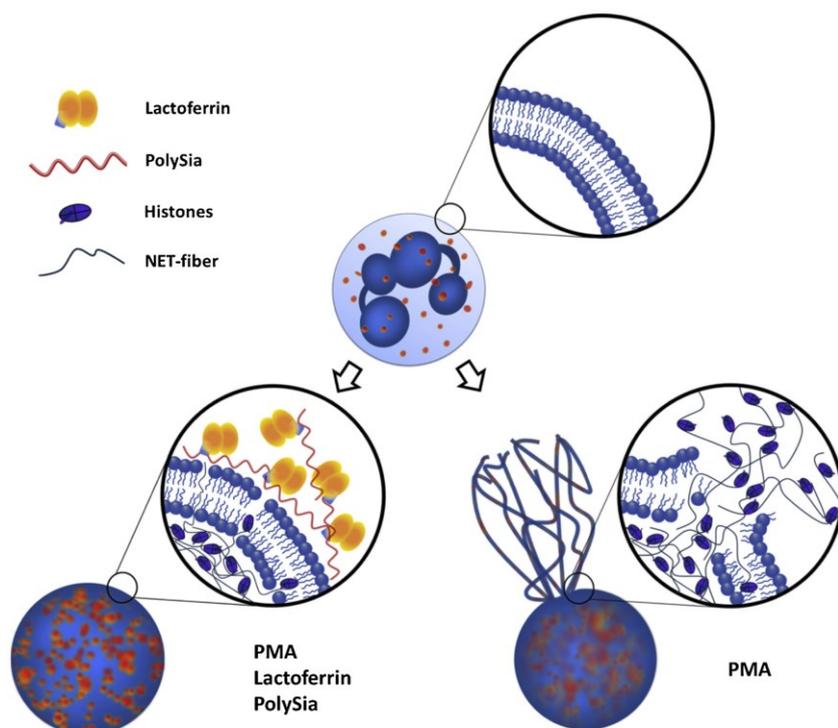


Fig. 9. Proposed working model. Before stimulation, the lipid bilayer is completely intact. After stimulation, the whole cell is filled with chromatin fibers. With the addition of lactoferrin (LFcin domain in blue) and polySia, the complex of both molecules stabilizes the cell membrane integrity. Otherwise, the cell membrane will be explosively disrupted and NET fibers will be efficiently released (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article).

The purified protein fractions were separated on SDS gel for tryptic in-gel digestion to generate a peptide mass fingerprint, as described earlier (Galuska et al., 2010; Simon et al., 2013; Ulm et al., 2013). The resulting tryptic peptides were separated by nanoLC and transferred to a pre-spotted MALDI-TOF-MS target for MS analysis. The obtained peptide masses were used for a Mascot database search, leading to the identification of several isoforms of lactoferrin as a potential interaction partner of polySia (Fig. 1B, Supplemental 1). To verify the database search, a western blot against lactoferrin was performed using the affinity-precipitated polySia fraction. In contrast to the polySia staining, lactoferrin was visualized as a sharp band in an area of 80 kDa (Fig. 1C). Comparable migration characteristics and signal intensity were also observed after endoN treatment. The results suggest that lactoferrin is not a polySia carrier but may represent a potential interaction partner of polySia because it was co-precipitated with polySia.

3.2. Lactoferrin interacts in a chain-length-dependent manner with polySia

The presence of lactoferrin in the polySia fraction suggests that lactoferrin can bind polySia chains. To prove this hypothesis, we used a native gel application. In the first experiment, we incubated lactoferrin with increasing amounts of polySia (Fig. 2A). The obtained results demonstrate that the migration distance of lactoferrin is influenced by polySia. In addition, two other proteins were incubated with polySia in order to evaluate the test-setting used. The first protein, catalase, has a slightly lower molecular weight than lactoferrin (catalase of 60 kDa) and is also present in neutrophils. Here, catalase can inhibit NET-formation via the decomposition of reactive oxygen species (ROS) (Fuchs et al., 2007). Catalase showed no changed migration abilities in the applied native electrophoresis system when increasing amounts of polySia were added (Fig. 2B), as already described in (Galuska, Dambon et al., 2017; Galuska, Galuska et al., 2017). In addition, we analyzed

RNase A, as RNase A has a basic isoelectric point and can bind DNA (N'Soukpo-Kossi, Ragi, & Tajmir-Riahi, 2007). However, polySia did not affect the migration characteristics of RNase A (Fig. 2B), indicating that more than a basic isoelectric point is necessary to interact with polySia.

In addition, a possible interaction between lactoferrin and inactive endoN, which was used for the affinity precipitation, was tested to control the experimental setup of the polySia purification. However, the results of the native gel electrophoresis indicate that inactive endoN did not influence the migration of lactoferrin (Supplemental 3).

To specify the binding properties of polySia for lactoferrin, the degree of polymerization was investigated, which is necessary for an interaction between lactoferrin and the sialic acid polymers. For this purpose, a chain-length mixture of polySia was fractionized as described in (Galuska, Dambon et al., 2017; Galuska, Galuska et al., 2017). The groups of different chain lengths were incubated with lactoferrin before electrophoresis. The native agarose gel showed that a significant change in the migration distance occurs with a polySia fraction consisting of polySia chains with 15–24 linked sialic acid residues (Fig. 2C).

Kitajima et al. have already shown that polySia chains with at least 18 linked sialic acid residues can be present in milk (Yabe et al., 2003). Therefore, polySia chains with the required chain length for an interaction with lactoferrin are present in human milk. Because we used a slightly modified DMB application and another HPLC equipment, we also examined the degree of polymerization in human milk using a precipitated polySia fraction. After separation by anion-exchange chromatography, polySia chains with more than 30 sialic acid residues were displayed (Fig. 3A). Accordingly, in line with the results of Yabe et al. (Yabe et al., 2003), human milk contains polySia chains that are long enough to bind lactoferrin.

3.3. Lactoferrin also interacts with polySia in blood and ejaculates

Like polySia, lactoferrin is not only present in milk but also in other bodily fluids, such as blood and ejaculate (Gluer et al., 1998; Levay & Viljoen, 1995; Simon et al., 2013). Therefore, polySia may also interact with lactoferrin in ejaculate and in blood. Whereas in ejaculate the degree of polySia was examined with at least up to 40 sialic acid residues (Simon et al., 2013), we know of no study that has analyzed the degree of polymerization in serum. For this reason, the polymerization grade was determined using serum samples after the isolation of polySia by inactive endoN coupled to magnetic beads. As shown in Fig. 3B, polySia chains with more than 30 sialic acid residues could be visualized. Thus, polySia with the required chain length to bind lactoferrin was present in all the analyzed bodily fluids.

To determine, if polySia interacts with lactoferrin in serum and seminal plasma, we precipitated the polySia fraction and performed western blots against lactoferrin. The obtained western blots demonstrated that lactoferrin was also co-precipitated using serum and seminal plasma (Fig. 4), indicating that complexes of polySia and lactoferrin exist in human milk, blood, and ejaculate.

Most studies about polySia describe its effects on the cell surface, demonstrating, for instance, that adhesion is influenced or growth factors are accumulated (Colley et al., 2014; Galuska, Lutteke, & Galuska, 2017; Schnaar et al., 2014). The outlined experiments clearly demonstrate that in bodily fluids this carbohydrate interacts with one of the central elements of the innate immune system in mammals. The functions of lactoferrin are multifarious, and polySia might represent a modulatory element during several immunological processes triggered by lactoferrin.

3.4. PolySia interacts with the basic domain of lactoferrin called LFCin

The obtained results suggest that polySia binds lactoferrin. To acquire more insight regarding the mechanism of the interaction, additional experiments were performed. Interestingly, lactoferrin can bind DNA, which is mediated by its basic part at the N-terminus, the LFCin domain (Britigan, Lewis, Waldschmidt, McCormick, & Krieg, 2001; Okubo et al., 2016). Because polySia binds histones in partially overlapping areas as their DNA binding sites (Galuska, Dambon et al., 2017; Zlatina et al., 2017), LFCin represents a potential binding domain for polySia in the case of lactoferrin. To test this hypothesis, the peptide LFCin was incubated with different polySia concentrations for native gel electrophoresis. As shown in Fig. 5A, LFCin changed its migration distance when polySia was added, indicating that LFCin can also interact with polySia. Because LFCin can act as an antimicrobial peptide after its release from lactoferrin during inflammation (Gifford et al., 2005), the interaction with the carbohydrate polySia may modulate its physiological activity.

However, it cannot be excluded that the interaction with LFCin is only possible after the release of this peptide, as not all surface areas of LFCin are reachable in the complete protein.

We used an antibody that detects LFCin to block the potential binding site of polySia (Shimazaki et al., 1996). For the native gel electrophoresis, sample sets of lactoferrin were preincubated with the antibody against LFCin before the addition of polySia. Moreover, lactoferrin was incubated with the antibody without adding polySia, and both proteins were also separately applied. As shown in Fig. 6A, an altered migration was observed when polySia was incubated with lactoferrin in contrast to lactoferrin that was previously treated with an antibody against LFCin. However, as both proteins (lactoferrin and antibody) were stained with Coomassie and the applied IgG chains migrated to comparable areas as lactoferrin, an unambiguous evaluation would prove difficult.

For this reason, a further test setting was used based on competitive ELISA (illustrated in Fig. 6B). To this end, lactoferrin was coated onto ELISA plates. Subsequently, an antibody against LFCin was added. The

obtained signal was set to 100%. In parallel, polySia was applied before adding the antibody against LFCin, resulting in a decrease in signal. Thus, polySia blocked the binding site of the antibody against LFCin. Taken together, the results verified that polySia binds lactoferrin and that the binding might be located in the area of the LFCin domain.

3.5. PolySia-lactoferrin complexes inhibit the release of neutrophil extracellular traps

Lactoferrin acts mainly as an anti-inflammatory component (Legrand, Ellass, Carpentier, & Mazurier, 2005). For instance, the release of NETs is inhibited by lactoferrin (Okubo et al., 2016). NETs are generated by neutrophil granulocytes. After the initiation of NETosis, neutrophils form a sticky meshwork consisting of a mixture of DNA and several anti-microbial components (Brinkmann & Zychlinsky, 2012). NET fibers can effectively counteract the invasion of microbes (Brinkmann & Zychlinsky, 2007; Brinkmann et al., 2004). However, the main disadvantage of NETosis is its cytotoxicity against endogenous cells leading to pathological processes (Knight & Kaplan, 2012; Ma & Kubes, 2008; Saffarzadeh & Preissner, 2013; Villanueva et al., 2011). To prevent harmful NET formation, the release of NET fibers must be strongly regulated, and lactoferrin has been suggested as a potential reagent to inhibit the release of NET (Okubo et al., 2016). The most prominent mechanism for forming NET is "beneficial suicide" (Brinkmann & Zychlinsky, 2007; Phillipson & Kubes, 2011; Urban, Reichard, Brinkmann, & Zychlinsky, 2006). In the course of this, the nuclear structure is destructed, chromatin is decondensed, and a rupture of the plasma membrane takes place (illustrated in Fig. 7 and Supplemental 4) (Fuchs et al., 2007). Recently, Okubo et al. demonstrated that lactoferrin inhibits the release of NET (Okubo et al., 2016). As reproduced in our lab, when lactoferrin is applied during the activation of neutrophils, the extracellular lactoferrin forms an outer shell (Supplemental 5) (Okubo et al., 2016).

We wanted to test whether polySia modulates the ability of lactoferrin to inhibit the last step of NETosis and thus the effective release of NET-fibers. Therefore, we used a lactoferrin concentration, which did not significantly influence the release of NETs during the stimulation of neutrophils in our test setting (Fig. 8A).

In a parallel sample setting, we added polySia without lactoferrin. PolySia alone was not able to influence the exposition of NETs. When polySia together with lactoferrin was applied, neutrophils were activated and the nuclear structures were still destroyed. However, the release of NET-fibers was significantly inhibited (Fig. 8B). The results suggest that polySia increase the capability of lactoferrin to modulate the exposition of NETs via stabilization of the lactoferrin-shell. The interaction with the linear polySia chains and the resulting cross-linking on the cellular surface may stabilize the membrane, inhibiting the explosively release of NET fibers (Fig. 9).

In addition to these immunological aspects, it is interesting to note that both molecules are bioactive during the development of the neuronal system and learning processes (reviewed in (Wang, 2016)). In the case of polySia, numerous studies have shown that this carbohydrate is an essential modulator for the development of the brain and neuronal plasticity and that its absence leads to several neuronal defects in polySia knock-out mice (Schnaar et al., 2014; Weinhold et al., 2005) and may also regulate the development of other organs (Galuska, Lutteke, & Galuska, 2017).

However, lactoferrin also seems to be an import player in the nervous system. Many studies have shown the various neuroprotective effects of lactoferrin (van de Looij et al., 2014; Wang, 2016). This is possible because lactoferrin can pass the blood-brain barrier (Kamemori et al., 2008). Interestingly, Wang and colleagues observed that dietary lactoferrin induces an upregulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in postnatal piglets (Chen et al., 2015), which modulates, for instance, neuronal plasticity during learning processes (Bathina & Das, 2015). In addition, they observed increasing amounts

of polySia in the hippocampi of these piglets. Intriguingly, polySia can bind BDNF and increase the impact of BDNF on the cellular survival of neuronal cell lines (Kanato, Kitajima, & Sato, 2008). Therefore, lactoferrin may represent a further polySia binding partner that also modulates neuronal processes via polySia binding.

4. Conclusion

The present study deals with lactoferrin as a novel binding partner of polySia and the structural and functional interaction of these molecules. We observed that lactoferrin coprecipitates when we isolated polySia from milk, blood, and semen. The interaction between the carbohydrate and lactoferrin was verified using a native gel electrophoresis setup, demonstrating that the polySia–lactoferrin interaction depends on the degree of polymerization. The LFCin domain of lactoferrin was identified as a potential binding site. Intriguingly, both molecules were proposed to be involved during NETosis and/or to be a regulatory element of the biological activity of NET. Our results suggest that an interaction of lactoferrin with the carbohydrate polySia increases the capacity of lactoferrin to prevent the release of NET fibers. Because lactoferrin and polySia seem to interact with each other in several bodily fluids, the described effect might represent a natural modulation system of NETosis and may be a promising strategy during NET-triggered diseases, such as thrombosis, sepsis, and infertility. Since polySia interacts with LFCin, there might also be an impact on the physiological function of this antimicrobial peptide.

The outlined findings are also interesting from the standpoint of nutritional science. Lactoferrin is commonly used as a nutritional supplement, as numerous studies have shown several positive effects during inflammation and against cancer (reviewed in (Lonnerdal, 2009)). Therefore, lactoferrin in combination with polySia might have additional effects. These potential studies are not restricted to mammals, as lactoferrin is also applied in fish to modulate the intestinal immune system and may represent a positive supplement in aquaculture. For instance, bovine lactoferrin decreases the mortality rate in fish larvae challenged with pathogens (Ulloa et al., 2016).

However, both molecules are also important components of the neuronal system, as outlined above. Therefore, the interaction might additionally influence the biological activity of polySia and lactoferrin, for example, during brain development.

Taken together, the results engender novel research themes in different fields of glycobiology.

Declarations of interests

None.

Acknowledgments

The authors thank for the excellent technical help of Gesine Krüger and Werner Mink. We thank Martina Mühlhoff for the kind gifts of inactive and active endoN, as well as mAb 735. In addition, we gratefully thank the Arivis AG to provide us the Arivis Vision4D Software for the analysis of the NET-area. This work was supported by a grant of the Deutsche Forschungsgemeinschaft (GA 1755/1-2). The publication of this article was funded by the Open Access Fund of the Leibniz Institute for Farm Animal Biology (FBN).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.12.033>.

References

Aisen, P., & Liebman, A. (1972). Lactoferrin and transferrin - comparative study.

- Biochimica Et Biophysica Acta*, 257(2) 314–8.
- Bathina, S., & Das, U. N. (2015). Brain-derived neurotrophic factor and its clinical implications. *Archives of Medical Science*, 11(6), 1164–1178.
- Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D. S., ... Zychlinsky, A. (2004). Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*, 303(5663), 1532–1535.
- Brinkmann, V., & Zychlinsky, A. (2007). Beneficial suicide: Why neutrophils die to make NETs. *Nature Reviews Microbiology*, 5(8), 577–582.
- Brinkmann, V., & Zychlinsky, A. (2012). Neutrophil extracellular traps: Is immunity the second function of chromatin? *Journal of Cell Biology*, 198(5), 773–783.
- Britigan, B. E., Hayek, M. B., Doebbeling, B. N., & Fick, R. B., Jr. (1993). Transferrin and lactoferrin undergo proteolytic cleavage in the *Pseudomonas aeruginosa*-infected lungs of patients with cystic fibrosis. *Infection and Immunity*, 61(12), 5049–5055.
- Britigan, B. E., Lewis, T. S., Waldschmidt, M., McCormick, M. L., & Krieg, A. M. (2001). Lactoferrin binds CpG-containing oligonucleotides and inhibits their immunostimulatory effects on human B cells. *Journal of Immunology*, 167(5), 2921–2928.
- Bullen, J. J., Rogers, H. J., & Leigh, L. (1972). Iron-binding proteins in milk and resistance to *Escherichia coli* infection in infants. *Bmj-British Medical Journal*, 1(5792) 69+.
- Camicia, G., Pozner, R., & de Larranaga, G. (2014). Neutrophil extracellular traps in sepsis. *Shock*, 42(4), 286–294.
- Chen, Y., Zheng, Z., Zhu, X., Shi, Y., Tian, D., Zhao, F., & Wang, B. (2015). Lactoferrin Promotes Early Neurodevelopment and Cognition in Postnatal Piglets by Upregulating the BDNF Signaling Pathway and Polysialylation. *Mol. Neurobiol.* 52(1), 256–269.
- Colley, K. J. (2010). Structural basis for the polysialylation of the neural cell adhesion molecule. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 663, 111–126.
- Colley, K. J., Kitajima, K., & Sato, C. (2014). Polysialic acid: Biosynthesis, novel functions and applications. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 49(6), 498–532.
- Fuchs, T. A., Abed, U., Goosmann, C., Hurwitz, R., Schulze, I., Wahn, V., ... Zychlinsky, A. (2007). Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *Journal of Cell Biology*, 176(2), 231–241.
- Galuska, S. P., Rollenhagen, M., Kaup, M., Eggers, K., Oltmann-Norden, I., Schiff, M., & Geyer, H. (2010). Synaptic cell adhesion molecule SynCAM 1 is a target for polysialylation in postnatal mouse brain Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 107: Synaptic cell adhesion molecule SynCAM 1 is a target for polysialylation in postnatal mouse brain Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 107: 22, (pp. 10250–10255).
- Galuska, C. E., Dambon, J. A., Kuhnle, A., Bornhoff, K. F., Prem, G., Zlatina, K., ... Galuska, S. P. (2017). Artificial polysialic acid chains as sialidase-resistant molecular anchors to accumulate particles on neutrophil extracellular traps. *Frontiers in Immunology*, 8, 1229.
- Galuska, S. P., Galuska, C. E., Tharmalingam, T., Zlatina, K., Prem, G., Husejnov, F. C. O., ... Carrington, S. D. (2017). In vitro generation of polysialylated cervical mucus by bacterial polysialyltransferases to counteract cytotoxicity of extracellular histones. *FEBS Journal*, 284(11), 1688–1699.
- Galuska, C. E., Lutteke, T., & Galuska, S. P. (2017). Is polysialylated NCAM not only a regulator during brain development but also during the formation of other organs? *Biology (Basel)*, 6(2).
- Gifford, J. L., Hunter, H. N., & Vogel, H. J. (2005). Lactoferrin: A lactoferrin-derived peptide with antimicrobial, antiviral, antitumor and immunological properties. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62(22), 2588–2598.
- Gluer, S., Wunder, M. A., Schelp, C., Radtke, E., & Gerardy-Schahn, R. (1998). Polysialylated neural cell adhesion molecule serum levels in normal children. *Pediatric Research*, 44(6), 915–919.
- Hänsch, M., Simon, P., Schön, J., Kaese, M., Braun, B. C., Jewgenow, K., ... Galuska, S. P. (2014). Polysialylation of NCAM correlates with onset and termination of seasonal spermatogenesis in roe deer. *Glycobiology*, 24(6), 488–493.
- Harduin-Lepers, A., Petit, D., Mollicone, R., Delannoy, P., Petit, J. M., & Oriol, R. (2008). Evolutionary history of the alpha2,8-sialyltransferase (ST8Sia) gene family: Tandem duplications in early deuterostomes explain most of the diversity found in the vertebrate ST8Sia genes. *BMC Evolutionary Biology*, 8, 258.
- Haselhorst, T., Stummeyer, K., Muhlenhoff, M., Schaper, W., Gerardy-Schahn, R., & von Itzstein, M. (2006). Endosialidase NF appears to bind polySia DP5 in a helical conformation. *Chembiochem*, 7(12), 1875–1877.
- Hashiba, M., Huq, A., Tomino, A., Hirakawa, A., Hattori, T., Miyabe, H., ... Takeyama, N. (2015). Neutrophil extracellular traps in patients with sepsis. *Journal of Surgical Research*, 194(1), 248–254.
- Hildebrandt, H., Muhlenhoff, M., & Gerardy-Schahn, R. (2010). Polysialylation of NCAM. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 663, 95–109.
- Inoue, S., & Inoue, Y. (2001). Developmental profile of neural cell adhesion molecule glycoforms with a varying degree of polymerization of polysialic acid chains. *Journal of Biological Chemistry*, 276(34), 31863–31870.
- Inoue, S., & Inoue, Y. (2003). Ultrasensitive analysis of sialic acids and oligo/polysialic acids by fluorometric high-performance liquid chromatography. *Methods in Enzymology*, 362, 543–560.
- Kamemori, N., Takeuchi, T., Sugiyama, A., Miyabayashi, M., Kitagawa, H., Shimizu, H., ... Harada, E. (2008). Trans-endothelial and trans-epithelial transfer of lactoferrin into the brain through BBB and BCSFB in adult rats. *Journal of Veterinary Medical Science*, 70(3), 313–315.
- Kanato, Y., Kitajima, K., & Sato, C. (2008). Direct binding of polysialic acid to a brain-derived neurotrophic factor depends on the degree of polymerization. *Glycobiology*, 18(12), 1044–1053.
- Kim, R., Yokota, H., & Kim, S. H. (2000). Electrophoresis of proteins and protein-protein complexes in a native agarose gel. *Analytical Biochemistry*, 282(1), 147–149.

- Knights, J. S., & Kaplan, M. J. (2012). Lupus neutrophils' NET⁺ gain in understanding lupus pathogenesis. *Current Opinion in Rheumatology*.
- Kuwata, H., Yip, T. T., Tomita, M., & Hutchens, T. W. (1998). Direct evidence of the generation in human stomach of an antimicrobial peptide domain (lactoferricin) from ingested lactoferrin. *Biochimica Et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1429(1), 129–141.
- Legrand, D. (2016). Overview of lactoferrin as a natural immune modulator. *Journal of Pediatrics*, 173, S10–S15.
- Legrand, D., Ellass, E., Carpentier, M., & Mazurier, J. (2005). Lactoferrin: A modulator of immune and inflammatory responses. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62(22), 2549–2559.
- Lenman, A., Liaci, A. M., Liu, Y., Frangmyr, L., Frank, M., Blaum, B. S., ... Arnberg, N. (2018). Polysialic acid is a cellular receptor for human adenovirus 52. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(18), E4264–E4273.
- Levy, P. F., & Viljoen, M. (1995). Lactoferrin: A general review. *Haematologica*, 80(3), 252–267.
- Lonnerdal, B. (2009). Nutritional roles of lactoferrin. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, 12(3), 293–297.
- Ma, A. C., & Kubes, P. (2008). Platelets, neutrophils, and neutrophil extracellular traps (NETs) in sepsis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 6(3), 415–420.
- Metzboutique, M. H., Jolles, J., Mazurier, J., Schoentgen, F., Legrand, D., Spik, G., ... Jolles, P. (1984). Human lactotransferrin - amino-acid sequence and structural comparisons with other transferrins. *European Journal of Biochemistry*, 145(3), 659–676.
- Mühlenhoff, M., Rollenhagen, M., Werneburg, S., Gerardy-Schahn, R., & Hildebrandt, H. (2013). Polysialic acid: versatile modification of NCAM, SynCAM 1 and neuropilin-2. *Neurochemical Research*, 38(6), 1134–1143.
- N'Soukpoe-Kossi, C. N., Ragi, C., & Tajmir-Riahi, H. A. (2007). DNA interaction with RNase alters protein conformation. *DNA and Cell Biology*, 26(1), 28–35.
- Nagae, M., Ikeda, A., Hane, M., Hanashima, S., Kitajima, K., Sato, C., ... Yamaguchi, Y. (2013). Crystal structure of anti-polysialic acid antibody single chain Fv fragment complexed with octasialic acid: Insight into the binding preference for polysialic acid. *Journal of Biological Chemistry*, 288(47), 33784–33796.
- Nazir, S., Nasir, M., Yasmeen, A., & Usman, S. (2017). Review study on lactoferrin: A multifunctional protein. *Sky Journal of Food Science*, 6(2), 014–020.
- Okubo, K., Kamiya, M., Urano, Y., Nishi, H., Herter, J. M., Mayadas, T., ... Hirahashi, J. (2016). Lactoferrin suppresses neutrophil extracellular traps release in inflammation. *EBioMedicine*, 10, 204–215.
- Phillipson, M., & Kubes, P. (2011). The neutrophil in vascular inflammation. *Nature Medicine*, 17(11), 1381–1390.
- Rutishauser, U. (2008). Polysialic acid in the plasticity of the developing and adult vertebrate nervous system. *Nature Reviews Neuroscience*, 9(1), 26–35.
- Saffarzadeh, M., & Preissner, K. T. (2013). Fighting against the dark side of neutrophil extracellular traps in disease: Manoeuvres for host protection. *Current Opinion in Hematology*, 20(1), 3–9.
- Saffarzadeh, M., Jueneemann, C., Queisser, M. A., Lochnit, G., Barreto, G., Galuska, S. P., ... Preissner, K. T. (2012). Neutrophil extracellular traps directly induce epithelial and endothelial cell death: A predominant role of histones. *PLoS One*, 7(2), e32366.
- Sato, C., & Kitajima, K. (2013). Disialic, oligosialic and polysialic acids: Distribution, functions and related disease. *Journal of Biochemistry*, 154(2), 115–136.
- Schnaar, R. L., Gerardy-Schahn, R., & Hildebrandt, H. (2014). Sialic acids in the brain: Gangliosides and polysialic acid in nervous system development, stability, disease, and regeneration. *Physiological Reviews*, 94(2), 461–518.
- Shimazaki, K., Nam, M. S., Harakawa, S., Tanaka, T., Omata, Y., Saito, A., ... Suzuki, N. (1996). Monoclonal antibody against bovine lactoferricin(R) and its epitopic site. *Journal of Veterinary Medical Science*, 58(12), 1227–1229.
- Simon, P., Bäumler, S., Busch, O., Röhrich, R., Kaese, M., Richterich, P., ... Galuska, S. P. (2013). Polysialic acid is present in mammalian semen as a post-translational modification of the neural cell adhesion molecule NCAM and the polysialyltransferase STSII. *Journal of Biological Chemistry*, 288(26), 18825–18833.
- Simon, P., Feuerstacke, C., Kaese, M., Saboor, F., Middendorff, R., & Galuska, S. P. (2015). Polysialylation of NCAM characterizes the proliferation period of contractile elements during postnatal development of the epididymis. *PLoS One*, 10(3), e0123960.
- Stummeyer, K., Dickmanns, A., Mühlenhoff, M., Gerardy-Schahn, R., & Fieker, R. (2005). Crystal structure of the polysialic acid-degrading endosialidase of bacteriophage K1F. *Nature Structural amp; Molecular Biology*, 12(1), 90–96.
- Szecs, P. B., Dalgaard, D., Stakemann, G., Wagner, G., & Foltmann, B. (1989). The concentration of pepsinogen C in human semen and the physiological activation of zymogen in the vagina. *Biology of Reproduction*, 40(3), 653–659.
- Ulm, C., Saffarzadeh, M., Mahavadi, P., Müller, S., Prem, G., Saboor, F., ... Galuska, S. P. (2013). Soluble polysialylated NCAM: A novel player of the innate immune system in the lung. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 70(19), 3695–3708.
- Ulloa, P. E., Solis, C. J., De la Paz, J. F., Alaurant, T. G., Caruffo, M., Hernandez, A. J., & Feijoo, C. G. (2016). Lactoferrin Decreases the Intestinal Inflammation Triggered by a Soybean Meal-Based Diet in Zebrafish. *J. Immunol Res.* 1639720.
- Urban, C. F., Reichard, U., Brinkmann, V., & Zychlinsky, A. (2006). Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. *Cellular Microbiology*, 8(4), 668–676.
- van de Looij, Y., Ginot, V., Chatagner, A., Toulotte, A., Som, E., Huppi, P. S., ... Sizonenko, S. V. (2014). Lactoferrin during lactation protects the immature hypoxic-ischemic rat brain. *Annals of Clinical and Translational Neurology*, 1(12), 955–967.
- Villanueva, E., Yalavarthi, S., Berthier, C. C., Hodgins, J. B., Khandpur, R., Lin, A. M., ... Kaplan, M. J. (2011). Netting neutrophils induce endothelial damage, infiltrate tissues, and expose immunostimulatory molecules in systemic lupus erythematosus. *Journal of Immunology*, 187(1), 538–552.
- Vogel, H. J. (2012). Lactoferrin, a bird's eye view. *Biochemistry and Cell Biology-Biochimie et Biologie Cellulaire*, 90(3), 233–244.
- Wang, B. (2016). Molecular determinants of milk lactoferrin as a bioactive compound in early neurodevelopment and cognition. *Journal of Pediatrics*, 173(Suppl), S29–36.
- Weinhold, B., Seidenfaden, R., Rockle, I., Mühlenhoff, M., Schertzinger, F., Conzelmann, S., ... Hildebrandt, H. (2005). Genetic ablation of polysialic acid causes severe neurodevelopmental defects rescued by deletion of the neural cell adhesion molecule. *Journal of Biological Chemistry*, 280(52), 42971–42977.
- Xu, J., Zhang, X., Pelayo, R., Monestier, M., Ammollo, C. T., Semeraro, F., ... Esmon, C. T. (2009). Extracellular histones are major mediators of death in sepsis. *Nature Medicine*, 15(11), 1318–1321.
- 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. *Journal of Biological Chemistry*, 278(16), 13875–13880.
- Zlatina, K., Lutteke, T., & Galuska, S. P. (2017). Individual impact of distinct polysialic acid chain lengths on the cytotoxicity of histone H1, H2A, H2B, H3 and H4. *Polymers*, 9(12), 720.
- Zlatina, K., Saftnerberger, M., Kühnle, A., Galuska, C. E., Gartner, U., Rebl, A., ... Galuska, S. P. (2018). Polysialic acid in human plasma can compensate the cytotoxicity of histones. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(6).

Article

Polysialic Acid Modulates the Binding of External Lactoferrin in Neutrophil Extracellular Traps

Andrea Kühnle ^{1,2}, Thomas Lütteke ^{3,†} , Kim F. Bornhöfft ^{1,2} and Sebastian P. Galuska ^{1,2,*} 

¹ Institute of Reproductive Biology, Leibniz Institute for Farm Animal Biology (FBN), Wilhelm-Stahl-Allee 2, 18196 Dummerstorf, Germany; kuehnle@fbn-dummerstorf.de (A.K.); bornhoefft@fbn-dummerstorf.de (K.F.B.)

² Institute of Biochemistry, Faculty of Medicine, Justus-Liebig-University, Friedrichstr. 24, 35392 Giessen, Germany

³ Institute of Veterinary Physiology and Biochemistry, Justus-Liebig-University Giessen, Frankfurter Str. 100, 35392 Giessen, Germany; thomas@luetke-online.de

* Correspondence: galuska.sebastian@fbn-dummerstorf.de; Tel.: +49-38208-68-769

† Current Address: GIP Gesellschaft für innovative Personalwirtschaftssysteme mbH, Strahlenbergerstr. 112, 63067 Offenbach, Germany.

Received: 29 January 2019; Accepted: 21 March 2019; Published: 28 March 2019



Abstract: Neutrophil extracellular traps (NETs) are formed by neutrophils during inflammation. Among other things, these DNA constructs consist of antimicrobial proteins such as lactoferrin and histones. With these properties, NETs capture and destroy invading microorganisms. The carbohydrate polysialic acid (polySia) interacts with both lactoferrin and histones. Previous experiments demonstrated that, in humans, lactoferrin inhibits the release of NET and that this effect is supported by polySia. In this study, we examined the interplay of lactoferrin and polySia in already-formed NETs from bovine neutrophils. The binding of polySia was considered to occur at the lactoferrin (LFcin)-containing domain of lactoferrin. The interaction with the peptide LFcin was studied in more detail using groups of defined polySia chain lengths, which suggested a chain-length-dependent interaction mechanism with LFcin. The LFcin domain of lactoferrin was found to interact with DNA. Therefore, the possibility that polySia influences the integration of lactoferrin into the DNA-structures of NETs was tested by isolating bovine neutrophils and inducing NETosis. Experiments with NET fibers saturated with lactoferrin demonstrated that polySia initiates the incorporation of external lactoferrin in already-loaded NETs. Thus, polySia may modulate the constituents of NET.

Keywords: polysialic acid; lactoferrin; neutrophil extracellular traps; innate immune system

1. Introduction

The immune system is flexible and multifaceted. For instance, its most abundant leucocytes, neutrophil granulocytes, are able to use different mechanisms to combat pathogens [1–3]. In addition to phagocytosis and the release of antimicrobial components through degranulation, a beneficial suicide has been described that involves the release of decondensed DNA, which is associated with antimicrobial molecules [4]. The explosive release of the loaded DNA results in the vast spread of a three-dimensional (3D) DNA meshwork that surrounds the pathogens [4,5]. This molecular web is called a neutrophil extracellular trap (NET), as summarized by Brinkmann and Zychlinsky [6]. Since the DNA is equipped with antimicrobial components, such as histones, neutrophil elastase, lactoferrin, lysozyme, and catalase, the trapped pathogens can be efficiently killed [4,5]. One of the main advantages of NET is that these molecules remain at this hot spot; thus, high concentrations

of such antimicrobial mediators can be reached and/or retained. These high concentrations, while advantageous, also carry risk. For instance, extracellular histones are toxic not only for bacteria but also for endogenous cells [7–9]. Therefore, an exaggerated NET formation has been suggested to be associated with numerous pathologies [8,10–18]. However, several open questions and controversial opinions remain about the formation of NETs and their roles in health and disease, as summarized by Boeltz et al. [19].

Histones are one of the major protein fractions in NETs [6]. Distinct endogenous biomolecules, such as the carbohydrate polysialic acid (polySia), are able to bind histones and suppress their cytotoxicity in a chain-length-dependent manner [7,20–25]. PolySia, a linear homopolymer, consists of α 2,8-linked sialic acid residues, and its chains can reach a degree of polymerization (DP) above 90 [26–29]. In several body fluids, including blood, milk, and semen, polySia chains are present with the required DP for histone binding [20,30–32].

In these liquids, polySia is associated with a second important player of the innate immune system: lactoferrin [32]. Lactoferrin is a multifunctional immune protein continuously secreted by epithelial cells that also occurs in neutrophilic granules [33–39]. The diverse roles of lactoferrin are still being discussed; however, due to its high iron affinity, one of its most accepted antimicrobial characteristics is its ability to trap iron [34,35,40,41]. This creates iron-deficient areas and reduces bacterial growth. The same process may also occur in the case of NETs, since NETs are also loaded with lactoferrin by neutrophils during their formation. Lactoferrin was described to form a shell around activated neutrophils suppressing the release of NETs [42]. Thus, external lactoferrin might represent an inhibitory biomolecule for the formation of NETs [42]. We observed that polySia supports this effect of lactoferrin [32]. However, the interplay between lactoferrin and polySia in already-formed NET structures is unknown.

Since polySia binds not only lactoferrin but also histones of NETs, we hypothesize that it might be a potential modulator molecule of the accumulation of external lactoferrin in already existing NET fibers.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

For all experiments, the reagents that were used were of analytical grade. To use polySia (colominic acid; GERBU, Heidelberg, Germany) in the cell culture experiments, lipopolysaccharides (LPS) were removed, as previously described [23].

2.2. Isolation of Bovine Neutrophils

The isolation of bovine neutrophils was slightly modified from Schubert et al. [43]. Instead of a Ficoll solution, Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) was applied. RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) supplemented with 1% penicillin/streptomycin (*v/v*) was used as the cell culture medium. Neutrophils were isolated from leftover blood samples of regulatory blood collections from other projects/for other medical reasons in addition to blood from slaughterhouse animals. The blood samplings, as well as the slaughter processes, were performed in accordance with applicable laws, relevant guidelines, and provisions for ethical regulations.

2.3. Polysialylated Fluorescent Bead Accumulation in NETs

Prior to the coupling reaction, fluorescent latex beads (amine-modified polystyrene, fluorescent red, Sigma-Aldrich) were washed twice, subsequently resuspended, and ultrasonically homogenized in 123 μ L PBS (phosphate buffered saline). Next, 200 μ g of dried polySia were dissolved in 25 μ L PBS and added to the particles. We added 1.5 μ L 5 M NaCNBH₃, and the coupling reaction occurred for 2 h at 65 °C and 250 rpm. The received particles were washed twice and resuspended in 100 μ L PBS.

The bovine neutrophils were seeded in a poly-L-lysine-coated 12-well chamber slide (22,500 cells per chamber). For the induction of NETosis, phorbol myristate acetate (PMA) (1.5 μ M; Sigma-Aldrich) and calcium ionophore-ionomycin (3 μ M; Cell Signaling, Danvers, MS, USA) were added, and the cells were further incubated at 37 °C and 5% CO₂ for 4 h. After being washed twice with PBS, to remove the remaining stimuli, the cells were incubated with 1.43×10^5 polysialylated or unpolysialylated fluorescence particles/ μ L for 30 min at 37 °C in RPMI 1640. Afterward, the cells were fixed with 4% paraformaldehyde (PFA). Multiple further washes with PBS were conducted, and the cells were incubated with 0.5% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) for 1 min at 20 °C, then washed again with PBS. Finally, nucleus staining was performed using 1 μ g/mL 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Carl Roth, Karlsruhe, Germany). All images were captured with a Zeiss Axio Imager A1 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany).

2.4. Native Gel Electrophoresis

For native gel electrophoresis, lactoferrin-biotin, and bovine (source: milk) as well as human (source: milk) lactoferrin (Sigma-Aldrich) were incubated with different concentrations of polySia as previously described [32,44]. PolySia was incubated either with bovine/human milk lactoferrin or bovine lactoferricin (LFcin) (B25; Bachem, Bubendorf, Switzerland) in 50 mM Tris buffer for 1 h at 30 °C with shaking. Lactoferrin was incubated with a mixture of different chain lengths (colominic acid), whereas LFcin was incubated with groups of defined chain lengths. To this end, polySia was fractionated by the DP, as described by Galuska et al. [22]. Native agarose gels (2%) were dissolved in 25 mM Tris/HCl (pH 8.5) running buffer containing 19.2 mM glycine [44]. Samples were separated for ~3.5 h (LFcin) or ~4.5 h (bovine or human lactoferrin) at 80 V. Proteins were fixed overnight with 45% methanol:7.5% acetic acid (*v/v*) and were stained with Coomassie blue (Roti-Blue; Carl-Roth).

2.5. Biotinylation of Lactoferrin

To synthesize the biotinylated lactoferrin, the bovine protein was dissolved in 2-N-morpholino ethanesulfonic acid (MES) buffer (100 mM; pH 4.7–5.5), and an equal volume of biotin hydrazide (50 mM; Sigma-Aldrich) was added. The protein's carboxyl groups were activated through the addition of an 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC) solution (Fluka; Sigma-Aldrich) to a final concentration of 2.5 mM (*w/v*, in the MES buffer). The biotinylation mixture was incubated for 2 h on a shaker. Afterward, the remaining EDC and unbound biotin hydrazide was removed through dialysis overnight in 20 mM NaHCO₃ [45,46]. To test the biotinylation of the lactoferrin, the samples were denatured in Lane Marker Reducing Sample Buffer (Pierce, Thermo Fisher Scientific) for 5 min at 95 °C. The samples were run on a 13% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and either colored with Coomassie dye or blotted on a polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane. Membrane-bound lactoferrin-biotin was detected using a horseradish peroxidase (HRP)-streptavidin conjugate (1:10,000; Rockland Immunochemicals, Inc., Limerick, PA, USA).

2.6. Enrichment of Lactoferrin-Biotin in Bovine NET Fibers

The bovine neutrophil cells were seeded in a poly-L-lysine-coated 12-well chamber slide (30,000 cells per chamber). NETosis was induced by adding 3 μ M calcium ionophore-ionomycin and 150 nM PMA for 4 h at 37 °C in a CO₂ incubator. The cells were fixated by adding 4% PFA (*w/v*) for 1 h. Afterward, three subsequent loading steps were performed for 1 h on a shaker at 37 °C, first with bovine lactoferrin (200 μ g/mL), then with polySia (200 μ g/mL), and finally with lactoferrin-biotin (200 μ g/mL). The cells were permeabilized with 0.5% Triton X-100 (*v/v*) for 1 min and blocked with 2% IgG-free albumin (Carl-Roth). The lactoferrin-biotin was visualized with a murine monoclonal antibody against biotin that was fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated (1:200; Jackson ImmunoResearch Inc., West Grove, PA, USA). The DNA was stained with DAPI (1 μ g/mL). The NET cells were fixed again using 2% PFA (*w/v*) for 20 min. After these steps were completed, the cells were washed three times with PBS (pH 7.4). All images were taken with a Zeiss

Axio Imager A1 (Carl Zeiss). The data from the three different experimental approaches were pooled. Each experiment was performed as a double determination, and three pictures per well were analyzed. Histograms of the FITC (green; lactoferrin-biotin)-colored pictures were analyzed to calculate the fluorescence intensity using ImageJ (Vision 1.51 s) (<https://imagej.net/Contributors>) [47].

2.7. Statistical Analyses

The data sets were analyzed using ANOVA, and Tukey's tests were conducted for multiple comparisons using GraphPad Prism 7 software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Statistical significance differences were set as not significant (n.s.), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, and **** $p < 0.0001$.

2.8. 3D Simulations

For the 3D modeling of the lactoferrin-polySia interaction sites, YASARA software (YASARA Biosciences GmbH, Vienna, Austria) was used as previously described [23]. For human lactoferrin, the Protein Data Bank (PDB) entry code 1CB6 was used. PolySia chains with α 2,8-linked Neu5Ac residues (DP 20) were designed previously [23]. In the molecular dynamics (MD) simulation, four polySia chains were placed at a distance of 20–25 Å to lactoferrin in a water box. The binding simulation, using YASARA and an AMBER03 force field [48], was calculated for 7 and 5.6 ns.

To compare the amino acid sequences of lactoferrin in humans, cattle, goats, camels, and horses, an alignment of the lactoferrin sequences was performed using the online tool Clustal Omega (www.ebi.ac.uk) with protein-sequences P02788, P24627, Q29477, Q9TUM0, and O77811 from UniProt database: (www.uniprot.org). To visualize the identities of the sequences, Jalview (2.10.5) (<http://www.jalview.org/about/jalview-scientific-advisory-committee>) was used [49]. In addition, a 3D structural alignment of human (PDB entry 1CB6) and bovine (PDB entry 1BLF) lactoferrin was calculated using YASARA.

3. Results and Discussion

3.1. Accumulation of PolySia Coupled to Red Fluorescent Particles in NET Fibers

PolySia can mediate an accumulation of beads in NET, and this binding appears to be mediated by the interaction with histones [23]. However, in these experiments, the non-reducing ends of the chains were activated by oxidization, which led to a release of C8 and C9 of the carbon backbone in addition to the formation of an aldehyde group at C7. The resulting aldehyde group was used for the subsequent covalent coupling of the chemically modified polySia chains. In nature, however, a sialic acid polymer contains a free non-reducing end, since the other end—the reducing end—is attached to the glycoconjugates. This is also the case after the release of a polySia chain, for instance, due to a break in an internal linkage. In the first set of experiments, we investigated whether the naturally occurring form of polySia could also mediate the accumulation of beads into NET fibers, thus serving as an anchor molecule. To address this issue, polySia was coupled to red fluorescent latex particles using the reducing end. The resulting polysialylated beads were added to the NET filaments, which were produced by bovine neutrophils following stimulation with PMA and ionomycin. The DNA backbone of the NETs was visualized using DAPI. As shown in Figure 1, the polysialylated particles accumulated on the chromatin structures of the NETs. Unpolysialylated beads showed no specific accumulation on NET (Figure S1). Thus, independent of both its ends (reducing and non-reducing), a polySia chain can mediate the binding of its carrier to the NET. However, in the case of polysialylated proteins, the binding of polySia with its interaction partners may be modulated by several factors, such as the number of polySia chains per glycosylation site, the number of polysialylated glycosylation sites per protein backbone, and the localization at the protein backbone, in addition to the orientation of the polysialylated glycans.

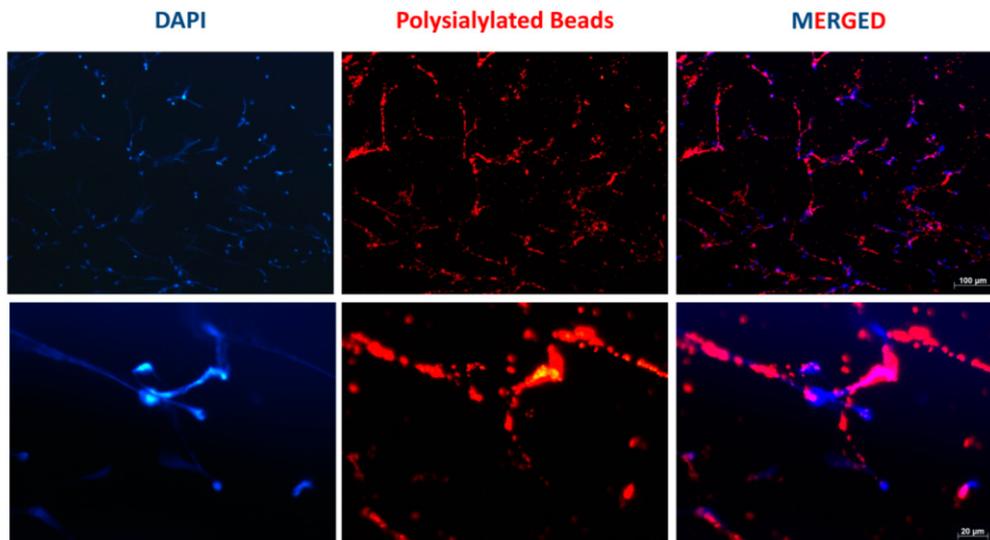


Figure 1. Polysialylated particles accumulating on the neutrophil extracellular trap (NET) fibers of bovine neutrophils. The neutrophils were isolated and stimulated with phorbol myristate acetate (PMA) and ionomycin to induce the formation of the NETs, and red fluorescent polysialylated particles were added. DNA staining was performed using 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (blue). Scale bars: 100 and 20 μm .

3.2. Interaction of PolySia with LFcIn Depends on Its DP

Besides histones, lactoferrin is also present in NETs and may represent another binding partner for polySia. The interaction seems to occur at the LFcIn-containing domain of lactoferrin, which is also a known DNA binding site [32,50–52]. To simulate a binding of polySia to lactoferrin, an MD simulation was calculated with the PDB structure of human lactoferrin and previously designed 20-degree long polySia chains [23]. In this simulation, four polySia chains were set in proximity to lactoferrin in a water box. After a calculated time of 7 ns, two of the chains were found to be in close contact with the lactoferrin (Figure 2 and Figure S2). The other two chains showed no migration to the protein backbone. One polySia chain interacted with the LFcIn-containing domain of lactoferrin in the simulation (Figure S3). These results are in line with previous experiments showing that an antibody against LFcIn inhibited the binding of polySia [32]. Regarding the MD simulation and the interaction area of the LFcIn domain, the MD simulation is just a simulation and can only suggest a possible interacting mechanism. When we repeated the simulation, the polySia chains, which interact with the LFcIn domain, were found in a different orientation (Figure S2b). Both models may only show the possibilities of initiating the interaction and not the final protein-carbohydrate complex. More detailed experimental analyses concerning the binding process (for example, using mutagenesis and co-crystallization) are necessary to determine the involved amino acid residues of LFcIn in detail and to produce an unambiguous 3D model of the lactoferrin-polySia complex.

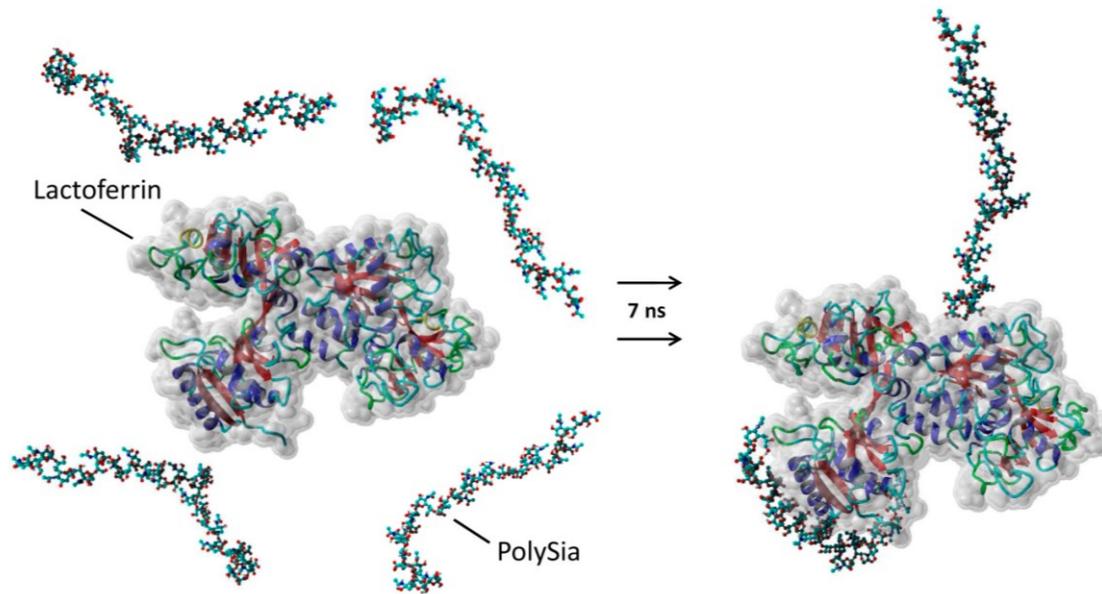


Figure 2. A molecular dynamics simulation of polysialic acid (polySia) binding to lactoferrin. Lactoferrin was placed with four polySia chains (20 sialic acid units) in a water box. After 7 calculated nanoseconds, the simulation showed two possible binding sites for polySia on the lactoferrin. Lactoferrin is displayed in a ribbon form with a dynamic surface. The polySia is shown in a ball-and-stick form, with hydrogen (gray), oxygen (red), carbon (turquoise), and nitrogen (blue) atoms.

In addition to the LFCin domain, the first MD simulation suggested that a second binding site might be present (Figure S2a). However, in the second simulation, only the LFCin domain was targeted by polySia chains (Figure S2b). No additional experimental evidence for this second binding domain currently exists to prove the simulation. Thus, in contrast with the LFCin domain, no significant evidence exists to support the presence of a binding area for α 2,8-linked sialic acid residues at this site.

The LFCin-containing domain is conserved in the lactoferrin of humans and farm animals that are commonly kept for milk production (Figures S4 and S5). Human milk, and especially bovine milk, are frequently used to purify lactoferrin for clinical products, functional food, and cosmetic products [53,54]; therefore, we chose to compare the interaction of polySia with human and bovine lactoferrin. To this end, human and bovine lactoferrin were separated using native gel electrophoresis in the presence and absence of various polySia concentrations. As shown in Figure 3, the lactoferrin of both species shows comparable migration characteristics in the presence of polySia. The changes in migration might reflect an altered total charge after the formation of protein/polySia complexes.

We then studied the interaction with LFCin (representing the antimicrobial peptide fragment of lactoferrin) in more detail using polySia of different chain lengths. As shown in Figure 4, changes in the DP up to 14 had only a slight influence on the migration of bovine LFCin. In contrast, longer polySia chains significantly enhanced migration to the anode. This observation is in line with previously published experiments using lactoferrin [32] and supports the suggestion that polySia interacts with the LFCin-containing domain in a chain-length-dependent manner.

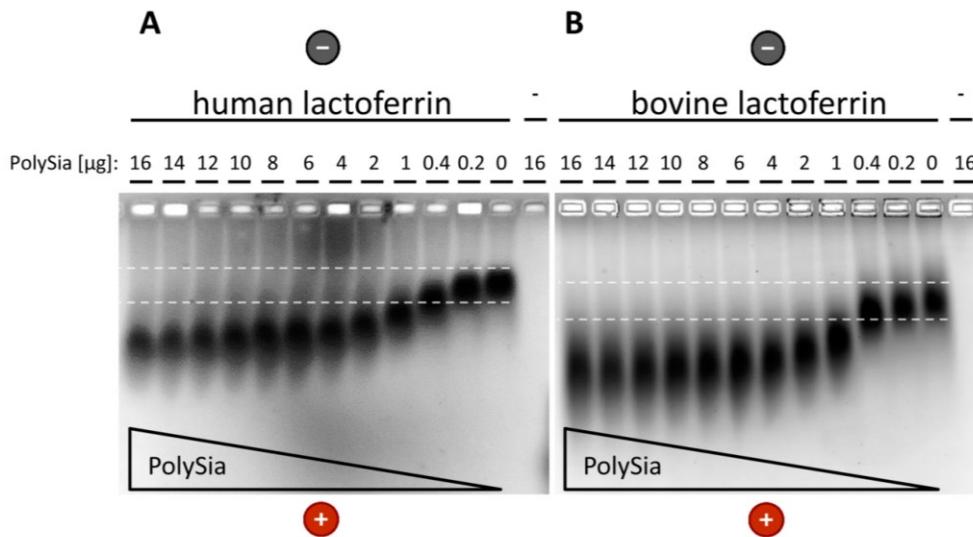


Figure 3. PolySia interacting comparably with (a) human and (b) bovine lactoferrin. The interaction of polySia with human and bovine lactoferrin was analyzed using a native agarose gel system. The lactoferrin (8 μ g; molecular weight of lactoferrin: bovine, 87 kDa; human, 82 kDa) was incubated with different amounts of polySia and subsequently separated through electrophoresis. Proteins were stained using Coomassie blue.

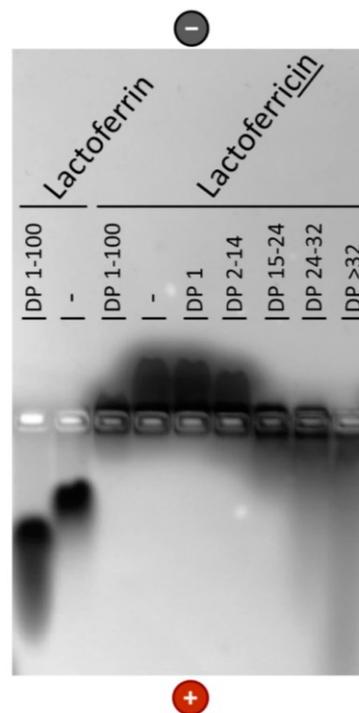


Figure 4. Lactoferricin (LFcin) interacts with polySia in a chain-length-dependent manner. Bovine LFcin (10 μ g; molecular weight of 3 kDa) was incubated with polySia (5 μ g) using groups with different degree of polymerization (DP). Subsequently, the samples were separated using native agarose gel electrophoresis. As positive control, lactoferrin was used (10 μ g). Proteins were stained with Coomassie blue.

3.3. PolySia Supports the Enrichment of External Lactoferrin into NET Fibers

As previously mentioned, lactoferrin is an important component of NETs. The binding of DNA is mediated by the LFcin domain [50–52]. The same domain also interacts with polySia [32]. This suggests that the polySia and DNA of NETs may compete for the binding of lactoferrin, and long polySia chains, which already bind histones, may mediate the binding of external lactoferrin, as shown in polysialylated particles (Figure 1) [23].

To test whether polySia influences the integration of bovine lactoferrin into NETs, *in vitro* experiments were performed using isolated bovine neutrophils. Since the lactoferrin of neutrophils is already incorporated into NETs during NETosis, we wanted to use biotinylated lactoferrin to distinguish between the lactoferrin of neutrophils and the added lactoferrin fraction.

In the first set of experiments, the applicability of biotinylated lactoferrin was tested. The applied biotinylation of lactoferrin targets the acidic groups (Figure 5a). A linkage strategy was selected because prevalent basic amino acids may initiate the binding between lactoferrin and polySia as well as DNA. Biotin hydrazide can be linked to the carboxyl groups of proteins following activation with EDC (Figure 5a). Lactoferrin has three possible reaction partners: the amino acids glutamate and aspartate and the sialic acid residues of glycans. In the reaction, the carboxyl groups of the protein can form an unstable O-acylisourea-intermediate with the EDC's carbodiimide reaction group. Through the addition of the primary amine biotin-hydrazide, the EDC is replaced by stable amide binding.

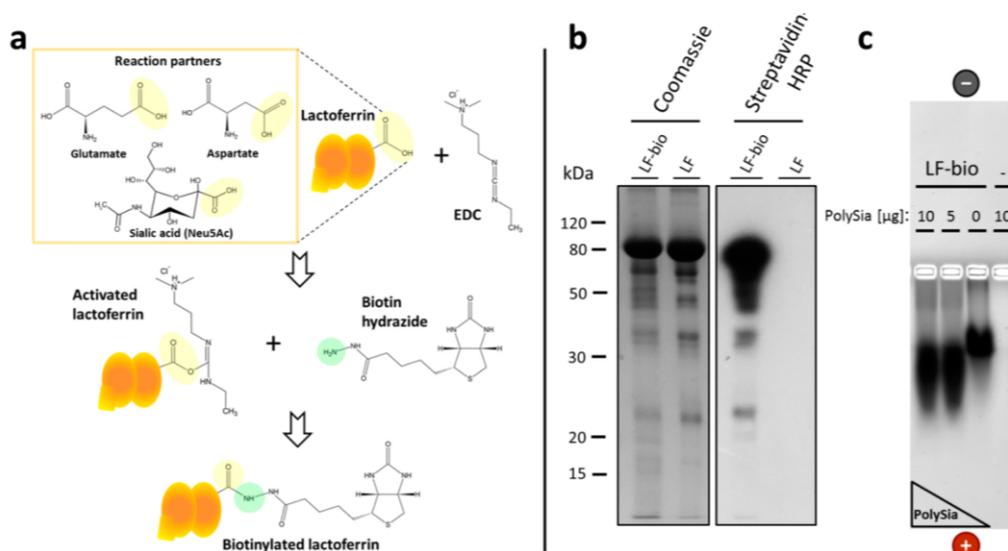


Figure 5. Biotinylation of bovine lactoferrin. (a) Bovine lactoferrin was biotinylated using 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC) and biotin-hydrazide under acidic conditions. (b) Biotinylation of lactoferrin was controlled using Coomassie staining and streptavidin-horseradish peroxidase (HRP). Therefore, unbiotinylated lactoferrin (LF) and biotinylated lactoferrin (LF-bio) were used. (c) The biotinylated lactoferrin was incubated with different amounts of polySia and subsequently separated using native gel electrophoresis.

At first, a successful biotinylation of lactoferrin was checked using SDS-gel electrophoresis (Figure 5b). Lactoferrin was visualized with Coomassie blue. The unmodified and biotinylated forms of the lactoferrin showed slightly different migration characteristics. The biotinylated form ran marginally higher, which may have been a result of the attached covalent biotin molecules.

The biotinylation was additionally tested through Western blotting using HRP-conjugated streptavidin (Figure 5b). As expected, the biotinylated lactoferrin showed a strong signal in contrast with the unbiotinylated lactoferrin, demonstrating that the lactoferrin was successfully biotinylated.

In a further experiment, the interaction between biotinylated lactoferrin and polySia was tested using native gel electrophoresis (Figure 5c). Here, biotinylated lactoferrin was incubated with different concentrations of polySia. The results indicated that polySia changed the migration of the biotinylated lactoferrin. Thus, complex formation is not influenced by biotinylation.

To address the question as to whether polySia can modulate the integration of external lactoferrin into exposed NET fibers, a binding assay with the biotinylated form was designed. In this assay, the NET fibers of stimulated bovine neutrophils were incubated with biotinylated lactoferrin. The binding of the biotinylated lactoferrin was visualized using FITC-conjugated antibodies against biotin. As expected, the biotinylated lactoferrin accumulated on the DNA fibers of the NETs (Figure 6a). The integration of biotinylated lactoferrin can be inhibited when its binding sites in NET are already blocked by lactoferrin before the application of biotinylated lactoferrin, resulting in a decreased fluorescence staining (Figure 6). Thus, in already loaded DNA, the integration of additional external lactoferrin is repressed.

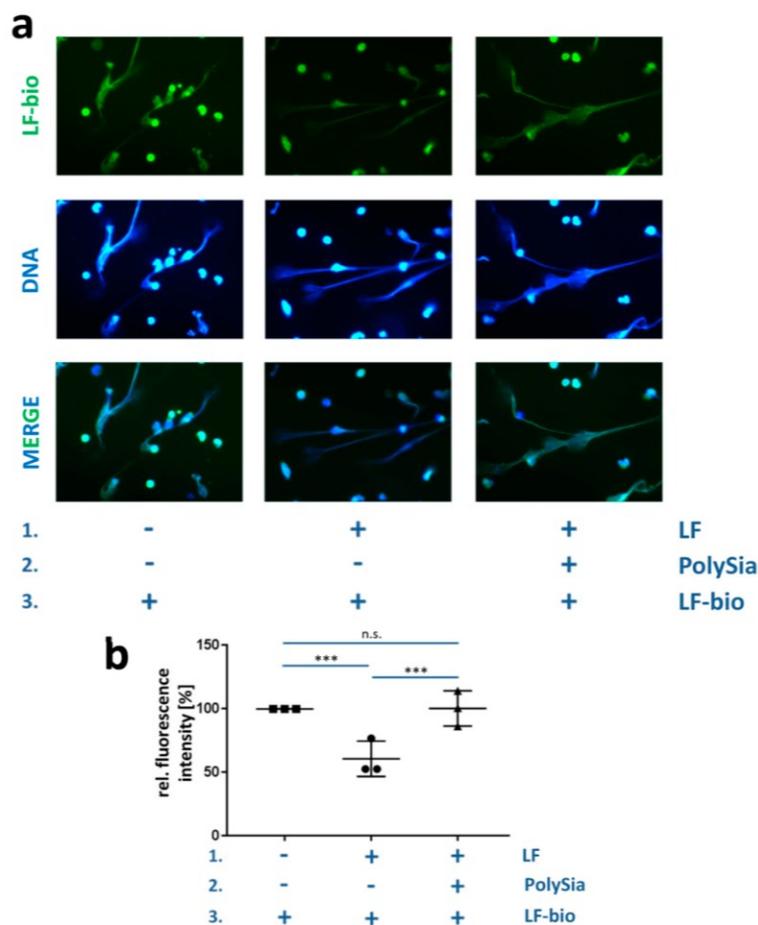


Figure 6. PolySia modulates the integration of lactoferrin into NETs. (a) After the formation of the NET fibers by induced bovine neutrophils, the fibers were treated in three successive steps: (1) Unbiotinylated lactoferrin, (2) polySia, and (3) lactoferrin-biotin. Three different combinations were applied. DAPI (blue) was used to stain the DNA, and lactoferrin-biotin (green) was visualized with an antibody against biotin. The scale bar represents 100 μ m. (b) Quantification of lactoferrin-staining. The values for lactoferrin-biotin alone were set to 100%. Note: n.s. denotes not significant, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$.

However, the addition of polySia after the addition of native lactoferrin, but prior to the application of biotinylated lactoferrin, initiated the integration of novel lactoferrin into NETs. Due to the application of polySia, comparable staining intensities were determined in the case of unsaturated and presaturated NETs. This means that, overall, comparable amounts of biotinylated lactoferrin were assimilated (Figure 6b). Therefore, the previously presaturated NET was again able to uptake biotinylated lactoferrin, suggesting that polySia can create binding areas for external lactoferrin in NETs that have already been loaded with lactoferrin. Since the LFCin domain can bind both polySia and DNA, these results suggest that the DNA of NETs directly competes with polySia for lactoferrin binding. Thus, polySia and DNA are competitors for the same binding domain of lactoferrin and might dynamically modulate an exchange of lactoferrin by altering the interactions with the LFCin domain.

However, as shown in Figure 1 for polysialylated beads, polySia chains can also act as molecular anchors for NETs when these chains are covalently coupled to a carrier. Therefore, another possibility might be that free long polySia chains can bind to more than one interaction partner, as mentioned above. Consequently, the binding of polySia to histones could create additional interaction possibilities for lactoferrin binding when enough free sialic acid residues of histone-bound polySia chains are still unoccupied. This would generate additional binding sites for lactoferrin apart from the DNA. However, no evidence exists for this type of mechanism at the moment.

4. Conclusions

One of the most important antimicrobial functions of lactoferrin is its ability to capture iron and make it unavailable to bacteria [34,35,40,41]. A dynamic and fluid interplay between lactoferrin, soluble polySia, polySia/histone-complexes, and DNA would allow an exchange of lactoferrin and thus a modulation of the constituents of NET. Via a switch to different binding partners, matured lactoferrin might be replaced by external lactoferrin. Through this process, iron-deficient areas could be maintained to inhibit bacterial growth in NETs.

Supplementary Materials: The following are available online at https://zenodo.org/record/2613411#.XJyW_KIRWUk: Figure S1: Unpolysialylated particles show no specific accumulation on the NET fibers of bovine neutrophils; Figure S2: Rotatable three-dimensional (3D) models of two independently simulated interactions between polySia and lactoferrin; Figure S3: Detailed depiction of the LFCin-containing domain of lactoferrin and the interacting polySia chain (MD simulation result); Figure S4: 3D structural alignment of human and bovine lactoferrin; and Figure S5: Sequence alignment of lactoferrin using the sequences of humans, bovine animals, goats, horses, and camels.

Author Contributions: All authors conceived and designed the experiments. A.K., T.L., and K.F.B. performed the experiments and analyzed along with S.P.G. the data; A.K. and S.P.G. wrote the paper.

Funding: This work was supported by a grant from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (GA 1755/1-2).

Acknowledgments: The authors are thankful for the excellent technical help provided by Gesine Krüger and Christina E. Galuska for critical remarks. In addition, we gratefully thank Andreas Vernunft for the blood samples.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest. The funders had no role in the design of the study, in the collection, analyses, or interpretation of the data, in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Gray, R.D.; McCullagh, B.N.; McCray, P.B. Nets and cf lung disease: Current status and future prospects. *Antibiotics* **2015**, *4*, 62–75. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Fournier, B.M.; Parkos, C.A. The role of neutrophils during intestinal inflammation. *Mucosal Immunol.* **2012**, *5*, 354–366. [[CrossRef](#)]
3. Phillipson, M.; Kubes, P. The neutrophil in vascular inflammation. *Nat. Med.* **2011**, *17*, 1381–1390. [[CrossRef](#)]
4. Brinkmann, V.; Reichard, U.; Goosmann, C.; Fauler, B.; Uhlemann, Y.; Weiss, D.S.; Weinrauch, Y.; Zychlinsky, A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* **2004**, *303*, 1532–1535. [[CrossRef](#)]

5. Urban, C.F.; Ermert, D.; Schmid, M.; Abu-Abed, U.; Goosmann, C.; Nacken, W.; Brinkmann, V.; Jungblut, P.R.; Zychlinsky, A. Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against candida albicans. *PLoS Pathog.* **2009**, *5*, e1000639. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Brinkmann, V.; Zychlinsky, A. Beneficial suicide: Why neutrophils die to make nets. *Nat. Rev. Microbiol.* **2007**, *5*, 577–582. [[CrossRef](#)]
7. Saffarzadeh, M.; Juenemann, C.; Queisser, M.A.; Lochnit, G.; Barreto, G.; Galuska, S.P.; Lohmeyer, J.; Preissner, K.T. Neutrophil extracellular traps directly induce epithelial and endothelial cell death: A predominant role of histones. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e32366. [[CrossRef](#)]
8. Xu, J.; Zhang, X.; Pelayo, R.; Monestier, M.; Ammollo, C.T.; Semeraro, F.; Taylor, F.B.; Esmon, N.L.; Lupu, F.; Esmon, C.T. Extracellular histones are major mediators of death in sepsis. *Nat. Med.* **2009**, *15*, 1318–1321. [[CrossRef](#)]
9. Kawasaki, H.; Iwamuro, S. Potential roles of histones in host defense as antimicrobial agents. *Infect. Disord. Drug Targets* **2008**, *8*, 195–205. [[CrossRef](#)]
10. Hoeksema, M.; van Eijk, M.; Haagsman, H.P.; Hartshorn, K.L. Histones as mediators of host defense, inflammation and thrombosis. *Future Microbiol.* **2016**, *11*, 441–453. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Varju, I.; Longstaff, C.; Szabo, L.; Farkas, A.Z.; Varga-Szabo, V.J.; Tanka-Salamon, A.; Machovich, R.; Kolev, K. DNA, histones and neutrophil extracellular traps exert anti-fibrinolytic effects in a plasma environment. *Thromb. Haemost.* **2015**, *113*, 1289–1298. [[CrossRef](#)]
12. Fuchs, T.A.; Bhandari, A.A.; Wagner, D.D. Histones induce rapid and profound thrombocytopenia in mice. *Blood* **2011**, *118*, 3708–3714. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Yang, S.; Qi, H.; Kan, K.; Quan, C.; Xie, H.; Guo, X.; Zhang, L. Neutrophil extracellular traps promote hypercoagulability in patients with sepsis. *Shock* **2017**, *47*, 132–139. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Wright, T.K.; Gibson, P.G.; Simpson, J.L.; McDonald, V.M.; Wood, L.G.; Baines, K.J. Neutrophil extracellular traps are associated with inflammation in chronic airway disease. *Respirology* **2016**, *21*, 467–475. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Sorensen, O.E.; Borregaard, N. Neutrophil extracellular traps—The dark side of neutrophils. *J. Clin. Investig.* **2016**, *126*, 1612–1620. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Porto, B.N.; Stein, R.T. Neutrophil extracellular traps in pulmonary diseases: Too much of a good thing? *Front. Immunol.* **2016**, *7*, 311. [[CrossRef](#)]
17. Nakazawa, D.; Kumar, S.; Desai, J.; Anders, H.J. Neutrophil extracellular traps in tissue pathology. *Histol. Histopathol.* **2016**, *32*, 203–2013.
18. Hasler, P.; Giaglis, S.; Hahn, S. Neutrophil extracellular traps in health and disease. *Swiss Med. Wkl.* **2016**, *146*, w14352. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Boeltz, S.; Amini, P.; Anders, H.-J.; Andrade, F.; Bilyy, R.; Chatfield, S.; Cichon, I.; Clancy, D.M.; Desai, J.; Dumych, T.; et al. To net or not to net: Current opinions and state of the science regarding the formation of neutrophil extracellular traps. *Cell Death Differ.* **2019**, *26*, 395–408. [[CrossRef](#)]
20. Zlatina, K.; Saftenerberger, M.; Kuhnle, A.; Galuska, C.E.; Gartner, U.; Rebl, A.; Oster, M.; Vernunft, A.; Galuska, S.P. Polysialic acid in human plasma can compensate the cytotoxicity of histones. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 1679. [[CrossRef](#)]
21. Zlatina, K.; Lutteke, T.; Galuska, S.P. Individual impact of distinct polysialic acid chain lengths on the cytotoxicity of histone h1, h2a, h2b, h3 and h4. *Polymers* **2017**, *9*, 720. [[CrossRef](#)]
22. Galuska, S.P.; Galuska, C.E.; Tharmalingam, T.; Zlatina, K.; Prem, G.; Husejnov, F.C.O.; Rudd, P.M.; Vann, W.F.; Reid, C.; Vionnet, J.; et al. In vitro generation of polysialylated cervical mucins by bacterial polysialyltransferases to counteract cytotoxicity of extracellular histones. *FEBS J.* **2017**, *284*, 1688–1699. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Galuska, C.E.; Dambon, J.A.; Kuhnle, A.; Bornhofft, K.F.; Prem, G.; Zlatina, K.; Lutteke, T.; Galuska, S.P. Artificial polysialic acid chains as sialidase-resistant molecular-anchors to accumulate particles on neutrophil extracellular traps. *Front. Immunol.* **2017**, *8*, 1229. [[CrossRef](#)]
24. Ulm, C.; Saffarzadeh, M.; Mahavadi, P.; Müller, S.; Prem, G.; Saboor, F.; Simon, P.; Middendorff, R.; Geyer, H.; Henneke, I.; et al. Soluble polysialylated ncsm: A novel player of the innate immune system in the lung. *Cell. Mol. Life Sci.* **2013**, *70*, 3695–3708. [[CrossRef](#)]

25. Mishra, B.; von der Ohe, M.; Schulze, C.; Bian, S.; Makhina, T.; Loers, G.; Kleene, R.; Schachner, M. Functional role of the interaction between polysialic acid and extracellular histone h1. *J. Neurosci.* **2010**, *30*, 12400–12413. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Galuska, C.E.; Lutteke, T.; Galuska, S.P. Is polysialylated ncam not only a regulator during brain development but also during the formation of other organs? *Biology* **2017**, *6*, 27. [[CrossRef](#)]
27. Finne, J. Occurrence of unique polysialosyl carbohydrate units in glycoproteins of developing brain. *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 1966–1970.
28. Galuska, S.P.; Geyer, R.; Gerardy-Schahn, R.; Mühlenhoff, M.; Geyer, H. Enzyme-dependent variations in the polysialylation of the neural cell adhesion molecule (ncam) in vivo. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 17–28. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Galuska, S.P.; Oltmann-Norden, I.; Geyer, H.; Weinhold, B.; Kuchelmeister, K.; Hildebrandt, H.; Gerardy-Schahn, R.; Geyer, R.; Mühlenhoff, M. Polysialic acid profiles of mice expressing variant allelic combinations of the polysialyltransferases st8siaii and st8siaiv. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 31605–31615. [[CrossRef](#)]
30. Simon, P.; Bäumner, S.; Busch, O.; Röhrich, R.; Kaese, M.; Richterich, P.; Wehrend, A.; Müller, K.; Gerardy-Schahn, R.; Mühlenhoff, M.; et al. Polysialic acid is present in mammalian semen as a post-translational modification of the neural cell adhesion molecule ncam and the polysialyltransferase st8siaii. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 18825–18833. [[CrossRef](#)]
31. Yabe, U.; Sato, C.; Matsuda, T.; Kitajima, K. Polysialic acid in human milk. Cd36 is a new member of mammalian polysialic acid-containing glycoprotein. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 13875–13880. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Kühnle, A.; Veelken, R.; Galuska, C.E.; Saftenberger, M.; Verleih, M.; Schuppe, H.C.; Rudloff, S.; Kunz, C.; Galuska, S.P. Polysialic acid interacts with lactoferrin and supports its activity to inhibit the release of neutrophil extracellular traps. *Carbohydr. Polym.* **2019**, *208*, 32–41. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Arnljots, K.; Sorensen, O.; Lolllike, K.; Borregaard, N. Timing, targeting and sorting of azurophil granule proteins in human myeloid cells. *Leukemia* **1998**, *12*, 1789–1795. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Nazir, S.; Nasir, M.; Yasmeen, A.; Usman, S. Review study on lactoferrin: A multifunctional protein. *Sky J. Food Sci.* **2017**, *6*, 014–020.
35. Vogel, H.J. Lactoferrin, a bird's eye view. *Biochem. Cell Biol.* **2012**, *90*, 233–244. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Legrand, D. Overview of lactoferrin as a natural immune modulator. *J. Pediatr.* **2016**, *173*, S10–S15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Inoue, M.; Yamada, J.; Kitamura, N.; Shimazaki, K.; Andren, A.; Yamashita, T. Immunohistochemical localization of lactoferrin in bovine exocrine glands. *Tissue Cell* **1993**, *25*, 791–797. [[CrossRef](#)]
38. Steijns, J.M.; van Hooijdonk, A.C.M. Occurrence, structure, biochemical properties and technological characteristics of lactoferrin. *Br. J. Nutr.* **2000**, *84*, S11–S17. [[CrossRef](#)]
39. Levay, P.F.; Viljoen, M. Lactoferrin—A general-review. *Haematologica* **1995**, *80*, 252–267. [[PubMed](#)]
40. Bullen, J.J.; Rogers, H.J.; Leigh, L. Iron-binding proteins in milk and resistance to escherichia-coli infection in infants. *BMJ Br. Med. J.* **1972**, *1*, 69–75. [[CrossRef](#)]
41. Sherman, M.P.; Adamkin, D.H.; Radmacher, P.G.; Sherman, J.; Niklas, V. Protective proteins in mammalian milks: Lactoferrin steps forward. *NeoReviews* **2012**, *13*, e293–e301. [[CrossRef](#)]
42. Okubo, K.; Kamiya, M.; Urano, Y.; Nishi, H.; Herter, J.M.; Mayadas, T.; Hirohama, D.; Suzuki, K.; Kawakami, H.; Tanaka, M.; et al. Lactoferrin suppresses neutrophil extracellular traps release in inflammation. *EBioMedicine* **2016**, *10*, 204–215. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Schuberth, H.-J.; Krueger, C.; Hendricks, A.; Bimczok, D.; Leibold, W. Superantigen-dependent accelerated death of bovine neutrophilic granulocytes in vitro is mediated by blood mononuclear cells. *Immunobiology* **2000**, *202*, 493–507. [[CrossRef](#)]
44. Kim, R.; Yokota, H.; Kim, S.H. Electrophoresis of proteins and protein-protein complexes in a native agarose gel. *Anal. Biochem.* **2000**, *282*, 147–149. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Hensley, K. Detection of protein carbonyls by means of biotin hydrazide-streptavidin affinity methods. *Methods Mol. Biol.* **2009**, *536*, 457–462. [[PubMed](#)]
46. Kang, C.D.; Cao, C.; Lee, J.; Choi, I.S.; Kim, B.W.; Sim, S.J. Surface plasmon resonance-based inhibition assay for real-time detection of cryptosporidium parvum oocyst. *Water Res.* **2008**, *42*, 1693–1699. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

47. Schindelin, J.; Arganda-Carreras, I.; Frise, E.; Kaynig, V.; Longair, M.; Pietzsch, T.; Preibisch, S.; Rueden, C.; Saalfeld, S.; Schmid, B.; et al. Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* **2012**, *9*, 676–682. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Duan, Y.; Wu, C.; Chowdhury, S.; Lee, M.C.; Xiong, G.; Zhang, W.; Yang, R.; Cieplak, P.; Luo, R.; Lee, T.; et al. A point-charge force field for molecular mechanics simulations of proteins based on condensed-phase quantum mechanical calculations. *J. Comput. Chem.* **2003**, *24*, 1999–2012. [[CrossRef](#)]
49. Waterhouse, A.M.; Procter, J.B.; Martin, D.M.; Clamp, M.; Barton, G.J. Jalview version 2—A multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* **2009**, *25*, 1189–1191. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Van Berkel, P.H.; Geerts, M.E.; van Veen, H.A.; Mericskay, M.; de Boer, H.A.; Nuijens, J.H. N-terminal stretch arg2, arg3, arg4 and arg5 of human lactoferrin is essential for binding to heparin, bacterial lipopolysaccharide, human lysozyme and DNA. *Biochem. J.* **1997**, *328*, 145–151. [[CrossRef](#)]
51. Bellamy, W.; Takase, M.; Yamauchi, K.; Wakabayashi, H.; Kawase, K.; Tomita, M. Identification of the bactericidal domain of lactoferrin. *Biochim. Biophys. Acta* **1992**, *1121*, 130–136. [[CrossRef](#)]
52. EllassRochard, E.; Roseanu, A.; Legrand, D.; Trif, M.; Salmon, V.; Motas, C.; Montreuil, J.; Spik, G. Lactoferrin-lipopolysaccharide interaction: Involvement of the 28-34 loop region of human lactoferrin in the high-affinity binding to escherichia coli 055b5 lipopolysaccharide. *Biochem. J.* **1995**, *312*, 839–845. [[CrossRef](#)]
53. Wang, B.; Timilsena, Y.P.; Blanch, E.; Adhikari, B. Lactoferrin: Structure, function, denaturation and digestion. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2017**, 1–17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Lonnerdal, B. Nutritional roles of lactoferrin. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **2009**, *12*, 293–297. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Communication

The Bovine Antimicrobial Peptide Lactoferricin Interacts with Polysialic Acid without Loss of Its Antimicrobial Activity against *Escherichia coli*

Andrea Kühnle ^{1,2}, Christina E. Galuska ^{1,2}, Kristina Zlatina ¹  and Sebastian P. Galuska ^{1,2,*}

¹ Institute of Reproductive Biology, Leibniz Institute for Farm Animal Biology (FBN), Wilhelm-Stahl-Allee 2, 18196 Dummerstorf, Germany; kuehnle@fbn-dummerstorf.de (A.K.); Galuska.christina@fbn-dummerstorf.de (C.E.G.); Zlatina@fbn-dummerstorf.de (K.Z.)

² Institute of Biochemistry, Faculty of Medicine, Justus-Liebig-University, Friedrichstr. 24, 35392 Giessen, Germany

* Correspondence: galuska.sebastian@fbn-dummerstorf.de; Tel.: +49-38208-68-769

Received: 6 November 2019; Accepted: 15 December 2019; Published: 18 December 2019



Simple Summary: Bovine milk contains a high concentration of the protein lactoferrin. It is an important antimicrobial biomolecule, which is also present in other bodily fluids like blood and semen. However, not only the intact protein but also its cleavage products have antimicrobial activity. Perhaps, the best-known cleavage product of lactoferrin is the peptide lactoferricin that has significant antimicrobial capacity against a broad range of pathogens such as enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC). Interestingly, lactoferricin can interact with the sugar polymer polysialic acid, which is also present in milk, blood, and semen. In the present study, we tested if the binding to polysialic acid influences the biological activity of bovine lactoferricin. Remarkably, neither different amounts of polysialic acid nor different chain lengths of this sugar polymer influenced the antimicrobial activity of lactoferricin. The ability of polysialic acid to bind and not inactivate lactoferricin may allow the development of novel endogenous and biodegradable polysialylated surfaces and/or hydrogels, which can be loaded with the antimicrobial peptide lactoferricin for biomedical applications in veterinary and human medicine.

Abstract: The lactoferrin-derived peptide lactoferricin (LFcin) belongs to the family of antimicrobial peptides, and its bovine form has already been successfully applied to counteract enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) infection. Recently, it was described that LFcin interacts with the sugar polymer polysialic acid (polySia) and that the binding of lactoferrin to polySia is mediated by LFcin, included in the N-terminal domain of lactoferrin. For this reason, the impact of polySia on the antimicrobial activity of bovine LFcin was investigated. Initially, the interaction of LFcin was characterized in more detail by native agarose gel electrophoresis, demonstrating that a chain length of 10 sialic acid residues was necessary to bind LFcin, whereas approximately twice-as-long chains were needed to detect binding of lactoferrin. Remarkably, the binding of polySia showed, independently of the chain length, no impact on the antimicrobial effects of LFcin. Thus, LFcin binds polySia without loss of its protective activity as an antimicrobial peptide.

Keywords: lactoferrin; lactoferricin; polysialic acid; sialic acids; antimicrobial peptides; innate immune system

1. Introduction

Lactoferrin is a multifunctional iron-binding glycoprotein with strong ability to modulate and support the immune system [1–7]. Interestingly, lactoferrin can be found in nearly all bodily fluids.

Lactoferrin can be excreted by epithelial cells, and the highest amounts have been determined in breast milk [8,9]. Besides epithelial cells, neutrophil granulocytes belong to the major producer of lactoferrin and, thus, high concentrations of lactoferrin can be found at inflammatory hotspots [7,8,10].

Recently, the linear carbohydrate polysialic acid (polySia) has been identified as a probable binding partner for lactoferrin [11,12]. The building units of this polysaccharide are sialic acids, a group of α -keto acids with a nine-carbon backbone [13]. The sialic acid residues are mainly attached to each other via α 2,9 and/or α 2,8 linkages [14]. In mammals, however, only α 2,8-linked polymers, consisting of N-acetylneuraminic acid (Neu5Ac) residues, seem to be generated, modulating numerous physiological processes, such as the development of the brain and other organs, in addition to immunological mechanisms [13,15–22]. Interestingly, polySia and lactoferrin can be detected in the same bodily fluids, such as ejaculates, blood, and milk, suggesting that polySia influences the functional properties of lactoferrin [1,12,23–25]. Indeed, polySia has been shown to support the activity of lactoferrin in inhibiting the release of neutrophil extracellular traps (NET) [3,12]. NET is a pathogen-catching meshwork of decondensed DNA and antimicrobial molecules that can be formed by neutrophil granulocytes during inflammation [26], and polySia is only one example of several carbohydrate-based mechanisms that influence the formation and functionality of NET [27]. Besides the interplay with lactoferrin during NET formation, polySia seems to modulate the binding of lactoferrin to DNA of already-released NET filaments [11]. This might be possible, since both DNA and polySia molecules mainly interact with the N-terminal domain of lactoferrin [11,28]. This domain is one of the main structural differences between lactoferrin and its iron-transporting family member, transferrin. Interestingly, this cationic domain can be released under acidic conditions or by proteolytic cleavage with pepsin. The resulting peptide is called lactoferricin (LFcin), and besides mammalian proteases, bacterial enzymes are also able to initiate the release of LFcin. The formation of LFcin and other antimicrobial degradation products of lactoferrin was observed in the stomach and other areas during inflammation [6,29–31]. The proteolytic release might be an advantage due to the commonly stronger antimicrobial activity of LFcin compared to lactoferrin [5,6,29,32–34]. These antibacterial effects, in addition to the observation that bacteria show increasing resistance against antibiotics, make LFcin an interesting alternative or additional therapeutic agent in veterinary and human medicine [34].

It has already been shown that polySia interacts with the LFcin-containing domain in lactoferrin, as well as with the released antimicrobial peptide LFcin [11,12]. Remarkably, polySia also interacts with histones [35,36], which are, like LFcin, denoted as antimicrobial peptides [37–39]. Besides the best known function of histones in the packaging of DNA, extracellular histones and their fragments are part of the innate immune system [40], and their antimicrobial capacities have been described in many animal classes, such as insects, fish, amphibians, birds, and mammals [41–45]. In the case of histones, it is known that polySia influences their interactions and/or activity in a chain-length-dependent manner [46–48]. However, this interaction does not necessarily have an effect on the functionality of the interaction partners. For instance, the antimicrobial activity of histone H3 is inhibited by polySia, whereas those of the lysine-rich histone H1 is not affected in the presence of polySia [49]. For this reason, we wanted to investigate if polySia has an impact on the antimicrobial capacity of LFcin. To this end, we first characterized the interaction of LFcin and polySia in more detail by using native gel electrophoresis and ELISA with defined chain lengths of polySia. Furthermore, the impact of LFcin on bacterial growth was investigated in the presence of polySia.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

The reagents used for all the following experiments were of analytical grade. The *Escherichia coli* strain BL21 (DE3) was kindly provided by the lab of Joachim Weitzel. In the experiments, lactoferrin from bovine milk (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), bovine LFcin (B25; Bachem, Bubendorf, Switzerland), Neu5Ac (MonoSia; Carbosynth, Compton, UK), and colominic acid (polySia) (Gerbu,

Heidelberg, Germany) were used. Lipopolysaccharides (LPS) were removed from polySia with C18 cartridges (ThermoFisher Scientific, Dreieich, Germany), as described in the manufacturer's manual.

2.2. Fractionation and Analysis of Neu5Ac Polymers

In order to obtain polySia fractions with defined degrees of polymerization (DP), commercially available polySia (a heterogeneous mixture of different chain lengths) was separated by anion-exchange chromatography [46,47]. To receive greater amounts of shorter polySia chain lengths (for native agarose gel electrophoresis and competitive ELISA), polySia was previously partially hydrolyzed. Therefore, polySia was incubated in a reaction buffer (9 mM sodium hydrosulfite, 0.5 M β -mercaptoethanol, 20 mM trifluoroacetic acid [TFA]) for 45 min at 55 °C. To stop the hydrolysis, 20% 1 M NaOH (*v/v*) was added. PolySia separation took place with MilliQ water (E1) and 2 M ammonium acetate buffer (E2) on a DNAPac™ PA100 column (22 mm \times 250 mm, 13 μ m; ThermoFisher Scientific) at a flow rate of 2.5 mL/min. The gradient was the following: 0 min = 0% (*v/v*) E2, 5 min = 0% (*v/v*) E2, 20 min = 26% (*v/v*) E2, 30 min = 34% (*v/v*) E2, 45 min = 38% (*v/v*) E2, 85 min = 44% (*v/v*) E2, 110 min = 100% (*v/v*) E2, 140 min = 100% (*v/v*) E2, 141 min = 0% (*v/v*) E2. To remove ammonium acetate, the samples were dried by lyophilization and evaporation.

Then, 0.01% of the gained fractions were quantified with the eluents methanol/acetonitrile/water/trifluoroacetic acid (TFA) (4:4:92:0.1; E3) and methanol/acetonitrile/water/TFA (45:45:10:0.1; E4) on a Superspher 100 C-18 column (250 mm \times 40 mm; Merck-Hitachi, Darmstadt, Germany). After hydrolysis in 0.2 M TFA for 4 h at 80 °C, the samples were dried, and Neu5Ac residues were labeled with 4,5-methylene dioxybenzene (DMB) in 80 μ L DMB reaction buffer (9 mM sodium hydrosulfite, 0.5 M β -mercaptoethanol, 20 mM TFA) for 2 h at 55 °C; the reaction was stopped with 20 μ L 0.2 M NaOH (*v/v*) [50,51]. The used gradient was the following: 0 min = 0% (*v/v*) E4, 2 min = 0% (*v/v*) E4, 25 min = 5% (*v/v*) E4, 31 min = 100% (*v/v*) E4, 40 min = 100% (*v/v*) E4, 41 min = 0% (*v/v*) E4, 55 min = 100% (*v/v*) E4. The flow rate was 0.25 mL/min.

To control the separated chain lengths, 100 ng of each fraction was mildly labeled with DMB in 80 μ L DMB reaction buffer (overnight at 11 °C), and 20 ng were analyzed with a DNAPac™ PA100 column (4 mm \times 250 mm, 13 μ m; ThermoFisher Scientific) [52]. The used gradient was the following: 0 min = 0% (*v/v*) E2, 5 min = 0% (*v/v*) E2, 15 min = 5% (*v/v*) E2, 30 min = 21% (*v/v*) E2, 55 min = 33% (*v/v*) E2, 100 min = 43% (*v/v*) E2, 101 min = 100% (*v/v*) E2, 110 min = 100% (*v/v*) E2, 111 min = 100% (*v/v*) E2. The flow rate was 1 mL/min. PolySia digested with active endoneuraminidase (EndoN, 0.1 μ g) was analyzed under the same conditions.

2.3. Electrophoresis on Native Agarose Gel

For the interaction analysis, lactoferrin and LFCin were separated by native gel electrophoresis in the absence and presence of Neu5Ac and different chain length of polySia, as previously described in detail [12,53]. To this end, the samples were loaded on an agarose gel (2%, *w/v*) (lactoferrin and LFCin, 10 μ g/lane; Neu5Ac and sialic acid polymers, 5 μ g/lane) and separated for 5 h at 80 V (running buffer: 25 mM Tris/HCl, 19.2 mM glycine, pH 8.5). Afterwards, the proteins were fixed in 45% methanol/7.5% acetic acid (*v/v*) overnight and colored with Coomassie blue (Roti-Blue, Carl-Roth), and the gel was de-stained with 25% methanol.

2.4. ELISA

ELISA plates were coated with 20 μ g/mL of lactoferrin (coating buffer, 15 mM Na₂CO₃, 35 mM NaHCO₃, pH 9.6) for 2 h, followed by two washing steps. Afterwards, Neu5Ac and polySia fractions (160 μ g/mL in PBS) were added, and incubation was carried out for 2 h. In a further step, murine anti-LFCin antibody (0.5 μ g/mL) was applied to bind unoccupied LFCin binding sides. For a detailed description, please see [12].

2.5. Bacterial Growth Assay

Bacterial growth was analyzed with the Bacteria Counting Colorimetric Assay Kit (BioVision, Milpitas, CA, USA), which was also used to characterize the impact of histones on *E. coli* [49]. During all the following steps, *E. coli* was cultured at 37 °C under shaking. To generate a preculture, LB medium (1% NaCl [*w/v*], 1% peptone [*w/v*], 0.5% yeast extract [*w/v*]) was inoculated with a frozen *E. coli* stock and incubated overnight. With this preculture, a main culture was inoculated and grown until an OD (600 nm) of 0.29–0.32 was reached. For the bacterial growth experiments, 50 µL of LB medium was added to a 96-well plate. In addition, LB medium containing LFCin (200 µg/mL) and/or polySia (400, 200, or 100 µg/mL), Neu5Ac (400 µg/mL), fractionated polySia (400 µg/mL), or enzymatically cleaved polySia (400 µg/mL) was applied. For the enzymatic digestion of the polymers, polySia (6 mg/mL) was treated with endo N (6.7 µg/mL, 3 h, 37 °C). To the 50 µL of differently modified LB media, 40 µL of bacteria solution ($\sim 2.4 \times 10^8$ bacteria/mL) and 10 µL of WST/ECS solution (reagents of the Bacteria Counting Colorimetric Assay Kit) were added. Thus, the final concentration of LFCin is 100 µg/mL. The bacterial growth was measured for 150 min in 30 min intervals, at a wavelength of 450 nm.

2.6. Statistical Analysis

The calculated values were analyzed with Graph Pad Prism 8.2.1 software using ANOVA and a multiple-comparison Turkey test. Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$. Statistically significant differences are indicated: ns, not significant; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

3. Results and Discussion

3.1. A Lower DP of PolySia Is Sufficient to Mediate the Binding to LFCin in Comparison to Lactoferrin

Antimicrobial peptides act together as a functional complex to attack the bacterial membrane [54]. If a switch of several LFCin molecules from one polySia chain to the bacterial membrane is possible, it is conceivable that such an accumulation of several LFCin molecules on a polySia chain supports the cooperation of the peptides in the formation of damaging complexes. The LFCin peptides would be directly located in a functional neighborhood.

To calculate the loading capacity of a polySia chain, it is important to determine the precise number of linked sialic acid residues which are needed to initiate the interaction. In polySia, the degree of polymerization necessary for the interaction with human lactoferrin or bovine LFCin was previously narrowed down to fractions consisting of polymers with a DP between 15 and 24 sialic acid residues [11,12]. Fractions with shorter chains, consisting of 2 up to 14 linked Neu5Ac residues, showed no reliable interaction with lactoferrin and LFCin in these studies. For the present experiments, groups containing only two main chain lengths (DP 2–3, 4–5, 6–7, 8–9, 10–11, 12–13, 14–15, 16–17, 18–19, and 20–21) were collected. In the collected fractions, the chain lengths were tested by anion-exchange chromatography after fluorescent labeling with DMB (Figure 1a). It was not necessary to collect monoSia, since Neu5Ac is commercially available.

To analyze the ability of polySia to interact with lactoferrin, native agarose gels were loaded with LFCin and/or sialic acid chains of different lengths. In addition, lactoferrin was applied by using an identical experimental setup. Thereby, an interaction could be visualized by a migration shift of the peptide/protein to the positive pole. This migration shift might be caused by the polyanionic charge of polySia during the attachment to its binding partners. In the case of lactoferrin, a first weak interaction may start with a DP of 18–19 (Figure 1b). The fraction DP 20–21 significantly influences the migration of lactoferrin. In contrast, already shorter chains influence the migration of LFCin. Here, a detectable interaction started with DP 10–11 (Figure 1c).

Since lactoferrin is much bulkier than LFCin, it is likely that an interaction with short polySia chains may only slightly influence the migration in the gel. Thus, an interaction with short chains might be overlooked. In order to confirm the obtained results, lactoferrin was coated on ELISA plates.

Thereafter, polySia fractions according to their DP were added. Subsequently, an antibody against the LFCin-containing domain of lactoferrin was added. The antibody could easily bind the unoccupied N-terminal domain, whereas polySia inhibited the binding [12]. In line with the results from the native agarose gel, polySia with DP 20–21 and unfractionated polySia were able to inhibit the antibody binding (Figure 1d). Thus, in comparison with LFCin, twice-as-long polymers were needed to mediate an interaction.

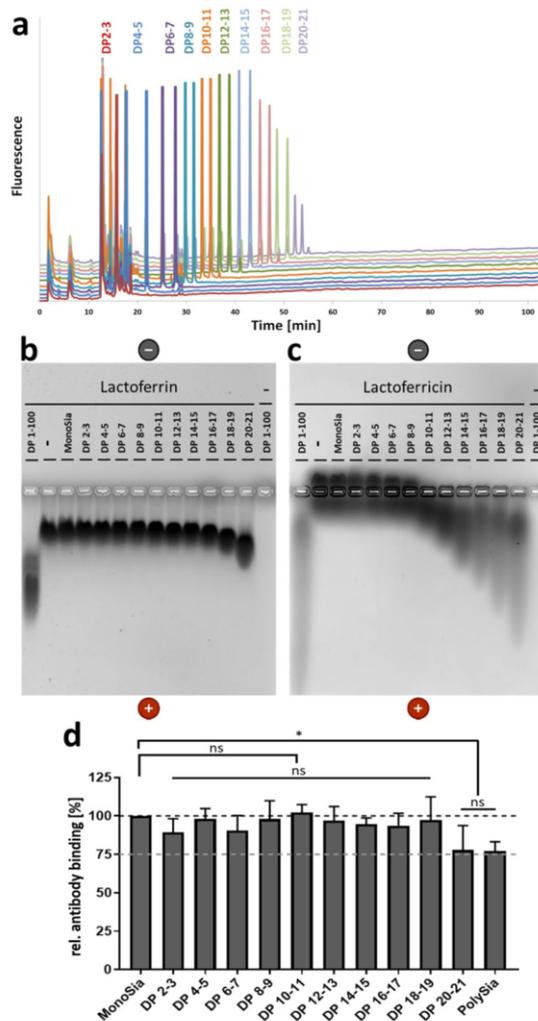


Figure 1. In comparison to lactoferricin (LFCin), higher degrees of polymerization (DPs) are needed for the interaction with lactoferrin. **(a)** The chain lengths of fractionated polysialic acid (polySia) were analyzed using “mild” dioxybenzene (DMB) labeling and anion-exchange chromatography. **(b)** Lactoferrin and **(c)** LFCin were incubated with polySia with chains of defined lengths, and the different samples were analyzed by native gel electrophoresis. In addition, unfractionated polySia (~DP 1–100) was used. Proteins were visualized by staining with Coomassie Blue. To exclude staining of polySia by Coomassie Blue, unfractionated polySia was separated without lactoferrin and LFCin. The gel was loaded with 10 µg/lane of lactoferrin or LFCin and/or 5 µg/mL of carbohydrate. **(d)** A competitive ELISA with an anti-LFCin antibody was performed by using sialic acid with chains of different lengths. Neu5Ac was used as a negative control and set to 100%. Mean values ($n = 3$) and standard deviations are displayed in the diagram. Statistically significant differences are indicated: nonsignificant (ns) and * $p < 0.05$.

The differences between LFcin and lactoferrin regarding the required chain length for polySia binding might be the results of conformational changes of LFcin after proteolytic release. It is known that bovine LFcin can change its conformation from an α -helical structure to a twisted β -sheet. This transformation might be also the reason for a better binding of LFcin to bacterial membranes and the stronger antibacterial effect of LFcin in comparison to lactoferrin [5,6,55]. In addition, in lactoferrin, large molecular surface areas of LFcin are hidden by other domains of the protein. Furthermore, it needs to be mentioned that molecular dynamic simulation suggested a second binding domain in lactoferrin for the terminal end of a polySia chain [11]. The interaction with two different protein domains is probably needed to stabilize the interaction in the case of lactoferrin.

3.2. PolySia Has No Impact on the Antimicrobial Activity of LFcin

To prove the ability of polySia to influence the antibacterial properties of LFcin, both molecules were tested for their ability to inhibit the growth of bacteria. In bacterial growth assays, LFcin and polySia were separately tested, in addition to a combination of LFcin and different concentrations of polySia. As expected, bacterial growth was inhibited by LFcin (Figure 2a,b). In contrast, polySia had no statistically significant impact on bacterial growth (Figure 2b). Surprisingly, when LFcin was applied together with polySia, its antimicrobial activity was not influenced by polySia. The growth curves in the presence or absence of polySia were very similar, and no statistical differences were observed after 150 min.

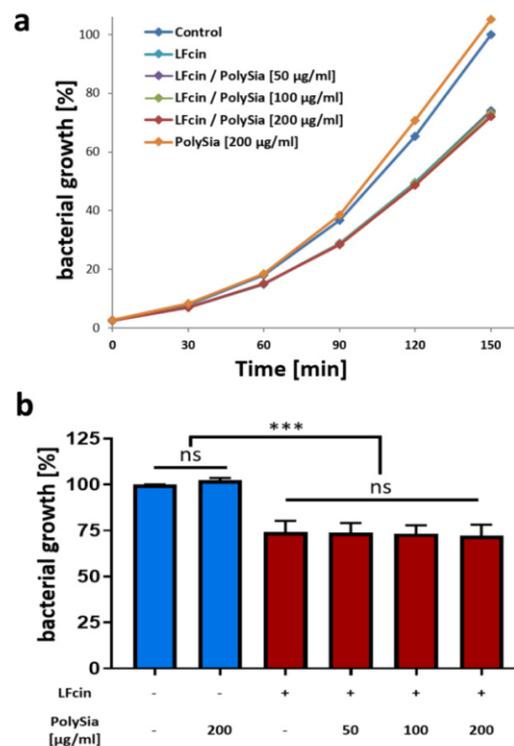


Figure 2. PolySia has no capability to inhibit bacterial growth or the antimicrobial activity of LFcin. (a) Bacteria growth curves were obtained in the absence and presence of LFcin (100 µg/mL) and different amounts of polySia, as indicated in the diagram. In (a), growth curves of an exemplary experiment are depicted. Values at 150 min are displayed separately in (b). The values for untreated bacteria were set to 100%. Mean values ($n = 3$) and standard deviations are displayed in the diagram. Statistically significant differences are indicated: nonsignificant (ns) and $*** p < 0.001$.

In order to test whether short or long chains of polySia may have an impact on LFCin's antimicrobial effect, endoN was used to cut the polySia mixture [56]. EndoN works very well because it degrades polySia to mainly short oligomers with a DP < 8 [57]. The digestion was controlled by anion-exchange chromatography after DMB labeling. The obtained chromatograms demonstrated that the degradation was sufficient (Figure 3a). However, also the resulting fragments of polySia exhibited no ability to influence the effects of LFCin (Figure 3b). As described above, a DP higher than 9 was needed to visualize an impact on the migration of LFCin (Figure 1c). Thus, the obtained degradation products (DP < 8) might be too short.

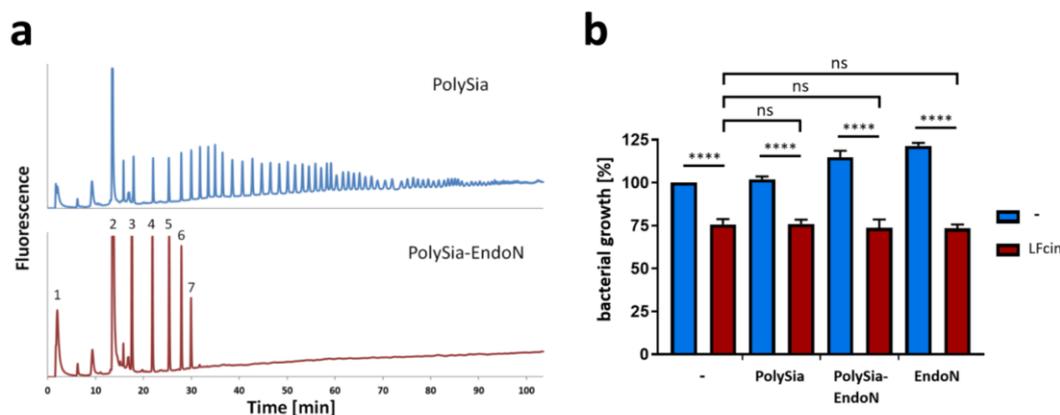


Figure 3. Bacterial growth inhibition by LFCin is not influenced by short sialic acid oligomers. (a) PolySia and polySia degraded by endoN were analyzed by anion-exchange chromatography after “mild” DMB labeling. (b) Bacterial growth values at 150 min are displayed using polySia (200 µg/mL) or enzymatically degraded polySia (200 µg/mL) in the presence or absence of LFCin (100 µg/mL). Untreated cells were set to 100%. Red bars show LFCin-treated samples, whereas blue bars represent data without LFCin treatment. Mean values ($n = 3$) and standard deviations are displayed in the diagram. Statistically significant differences are indicated: nonsignificant (ns) and **** $p < 0.0001$.

For this reason, five groups of polySia with chain lengths between 8 and 48 were collected, and the DP was analyzed by HPLC (Figure 4a). On the basis of the results of native gel electrophoresis, the chains have the theoretical capacity to bind one to four LFCin molecules. These fractions were used in combination with LFCin for the bacterial growth assays. The results in Figure 4b clearly depict the capacity of LFCin to inhibit bacterial growth despite the presence of polySia fractions of rising DPs. Thus, polySia can bind LFCin, but it has no impact on its antimicrobial activity. Comparable results were also obtained for histones H1 and H2A, as previously described [49].

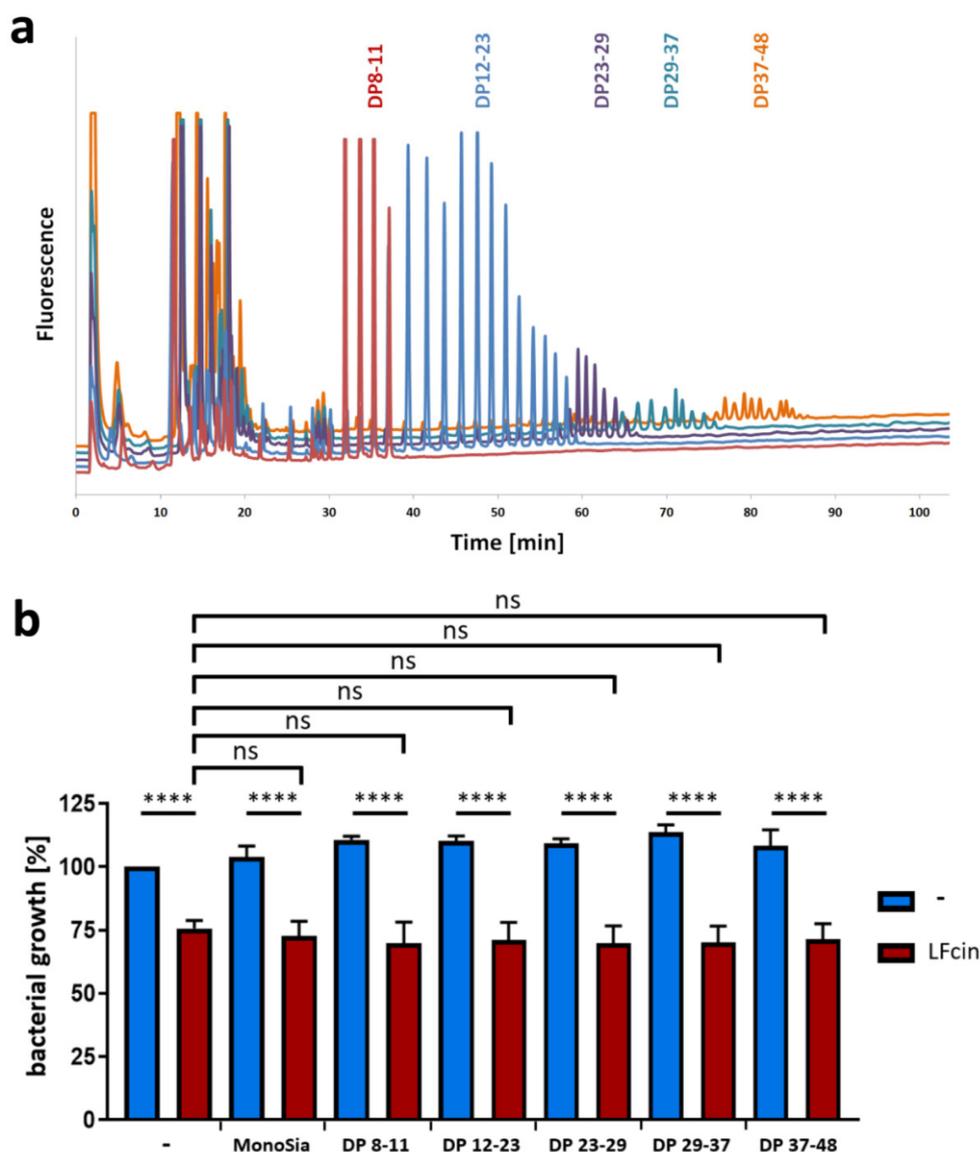


Figure 4. Bacterial growth inhibition by LFCin is not influenced by different chain lengths of polySia. (a) Fractionated polySia samples with different degrees of polymerization (DP 8–48) were analyzed by using “mild” DMB labeling and anion-exchange chromatography. (b) Bacterial growth values after 150 min are displayed after treatment with LFCin (100 µg/mL) and defined polySia fractions (200 µg/mL). Control (without treatment) was set to 100%. Red bars show LFCin-treated sample datasets, and blue bars show sample datasets without LFCin treatment. Mean values ($n = 3$) and standard deviations are displayed in the diagram. Statistically significant differences are indicated: nonsignificant (ns) and **** $p < 0.0001$.

4. Conclusions

Interestingly, it was shown that polySia and lactoferrin can interact in several bodily fluids, that polySia supports lactoferrin to inhibit the release of NET, and that polySia influences the binding of lactoferrin to already exposed NET fibers. Since polySia also interacts with the lactoferrin-derived peptide LFCin, an effect of polySia on the biological function of the antimicrobial peptide was also conceivable. Since the binding of lactoferrin is initiated by its LFCin-containing domain, a modulation of LFCin binding to NET or to polysialylated immune cells, such as dendritic cells, is likely [58].

Recently, a therapeutic effect of bovine LFcin after oral intake was reported for the prevention of enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) infection in a mouse model [59], demonstrating, like numerous other studies, the potential of this antimicrobial peptide in veterinary and human medicine (reviewed in [34]). However, neither different amounts of polySia nor different polySia DPs can influence this ability of LFcin. Particularly, the ability to bind and not inactivate LFcin might be a big advantage, if polysialylated surfaces can be loaded with LFcin. One additional point to note is that lactoferrin, LFcin, and polySia are endogenous biomolecules and biodegradable. For this reason, polySia and LFcin might be a powerful combination to develop novel therapeutic strategies, such as polysialylated surfaces and/or hydrogels which can be equipped with the detachable antimicrobial peptide LFcin.

Author Contributions: All authors conceived and designed the experiments. A.K., K.Z., and C.E.G., and S.P.G. performed the experiments and/or analysis. A.K. and S.P.G. wrote the paper. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by a grant from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (GA 1755/1-2).

Acknowledgments: We are sincerely thankful for their patience and assistance to Gesine Krüger, Torsten Viergutz, and Ursula Antkewitz. We thank Martina Mühlenhoff for generously providing the enzyme EndoN. We thank Joachim Weitzel for the very kind offer of the *E. coli* strain.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest. The funders had no role in the design of the study; the collection, analyses, and interpretation of the data; the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

References

- Wang, B.; Timilsena, Y.P.; Blanch, E.; Adhikari, B. Lactoferrin: Structure, function, denaturation and digestion. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2017**, *59*, 1–17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Kruzel, M.L.; Zimecki, M.; Actor, J.K. Lactoferrin in a context of inflammation-induced pathology. *Front. Immunol.* **2017**, *8*, 1438. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Okubo, K.; Kamiya, M.; Urano, Y.; Nishi, H.; Herter, J.M.; Mayadas, T.; Hirohama, D.; Suzuki, K.; Kawakami, H.; Tanaka, M.; et al. Lactoferrin suppresses neutrophil extracellular traps release in inflammation. *EBioMedicine* **2016**, *10*, 204–215. [[CrossRef](#)]
- Ammons, M.C.; Copie, V. Mini-review: Lactoferrin: A bioinspired, anti-biofilm therapeutic. *Biofouling* **2013**, *29*, 443–455. [[CrossRef](#)]
- Vogel, H.J. Lactoferrin, a bird's eye view. *Biochem. Cell Biol.* **2012**, *90*, 233–244. [[CrossRef](#)]
- Gifford, J.L.; Hunter, H.N.; Vogel, H.J. Lactoferricin: A lactoferrin-derived peptide with antimicrobial, antiviral, antitumor and immunological properties. *Cell. Mol. Life Sci.* **2005**, *62*, 2588–2598. [[CrossRef](#)]
- Legrand, D. Overview of lactoferrin as a natural immune modulator. *J. Pediatr-Ur* **2016**, *173*, S10–S15. [[CrossRef](#)]
- Levay, P.F.; Viljoen, M. Lactoferrin—A general-review. *Haematologica* **1995**, *80*, 252–267.
- Inoue, M.; Yamada, J.; Kitamura, N.; Shimazaki, K.; Andren, A.; Yamashita, T. Immunohistochemical localization of lactoferrin in bovine exocrine glands. *Tissue Cell* **1993**, *25*, 791–797. [[CrossRef](#)]
- Britigan, B.E.; Serody, J.S.; Cohen, M.S. The role of lactoferrin as an anti-inflammatory molecule. In *Lactoferrin: Structure and Function*; Hutchens, T.W., Rumball, S.V., Lönnnerdal, B., Eds.; Springer: Boston, MA, USA, 1994; pp. 143–156.
- Kuhnle, A.; Lutteke, T.; Bornhofft, K.F.; Galuska, S.P. Polysialic acid modulates the binding of external lactoferrin in neutrophil extracellular traps. *Biology* **2019**, *8*, 20. [[CrossRef](#)]
- Kuhnle, A.; Veelken, R.; Galuska, C.E.; Saftenberger, M.; Verleih, M.; Schuppe, H.C.; Rudloff, S.; Kunz, C.; Galuska, S.P. Polysialic acid interacts with lactoferrin and supports its activity to inhibit the release of neutrophil extracellular traps. *Carbohydr. Polym.* **2019**, *208*, 32–41. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Schnaar, R.L.; Gerardy-Schahn, R.; Hildebrandt, H. Sialic acids in the brain: Gangliosides and polysialic acid in nervous system development, stability, disease, and regeneration. *Physiol. Rev.* **2014**, *94*, 461–518. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Sato, C. Chain length diversity of sialic acids and its biological significance. *TIGG* **2004**, *16*, 331–344. [[CrossRef](#)]

15. Colley, K.J.; Kitajima, K.; Sato, C. Polysialic acid: Biosynthesis, novel functions and applications. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2014**, *49*, 498–532. [[CrossRef](#)]
16. Sato, C.; Kitajima, K. Disialic, oligosialic and polysialic acids: Distribution, functions and related disease. *J. Biochem.* **2013**, *154*, 115–136. [[CrossRef](#)]
17. Galuska, C.E.; Lütteke, T.; Galuska, S.P. Is polysialylated ncam not only a regulator during brain development but also during the formation of other organs? *Biology* **2017**, *6*, 27. [[CrossRef](#)]
18. Werneburg, S.; Buettner, F.F.; Erben, L.; Mathews, M.; Neumann, H.; Muhlenhoff, M.; Hildebrandt, H. Polysialylation and lipopolysaccharide-induced shedding of e-selectin ligand-1 and neuropilin-2 by microglia and thp-1 macrophages. *Glia* **2016**, *64*, 1314–1330. [[CrossRef](#)]
19. Kiermaier, E.; Moussion, C.; Veldkamp, C.T.; Gerardy-Schahn, R.; de Vries, I.; Williams, L.G.; Chaffee, G.R.; Phillips, A.J.; Freiburger, F.; Imre, R.; et al. Polysialylation controls dendritic cell trafficking by regulating chemokine recognition. *Science* **2016**, *351*, 186–190. [[CrossRef](#)]
20. Abe, C.; Yi, Y.; Hane, M.; Kitajima, K.; Sato, C. Acute stress-induced change in polysialic acid levels mediated by sialidase in mouse brain. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 9950. [[CrossRef](#)]
21. Ulm, C.; Saffarzadeh, M.; Mahavadi, P.; Müller, S.; Prem, G.; Saboor, F.; Simon, P.; Middendorff, R.; Geyer, H.; Henneke, I.; et al. Soluble polysialylated ncam: A novel player of the innate immune system in the lung. *Cell. Mol. Life Sci.* **2013**, *70*, 3695–3708. [[CrossRef](#)]
22. Zlatina, K.; Saftenberger, M.; Kuhnle, A.; Galuska, C.E.; Gartner, U.; Rebl, A.; Oster, M.; Vernunft, A.; Galuska, S.P. Polysialic acid in human plasma can compensate the cytotoxicity of histones. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 1679. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Yabe, U.; Sato, C.; Matsuda, T.; Kitajima, K. Polysialic acid in human milk. Cd36 is a new member of mammalian polysialic acid-containing glycoprotein. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 13875–13880. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Gluer, S.; Wunder, M.A.; Schelp, C.; Radtke, E.; Gerardy-Schahn, R. Polysialylated neural cell adhesion molecule serum levels in normal children. *Pediatr. Res.* **1998**, *44*, 915–919. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Simon, P.; Bäumner, S.; Busch, O.; Röhrich, R.; Kaese, M.; Richterich, P.; Wehrend, A.; Müller, K.; Gerardy-Schahn, R.; Mühlhoff, M.; et al. Polysialic acid is present in mammalian semen as a post-translational modification of the neural cell adhesion molecule ncam and the polysialyltransferase st8siaii. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 18825–18833. [[CrossRef](#)]
26. Brinkmann, V.; Reichard, U.; Goosmann, C.; Fauler, B.; Uhlemann, Y.; Weiss, D.S.; Weinrauch, Y.; Zychlinsky, A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* **2004**, *303*, 1532–1535. [[CrossRef](#)]
27. Bornhofft, K.F.; Galuska, S.P. Glycans as modulators for the formation and functional properties of neutrophil extracellular traps: Used by the forces of good and evil. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 959. [[CrossRef](#)]
28. van Berkel, P.H.; Geerts, M.E.; van Veen, H.A.; Mericskay, M.; de Boer, H.A.; Nuijens, J.H. N-terminal stretch arg2, arg3, arg4 and arg5 of human lactoferrin is essential for binding to heparin, bacterial lipopolysaccharide, human lysozyme and DNA. *Biochem. J.* **1997**, *328*, 145–151. [[CrossRef](#)]
29. Bellamy, W.; Takase, M.; Yamauchi, K.; Wakabayashi, H.; Kawase, K.; Tomita, M. Identification of the bactericidal domain of lactoferrin. *Biochim. Biophys. Acta* **1992**, *1121*, 130–136. [[CrossRef](#)]
30. Kuwata, H.; Yip, T.T.; Tomita, M.; Hutchens, T.W. Direct evidence of the generation in human stomach of an antimicrobial peptide domain (lactoferricin) from ingested lactoferrin. *BBA-Protein Struct. Mol.* **1998**, *1429*, 129–141. [[CrossRef](#)]
31. Britigan, B.E.; Hayek, M.B.; Doebbeling, B.N.; Fick, R.B., Jr. Transferrin and lactoferrin undergo proteolytic cleavage in the pseudomonas aeruginosa-infected lungs of patients with cystic fibrosis. *Infect. Immun.* **1993**, *61*, 5049–5055.
32. Yamauchi, K.; Tomita, M.; Giehl, T.J.; Ellison, R.T., 3rd. Antibacterial activity of lactoferrin and a pepsin-derived lactoferrin peptide fragment. *Infect. Immun.* **1993**, *61*, 719–728. [[PubMed](#)]
33. Bellamy, W.; Takase, M.; Wakabayashi, H.; Kawase, K.; Tomita, M. Antibacterial spectrum of lactoferricin b, a potent bactericidal peptide derived from the n-terminal region of bovine lactoferrin. *J. Appl. Bacteriol.* **1992**, *73*, 472–479. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Bruni, N.; Capucchio, M.T.; Biasibetti, E.; Pessione, E.; Cirrincione, S.; Giraud, L.; Corona, A.; Dosio, F. Antimicrobial activity of lactoferrin-related peptides and applications in human and veterinary medicine. *Molecules* **2016**, *21*, 752. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

35. Saffarzadeh, M.; Juenemann, C.; Queisser, M.A.; Lochnit, G.; Barreto, G.; Galuska, S.P.; Lohmeyer, J.; Preissner, K.T. Neutrophil extracellular traps directly induce epithelial and endothelial cell death: A predominant role of histones. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e32366. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Mishra, B.; von der Ohe, M.; Schulze, C.; Bian, S.; Makhina, T.; Loers, G.; Kleene, R.; Schachner, M. Functional role of the interaction between polysialic acid and extracellular histone h1. *J. Neurosci.* **2010**, *30*, 12400–12413. [[CrossRef](#)]
37. Shabir, U.; Ali, S.; Magray, A.R.; Ganai, B.A.; Firdous, P.; Hassan, T.; Nazir, R. Fish antimicrobial peptides (amp's) as essential and promising molecular therapeutic agents: A review. *Microb. Pathog.* **2018**, *114*, 50–56. [[CrossRef](#)]
38. Chaturvedi, P.; Bhat, R.A.H.; Pande, A. Antimicrobial peptides of fish: Innocuous alternatives to antibiotics. *Rev. Aquac.* **2018**. [[CrossRef](#)]
39. Masso-Silva, J.A.; Diamond, G. Antimicrobial peptides from fish. *Pharmaceuticals* **2014**, *7*, 265–310. [[CrossRef](#)]
40. Parseghian, M.H.; Luhrs, K.A. Beyond the walls of the nucleus: The role of histones in cellular signaling and innate immunity. *Biochem. Cell Biol.* **2006**, *84*, 589–604. [[CrossRef](#)]
41. Park, I.Y.; Park, C.B.; Kim, M.S.; Kim, S.C. Parasin i, an antimicrobial peptide derived from histone h2a in the catfish, *parasilurus asotus*. *FEBS Lett.* **1998**, *437*, 258–262. [[CrossRef](#)]
42. Kawasaki, H.; Koyama, T.; Conlon, J.M.; Yamakura, F.; Iwamuro, S. Antimicrobial action of histone h2b in *escherichia coli*: Evidence for membrane translocation and DNA-binding of a histone h2b fragment after proteolytic cleavage by outer membrane proteinase t. *Biochimie* **2008**, *90*, 1693–1702. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Silphaduang, U.; Hincke, M.T.; Nys, Y.; Mine, Y. Antimicrobial proteins in chicken reproductive system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, *340*, 648–655. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Li, G.H.; Mine, Y.; Hincke, M.T.; Nys, Y. Isolation and characterization of antimicrobial proteins and peptide from chicken liver. *J. Pept. Sci.* **2007**, *13*, 368–378. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Hiemstra, P.S.; Eisenhauer, P.B.; Harwig, S.S.; van den Barselaar, M.T.; van Furth, R.; Lehrer, R.I. Antimicrobial proteins of murine macrophages. *Infect. Immun.* **1993**, *61*, 3038–3046.
46. Galuska, S.P.; Galuska, C.E.; Tharmalingam, T.; Zlatina, K.; Prem, G.; Husejnov, F.C.O.; Rudd, P.M.; Vann, W.F.; Reid, C.; Vionnet, J.; et al. In vitro generation of polysialylated cervical mucins by bacterial polysialyltransferases to counteract cytotoxicity of extracellular histones. *FEBS J.* **2017**, *284*, 1688–1699. [[CrossRef](#)]
47. Galuska, C.E.; Dambon, J.A.; Kuhnle, A.; Bornhofft, K.F.; Prem, G.; Zlatina, K.; Lutteke, T.; Galuska, S.P. Artificial polysialic acid chains as sialidase-resistant molecular-anchors to accumulate particles on neutrophil extracellular traps. *Front. Immunol.* **2017**, *8*, 1229. [[CrossRef](#)]
48. Zlatina, K.; Lütteke, T.; Galuska, S.P. Individual impact of distinct polysialic acid chain lengths on the cytotoxicity of histone h1, h2a, h2b, h3 and h4. *Polymers* **2017**, *9*, 720. [[CrossRef](#)]
49. Zlatina, K.; Galuska, S.P. Polysialic acid modulates only the antimicrobial properties of distinct histones. *ACS Omega* **2019**, *4*, 1601–1610. [[CrossRef](#)]
50. Hara, S.; Yamaguchi, M.; Takemori, Y.; Furuhashi, K.; Ogura, H.; Nakamura, M. Determination of mono-o-acetylated n-acetylneuraminic acids in human and rat sera by fluorometric high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* **1989**, *179*, 162–166. [[CrossRef](#)]
51. Hara, S.; Takemori, Y.; Yamaguchi, M.; Nakamura, M.; Ohkura, Y. Fluorometric high-performance liquid chromatography of n-acetyl- and n-glycolylneuraminic acids and its application to their microdetermination in human and animal sera, glycoproteins, and glycolipids. *Anal. Biochem.* **1987**, *164*, 138–145. [[CrossRef](#)]
52. Inoue, S.; Lin, S.L.; Lee, Y.C.; Inoue, Y. An ultrasensitive chemical method for polysialic acid analysis. *Glycobiology* **2001**, *11*, 759–767. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Kim, R.; Yokota, H.; Kim, S.H. Electrophoresis of proteins and protein-protein complexes in a native agarose gel. *Anal. Biochem.* **2000**, *282*, 147–149. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Kumar, P.; Kizhakkedathu, J.N.; Straus, S.K. Antimicrobial peptides: Diversity, mechanism of action and strategies to improve the activity and biocompatibility in vivo. *Biomolecules* **2018**, *8*, 4. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Hwang, P.M.; Zhou, N.; Shan, X.; Arrowsmith, C.H.; Vogel, H.J. Three-dimensional solution structure of lactoferricin b, an antimicrobial peptide derived from bovine lactoferrin. *Biochemistry* **1998**, *37*, 4288–4298. [[CrossRef](#)]

56. Hallenbeck, P.C.; Vimr, E.R.; Yu, F.; Bassler, B.; Troy, F.A. Purification and properties of a bacteriophage-induced endo-n-acetylneuraminidase specific for poly-alpha-2,8-sialosyl carbohydrate units. *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 3553–3561.
57. Rutishauser, U.; Watanabe, M.; Silver, J.; Troy, F.A.; Vimr, E.R. Specific alteration of ncam-mediated cell adhesion by an endoneuraminidase. *J. Cell Biol.* **1985**, *101*, 1842–1849. [[CrossRef](#)]
58. Curreli, S.; Arany, Z.; Gerardy-Schahn, R.; Mann, D.; Stamos, N.M. Polysialylated neuropilin-2 is expressed on the surface of human dendritic cells and modulates dendritic cell-t lymphocyte interactions. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 30346–30356. [[CrossRef](#)]
59. Haiwen, Z.; Rui, H.; Bingxi, Z.; Qingfeng, G.; Jifeng, Z.; Xuemei, W.; Beibei, W. Oral administration of bovine lactoferrin-derived lactoferricin (lfcin) B could attenuate enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 induced intestinal disease through improving intestinal barrier function and microbiota. *J. Agric. Food Chem.* **2019**, *67*, 3932–3945. [[CrossRef](#)]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

4. Diskussion

4.1 In dieser Arbeit

Grundsätzliches Ziel dieser Arbeit war es, die molekulare Interaktion zwischen PolySia und Lactoferrin zu charakterisieren sowie mechanistische Verknüpfungspunkte zwischen Lactoferrin, PolySia und NET zu untersuchen. Basis für meine Untersuchungen war, dass vorab Lactoferrin und PolySia gemeinsam in gegen PolySia gerichtete Affinitätspräzipitaten gefunden worden war (Publikation 1 Abbildungen 1 und 4). Dies war sowohl bei Muttermilch als auch humanen Blutserum sowie Seminalplasma der Fall. Da die Banden von Lactoferrin und der typische PolySia „Schmier“ nicht dasselbe Molekulargewicht nach der SDS-Gelelektrophorese aufwiesen, konnte davon ausgegangen werden, dass es sich nicht um eine kovalente Verknüpfung zwischen PolySia und Lactoferrin handelt, sondern um eine Interaktion zwischen diesen beiden Biomolekülen. Da die Überprüfung einer möglichen Interaktion als Grundlage für weiterführende physiologische Untersuchungen unabdingbar war, soll im Folgenden auch zuerst auf diesen Punkt eingegangen werden.

4.1.1 Interaktion von Lactoferrin bzw. Lactoferricin und PolySia

Im Laufe der 3 Veröffentlichungen konnte die Art der Interaktion zwischen PolySia und Lactoferrin immer besser beschrieben und charakterisiert werden, sodass zusammengenommen einige interessante Folgerungen möglich sind. Die Interaktion zwischen PolySia und Lactoferrin konnte in unterschiedlichen experimentellen Aufbauten nachgewiesen werden. Eine wichtige biochemische Methode war hierbei die native Gelelektrophorese. Die Experimente zeigten, dass mit aufsteigenden PolySia-Konzentrationen sowohl das Migrationsverhalten von bovinem als auch humanem Lactoferrin signifikant beeinflusst wird (Publikation 1 Abbildung 2 und Publikation 2 Abbildung 3). Somit unterstützen die Ergebnisse der nativen Gelelektrophorese die Interaktionshypothese, welche nach der Affinitätspräzipitation aufgestellt wurde.

Anschließend Versuche konnten darüber hinaus Hinweise über die Region innerhalb von Lactoferrin geben, die mit PolySia interagiert. Diese Region befindet sich vermutlich primär im N-terminalen Teil des Proteins, welcher auch die Lactoferricin-Domäne beinhaltet. Erste Anhaltspunkte, um diese Region zu überprüfen, waren die bekannten Interaktionen dieser Domäne mit polyanionischen Makromolekülen wie DNA und Lipid A (van Berkel et al. 1997). Über die Interaktion zwischen DNA und des N-terminalen Teils von Lactoferrin soll auch die Akkumulierung von Lactoferrin an NET möglich sein (Okubo

et al. 2016). Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde die N-terminalen Domäne von Lactoferrin einer kompetitiven Hemmung mittels eines Lactoferricin-Antikörpers ausgesetzt. Sowohl im ELISA als auch in der nativen Gelelektrophorese schien der Antikörper die Bindung zwischen Lactoferrin und PolySia negativ zu beeinflussen (Publikation 1 Abbildung 6).

Um diese experimentellen Ergebnisse zu bestätigen, wurden molekulardynamische Simulationen durchgeführt. PolySia interagiert in beiden Simulationen ebenfalls über Bereiche der N-terminalen Domäne mit Lactoferrin (Publikation 2 Abbildung 2). In der ersten Simulation, die über 7 ns kalkuliert wurde, lagert sich die PolySia-Kette vertikal in die Furche, die zwischen der α -Helix (diese entspricht einem Teil von Lactoferricin) und den beiden dahinter liegenden Peptidschleifen an (Abbildung 8; Abbildung aus Publikation 2 ergänzende Abbildung S3).

In der zweiten Simulation, die über 5,6 ns kalkuliert wurde, neigt sich PolySia schräg nach hinten und gelangt somit einerseits zwischen die Vertiefung, welche die beiden Proteinschleifen bilden und andererseits quer an die davor liegende α -Helix (Publikation 2 ergänzende Abbildung S2b). Interessanterweise scheint die Interaktion hierbei nicht nur über die geladenen Teile (wie z. B. die Carboxylgruppen von PolySia) der beiden Makromoleküle abzulaufen. Insgesamt zeigen beide Simulationen eine Interaktion über den N-Terminus von Lactoferrin, die unsere experimentellen Ergebnisse bestätigen. Solche Simulationen liefern aber nur Indizien, sozusagen eine „Idee“, welche Aminosäuren exakt die Interaktion vermitteln. Erst ein gezielter Austausch von Kandidaten-Aminosäuren oder z. B. NMR-Analysen würden solch detaillierte Schlussfolgerungen ermöglichen. Neben den exakten Aminosäuren ist noch unklar, welche Effekte eine höhere Eisenbeladung von Lactoferrin auf die Interaktion haben könnte. Die innerhalb unserer Studien verwendeten Lactoferrinmoleküle aus der Milch besitzen, wie einleitend beschrieben, eine sehr geringe Eisenbeladung (Wang, Timilsena, et al. 2017). Da die Eisenbeladung nicht nur die Konformation, sondern auch auf die Stabilität gegen Hitze oder Enzymverdau beeinflusst, wären hierzu zukünftige Analysen von großem Interesse (Wang, Timilsena, et al. 2017).

Die Interaktion zwischen PolySia und dem Peptid Lactoferricin wurde ebenfalls mittels nativer Gelelektrophorese überprüft. Auch im Falle von Lactoferricin kam es mit aufsteigenden Mengen an PolySia zur Beeinflussung der Migration (Publikation 1 Abbildung 5). Diese Beobachtung steht im Einklang mit der Interaktion von PolySia über den N-Terminus von Lactoferrin. Hierzu ist jedoch kritisch daran zu erinnern, dass sich die Konformation des Peptides Lactoferricin vermutlich nach der Herauslösung aus dem Protein ändert und wahrscheinlich mehr Aminosäuren frei an der Peptidoberfläche

verfügbar sind (Hwang et al. 1998, Vogel 2012, Gifford, Hunter, und Vogel 2005, Kühnle et al. 2020).

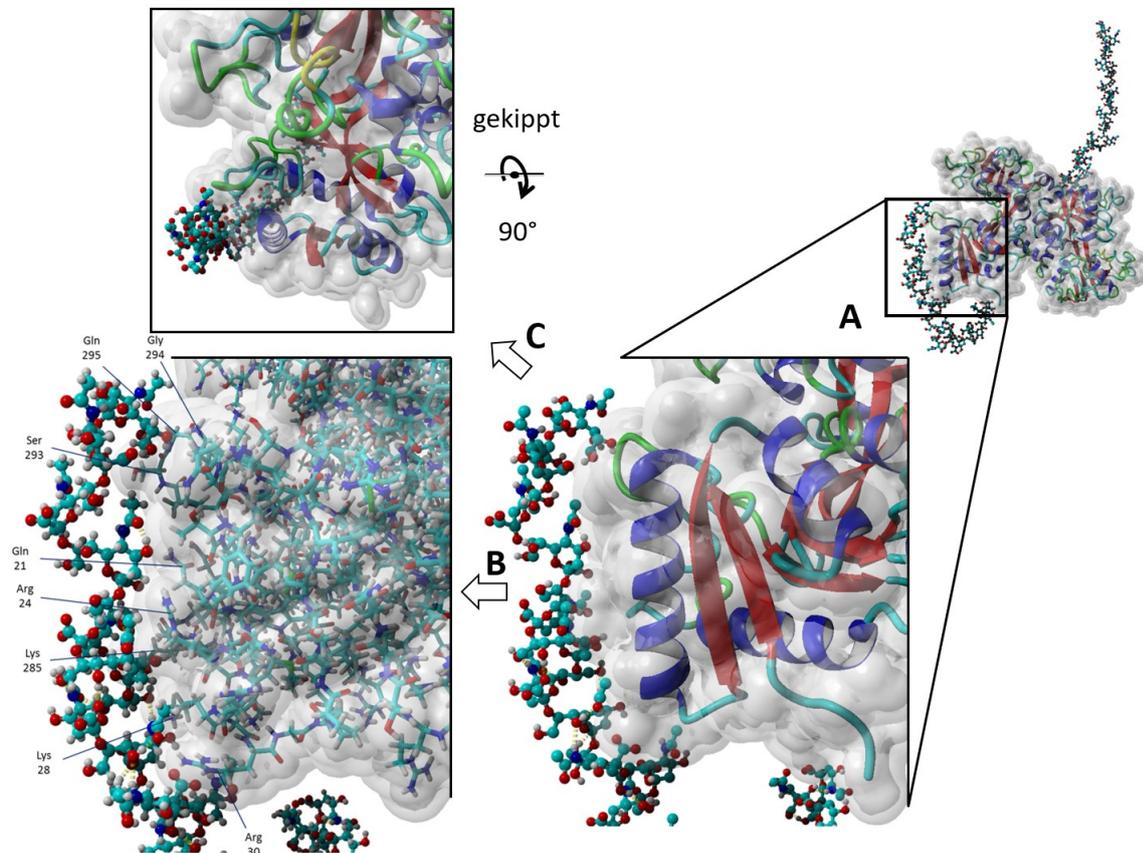


Abbildung 8: Detaillierte Darstellung des Interaktionsmodells der N-Terminalen Domäne von Lactoferrin mit PolySia. Dargestellt sind die Ergebnisse der ersten Molekulardynamischen Simulation. Vergrößerte Bereich der Lactoferrin-Domäne. Lactoferrin ist zur Veranschaulichung in A) als Bändermodell und in B) als Stäbchen- bzw. Gittermodell abgebildet. In der Aufsicht C) wurde die Abbildung um 90° gedreht. α -Helices sind in dunkelblau und β -Faltblätter sind in rot dargestellt. Die Raumforderung der Aminosäuren wird durch eine dynamische Oberflächenstruktur (grau) angedeutet. Dadurch wird besonders deutlich, wie flexibel und dicht sich PolySia vermutlich an Lactoferrin anlagern kann. Modifiziert aus (Kühnle, Lütkeke, et al. 2019).

Basierend auf diesen Ergebnissen wurden die strukturellen Voraussetzungen einer PolySia-Kette charakterisiert, die eine Interaktion zwischen Lactoferrin und Lactoferrin ermöglicht. Da in Säugern bisher nur Homopolymere aus Neu5Ac beschrieben wurden, ist bei den Bindungs-Struktureigenschaften von PolySia besonders die Anzahl der miteinander verbundenen Sialinsäuren interessant. Die für eine Bindung mit Lactoferrin benötigten PolySia-Kettenlängen wurden in Tabelle 2 zusammengefasst. Es ist zu

vermerken, dass zu Beginn mit Fraktionen mit einer Differenz von etwa 10 DP gearbeitet wurde, um einen Bindungsbereich eingrenzen zu können. Mit diesem Wissen wurden spätere Experimente angepasst und es konnten kleiner PolySia-Fraktionen mit einem Unterschied von 1-2 DP isoliert und verwendet werden. Vergleicht man das Lactoferrin der beiden Spezies, so kommt man mit DP 15-24 für humanes Lactoferrin (Publikation 1 Abbildung 2C) und DP 20-21 für bovines Lactoferrin auf relativ ähnliche PolySia-Kettenlängen (Publikation 3 Abbildung 1b), die für eine Bindung nötig sind. Diese ähnlichen Zahlen verwundern nicht, vergleicht man die Strukturähnlichkeiten beider Lactoferrine im N-terminalen Bereich ((Vogel 2012) siehe außerdem Abb. 2). Auch in den molekulardynamischen Simulationen sind an der Hauptinteraktionsstelle (am N-Terminus) immer mehrere Sialinsäuren gleichzeitig an der Interaktion beteiligt. Im Vergleich zu Lactoferrin bindet ein Mix aus bovinen Histonen PolySia ab einer Kettenlänge von 24-32 (Galuska, Dambon, et al. 2017). Die Ergebnisse zur bovinen Form von Lactoferrin sind hierbei von besonderem Interesse, da sich bereits Untersuchungen zur therapeutischen Anwendung von bovinem Lactoferrin in Säuglingen in klinischen Phasen befindet (Doyle und Cheong 2019).

Zur Bindung von bovinem Lactoferrin sind sogar mit einem DP-Bereich von 10-11 noch kürzere PolySia Kettenlängen nötig. Dies ist im Einklang mit anderen Peptiden, die mit PolySia interagieren können. Beispielsweise wurde ermittelt, dass PolySia mit einem DP von 12 das Peptid BDNF bindet (Kanato, Kitajima, und Sato 2008). Zunächst wiesen jedoch unsere Versuche darauf hin, dass längere Ketten nötig sind, um Lactoferrin zu binden. Ergaben unsere ersten Daten, dass eine Kettenlänge von 15-24 DP benötigt wird (Publikation 2 Abbildung 4), konnte erst später ein DP von 10-11 bestimmt werden (Publikation 3 Abbildung 1c). Dies hatte den Grund, dass innerhalb der ersten Untersuchungen Fraktionen untersucht wurden, die noch ein relativ weites Spektrum an unterschiedlichen Kettenlängen enthielt (DP 2-14 und DP 15-24), währenddessen es später möglich war, kleinere Gruppen mit je zwei unterschiedlichen Kettenlängen zu verwenden. Eventuell war die Menge an höheren Kettenlängen in der Fraktion DP 2-14 zu gering, um signifikante Unterschiede im Migrationsverhalten zu ergeben. Hier war lediglich eine sehr leichte Fokussierung der Bande zu beobachten (Publikation 2 Abbildung 4). Die Ergebnisse zeigen, dass es wichtig ist, eine möglichst geringe Kettenlängenverteilung zu verwenden, um detaillierte Aussagen treffen zu können.

Tabelle 2: Übersicht der benötigten Kettenlängen von PolySia für die Interaktion mit Lactoferrin, Lactoferricin oder Histonen im nativen Agarosegel. Aufgeführt sind hier die Fraktionen, ab deren Kettenlängen (DP; degree of polymerization) eine eindeutige Verschiebung der Proteinwanderung erkennbar war (grün) als auch die letzte Fraktion davor (rot). Bei bovinem Lactoferricin wurde zuerst (A) die Kettenlänge mittels breiter Fraktionen (Differenz ca. 10 DP) eingegrenzt und später (B) mit kleinen definierten Fraktionen (1-2 DP) genauer untersucht. Die bovinen Histone dienen als Vergleichswert für die anderen Proteine. Abkürzungen human (h) und bovin (b). * Quellennummerierung 1. (Kühnle, Veelken, et al. 2019) 2. (Kühnle et al. 2020) 3. (Kühnle, Lütkeke, et al. 2019) 4. (Galuska, Dambon, et al. 2017).

	PolySia Interaktions-Kettenlänge (DP)		Letzte nicht bindende Kettenlängen-Fraktion (DP) von PolySia		Quellen-Nr.*
h Lactoferrin	15-24		2-14		1
b Lactoferrin	20-21		18-19		2
b Lactoferricin	A) 15-24	B) 10-11	A) 2-14	B) 8-9	2 und 3
b Histone	24-32		15-24		4

Die Anzahl der nötigen Kettenlängen zu bestimmen ist besonders interessant im Hinblick darauf, ob PolySia auch mehrere Bindungspartner gleichzeitig haben könnte. In humaner Milch und Serum konnte PolySia mit einer DP von über 30 Sialinsäuren gefunden werden (Publikation 1 Abbildung 3). Diese Länge könnte rein rechnerisch reichen, um mindestens ein Lactoferrin-Molekül oder 2 Lactoferricin-Peptide zu binden. Ebenfalls könnte eine Bindung von Lactoferrin und anderen PolySia bindenden Proteinen (wie z. B. Histonen) parallel erfolgen. Dazu sollte bedacht werden, dass die bindenden Moleküle sich gegenseitig sterisch an der Bindung behindern könnten. Zur Erinnerung an anderen Regionen in Säugetieren ist es aber durchaus möglich längere Sialinsäureketten anzutreffen. So konnte an humanen Spermien und in Lungenepithelzellen PolySia mit einer Kettenlänge von über 40 DP und im Gehirn von Mäusen eine Kettenlänge von über 90 DP detektiert werden (Ulm et al. 2013, Galuska et al. 2008, Simon et al. 2013, Sato und Kitajima 2013, Galuska, Dambon, et al. 2017). Das von uns für die Experimente verwendete PolySia kann Kettenlängen von mehr als 100 Sialinsäuren aufweisen. Auch hier sind also Mehrfachbindungen von Interaktionspartnern möglich.

4.1.2 Zusammenspiel von Lactoferrin und PolySia mit NET

Lactoferrin und PolySia könnten in Kombination verschiedene Wirkungsweisen in Bezug auf NET haben. Einerseits könnte PolySia den inhibitorischen Prozess von Lactoferrin bei der Freisetzung von NET-Fasern aus neutrophilen Granulozyten beeinflussen, andererseits kann PolySia die Aufnahme von externem Lactoferrin in NET-Fasern beeinflussen, da sowohl DNA als auch PolySia mit der N-terminalen Domäne von Lactoferrin interagieren.

Beginnen wir mit dem Prozess zur Inhibition der Freisetzung von NET-Fasern. Um eine Vorstellung davon zu bekommen, ist in Abbildung 9 dargestellt, wie eine normale NETose abläuft. Der Fokus liegt hierbei auf der Integrität der Membranen. Die Zelle schwillt während der NETose deutlich an und es kommt daraufhin an einer Stelle zur Ruptur der Membranen und zur Freisetzung der DNA-Fasern. Im Bild sind interessanterweise besonders gut zwei Bereiche zu sehen, an denen besonders wenig Membranen-Farbstoff angelagert ist (Bornhöfft et al. 2019).

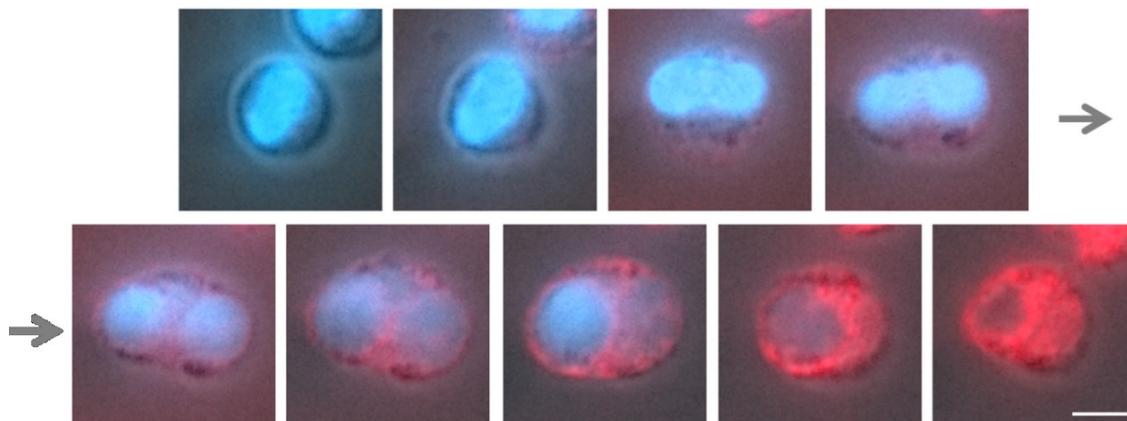


Abbildung 9: Ablauf der Freisetzung von NET aus einem neutrophilen Granulozyten mit Fokus auf die Membranintegrität. Die DNA der Zelle wurde in blau und die Zellmembranen in rot eingefärbt. Zu Beginn der Aufnahme wurde die NETose mit PMA induziert. Während dem Prozess der NETose beginnt die Zelle ihre DNA zu decondensieren und der Nucleus als auch die Zelle selbst schwellen an. Zuerst kommt es daraufhin zum Zerfall der Kernmembranen und die DNA vermischt sich mit dem Zytoplasma. Später kommt es zur Ruptur der Zellmembranen der immer weiter angeschwollenen Zelle. Dadurch kommt es zur Ausschüttung der NET-Fasern und die geschrumpfte leere Zellmembran bleibt zurück. Der Maßstab entspricht 5 µm. Abbildung aus (Bornhöfft et al. 2019) CC BY 4.0.

Okubo et al. zeigten, dass Lactoferrin in der Lage ist, die NET-Freisetzung zu inhibieren (Okubo et al. 2016). Dabei scheinen die Neutrophilen zwar den kompletten internen Prozess der NETose zu durchlaufen, die NET-Fasern aber nicht ausschütten zu können. Zu sehen ist stattdessen eine Art Schild aus Lactoferrin auf der Zelloberfläche, das vermutlich die Membranintegrität aufrechterhält. Es ist bisher nicht klar, ob es sich hierbei um einen Notfallmechanismus handelt, der das Immunsystem vor einer Überreaktion schützt. Diese Eigenschaft von Lactoferrin könnte jedoch vom großen Vorteil für therapeutische Anwendungen sein, da auch nach Induktion der Zellen noch eingegriffen werden könnte.

Im Gegensatz zu Lactoferrin, können jedoch freie PolySia-Ketten die NETose nicht inhibieren (Publikation 1 Abbildung 8). Die Sialinsäurepolymere konnten jedoch in diesen Versuchsansatz die Effekte von Lactoferrin potenzieren. Bei einer Lactoferrinkonzentration, die allein noch keinen signifikanten Einfluss auf die NETose hatte, wurde durch das Zusammenspiel mit PolySia die NETose inhibiert (Publikation 1 Abbildung 8). Somit sind geringere Konzentrationen an Lactoferrin nötig, wenn PolySia als Interaktionspartner zur Verfügung steht. Es ist allerdings nicht bekannt, wie PolySia Lactoferrin bei diesem Prozess unterstützt. Interessanterweise konnte Bornhöfft et al. 2019 zeigen, dass Nanopartikel mit α 2,8-verknüpften Sialinsäureketten die NET-Freisetzung unterdrücken können. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Zellmembran dabei weitestgehend intakt geblieben ist. Spannend ist ebenfalls, dass dieser Effekt durch die zusätzliche Zugabe von ungebundenen Sialinsäureketten aufgehoben werden konnte. Die Zuckerketten scheinen also gerade durch die Kopplung an die Partikel ihre Wirkung zu entfalten (Bornhöfft et al. 2019). Dies stärkt die Hypothese, dass die Bindung von Lactoferrin und PolySia einer solchen Kopplung ähnelt und gerade durch die Interaktion beider Moleküle eine Verstärkung des NETose-inhibitorischen Effektes sichtbar wird. In Bornhöfft et al. 2019 wird vermutet, dass PolySia dabei über in Lipid Rafts (sogenannte Lipidflöße) angereicherte Phospholipide mit der Membran interagieren könnte und dabei stabilisierende Querstreben bilden könnte (Bornhöfft et al. 2019, Janas, Nowotarski, und Janas 2010, Sapon et al. 2018). In beiden molekulardynamischen Simulationen scheinen jeweils zwei PolySia-Ketten gleichzeitig eine Interaktion mit Lactoferrin einzugehen. Rein theoretisch ist also eine ähnliche Quervernetzung von PolySia und Lactoferrin möglich und wurde bereits im Modell angedeutet (dieser Mechanismus ist in Abb. 10 A und C). Über welche Bindungspartner Lactoferrin mit den Membranen interagieren könnte, ist nicht ganz so einfach darzustellen, da es eine Vielzahl an Molekülen binden kann. Als immunregulatorische Komponente interagiert es unter anderem mit unterschiedlichen Rezeptoren, die sich ebenfalls auf der Oberfläche von Neutrophilen befinden können (Birgens et al. 1984,

Suzuki, Lopez, und Lönnerdal 2005, Lönnerdal 2013, Levay und Viljoen 1995, Maneva, Sirakov, und Manev 1983).

Lactoferrin ist nicht nur in der Lage, die NETose zu inhibieren, sondern stellt auch ein funktionelles Element von NET-Fasern dar. Während der NETose lagern sich die vesikulär gespeicherten Lactoferrinmoleküle ebenso wie z. B. neutrophile Elastase an die DNA an, um zusammen ein antimikrobielles Milieu zu bilden. Die Interaktion zwischen Lactoferrin und DNA soll wie bei PolySia über Bereiche der N-terminalen Lactoferricin-Domäne stattfinden (Okubo et al. 2016, Kanyshkova et al. 1999, van Berkel et al. 1997). Während Lactoferrin also direkt die DNA bindet, wird davon ausgegangen, dass bei PolySia basische Histone den Hauptankerpunkt in NET darstellen (Galuska, Dambon, et al. 2017).

Es sollte nun untersucht werden, welchen Einfluss PolySia auf die Akkumulierung von Lactoferrin in NET hat. In unseren Experimenten zeigte sich, dass es nach der Absättigung von NET-Fasern mit Lactoferrin durch Zugabe von PolySia möglich war, neues Lactoferrin in NET-Fasern einzulagern (Publikation 2 Abbildung 6). Jedoch nicht über den zuvor bestimmten Sättigungswert hinaus. Daraus ergaben sich zwei Hypothesen.

Bei der einen Hypothese könnten DNA und PolySia Lactoferrin über die Lactoferricin-Domäne binden. Durch eine Konkurrenz beider Bindungspartner zu Lactoferrin und einen dadurch bedingten dynamischen Wechsel könnte sich Lactoferrin aus NET lösen und somit wieder Bindungsstellen für externes Lactoferrin frei werden. Dabei käme es zum Austausch von internem und externem Lactoferrin (dieser Mechanismus ist in Abb. 10 D dargestellt). Für die zweite Hypothese ist zu bedenken, dass PolySia ebenfalls die Histone in NET binden kann und PolySia somit je nach Kettenlänge in der Lage ist, beide Proteine, Lactoferrin und Histone zu binden. Dies wäre entsprechend, der hier aufgeführten Werte und somit rein additional ab einer Kettenlänge von 50 Sialinsäureresten möglich (siehe Tabelle 2 und Abb. 10 D). Auch PolySia-Ketten mit einem solch langen Polymerisationsgrad waren in unserem Experiment vorhanden, sodass es durchaus möglich ist, dass eine Anreicherung von Lactoferrin in NET-Fasern erreicht wurde. Die Ergebnisse unterstützen jedoch vor allem die erste Hypothese, da durch Zugabe von PolySia nicht mehr Lactoferrin in NET eingelagert werden konnte als durch die alleinige Zugabe von Lactoferrin.

Unabhängig vom Mechanismus kann PolySia den Einbau von externem Lactoferrin in bereits ausgeschüttete NET-Fasern beeinflussen. Die Anwendung von PolySia in Kombination mit Lactoferrin könnte dabei zwei Vorteile haben. Einerseits werden dadurch vermutlich Histone von PolySia abgedeckt. Dabei wird vor allem die

zytotoxische Wirkung der Histone für endogene Zellen reduziert, während die Wirkung gegenüber Bakterien nur gering beeinflusst wird (Zlatina und Galuska 2019). Letzterer Effekt könnte durch den Einbau von neuem antimikrobiellem Lactoferrin abgedeckt werden. Durch den Austausch von eisenbeladenem Lactoferrin mit externem apo-Lactoferrin könnte es dazu kommen, dass in NET eingeschlossenen Bakterien dauerhaft essenzielles Eisen entzogen wird. Es könnten somit endogene Zellschäden vermieden werden, während gleichzeitig die antimikrobiellen Eigenschaften von NET aufrechterhalten werden.

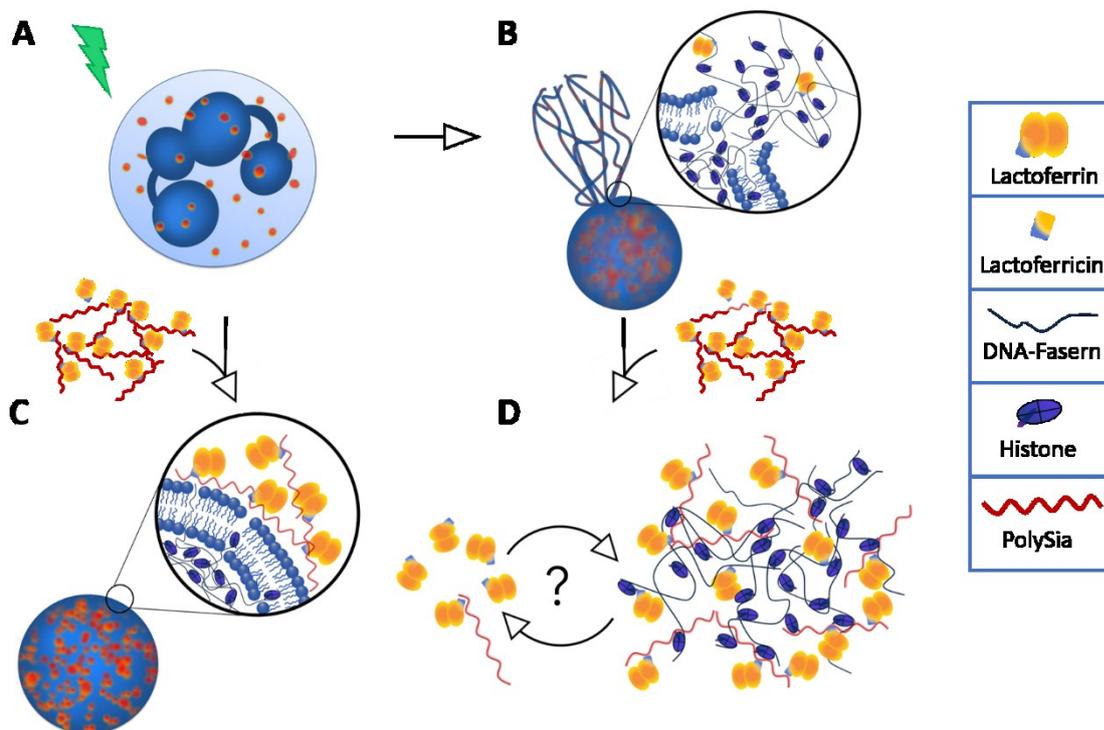


Abbildung 10: Interpretation der Interaktion von Lactoferrin, PolySia und NET. Nach Aktivierung der Zelle (A) durchläuft diese entweder den kompletten Prozess der NETose, dabei kommt es zur Ausschüttung der kompletten DNA (B) gespickt mit antimikrobiellen Peptiden wie z. B. Lactoferrin oder Lactoferrin und PolySia werden gemeinsam zugegeben, dabei bildet sich (C) wahrscheinlich ein Schild aus Lactoferrin und PolySia um die Zellmembranen. Dadurch wird die Freisetzung der bereits gebildeten NET-Fasern inhibiert. Werden Lactoferrin und PolySia erst nach Freisetzung der NET-Fasern zugegeben (D), sorgt PolySia vermutlich für den Austausch von Lactoferrin in den Fasern mit externem Lactoferrin im Umgebungsmedium. Modifiziert aus (Kühnle, Veelken, et al. 2019, Kühnle, Lütkeke, et al. 2019) CC BY 4.0.

4.1.3 Einfluss der Bindung von PolySia zu Lactoferricin

Der Einfluss von PolySia auf extrazelluläre Histone hat sich mit der Zeit als wesentlich differenzierter herausgestellt und soll deshalb hier mit der Bindung von Lactoferricin und PolySia verglichen werden (Zlatina et al. 2018, Zlatina und Galuska 2019, Zlatina, Lütteke, und Galuska 2017). Die Zytotoxizität der einzelnen Histone (H1, H2A, H2B, H3, und H4) auf Säugetierzellen lässt sich durch die Bindung an PolySia deutlich senken. Für die meisten Histone gilt dabei, dass PolySia-Kettenlängen über 46 DP die stärkste Wirkung haben (Zlatina, Lütteke, und Galuska 2017). Für Bakterienzellen hingegen bleiben einige Histone zytotoxisch trotz der Interaktion mit PolySia. Während Lysin reiche Histone wie H1, H2A, und H2B, auch wenn eine Zugabe von PolySia erfolgt, ihre antimikrobiellen Fähigkeiten gegen *E. coli* behalten, sind Arginin reiche Histone wie H3 dazu nicht in der Lage. Dabei wird angenommen, dass der höhere Anteil von sauren Phospholipiden in der Bakterien-Membranen, im Vergleich zu Säugetierzellen die Übertragung von Lysin reichen Histonen von PolySia auf die Membranen-Oberfläche begünstigt (Zlatina und Galuska 2019).

Das ebenfalls stark antimikrobielle bovine Lactoferricin besitzt als basische Komponenten 5 Arginin- sowie 3 Lysin-Reste (siehe Abb. 2 C). Beide Aminosäurereste könnten die Interaktion von Lactoferricin mit PolySia beeinflussen. Um das Potenzial für die mögliche medizinisch-therapeutische Anwendung von Lactoferricin in Kombination mit PolySia einschätzen zu können, musste zunächst überprüft werden, ob PolySia die antimikrobiellen Eigenschaften von Lactoferrin unterdrückt. Als Erstes wurde dafür mit einer PolySia-Kettenlängen-Mixtur gearbeitet, mit der gezeigt werden konnte, dass die antimikrobiellen Eigenschaften von Lactoferricin nicht beeinflusst wurden (Publikation 3 Abbildung 2). Folgend war es wichtig zu berücksichtigen, dass die Bindung von Lactoferricin von der Kettenlänge abhängt (Publikation 3 Abbildung 1c). Deshalb wurde Lactoferricins Fähigkeit, das bakterielle Wachstum zu beschränken, mit Mono- bis Oligomeren Sialinsäureketten als auch unterschiedlichen PolySia-Fractionen (bis rauf zu Kettenlänge 48) untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die antimikrobielle biologische Funktion gegen *E. coli* von Lactoferricin nicht durch PolySia, egal welcher Kettenlänge, beeinflusst werden konnte (Publikation 3 Abbildungen 3 und 4). Entsprechend kann vermutet werden, dass sich trotz des leicht höheren Anteils an Arginin-Resten Lactoferricin ähnlich wie die Histone H1, H2A, und H2B verhält und durch PolySia an entsprechende Zelloberflächenmoleküle wie beispielsweise Lipid A abgegeben werden kann.

Analog dazu ist bekannt, dass Lactoferricin ebenfalls Tumorzellen binden kann, bei denen die Membranlipid-Asymmetrie nicht mehr aufrechterhalten werden kann. Interessanterweise ist dabei mehr negativ geladenes Phosphatidylserin an der Zelloberfläche verfügbar (Vorland und Rekdal 2002, Gifford, Hunter, und Vogel 2005, Fadok et al. 2001). Inwieweit Lactoferricin vielleicht besonders oder gerade nicht bei PolySia-positiven Tumorzellen wirkt, wäre eine interessante Fragestellung, die in Zukunft untersucht werden könnte.

4.1.4 Ausblick über mögliche Zusammenspiele dreier multifunktionale Komponenten

Mit PolySia und Lactoferrin bzw. Lactoferricin wurden drei multifunktionale Komponenten des Immunsystems untersucht, die alle das Immunsystem unterstützen und Möglichkeiten zu dessen Regulation bieten. Die Funktion von Lactoferrin und PolySia als immunmodulatorische Komponenten, die beide gemeinsam Einfluss auf die Ausschüttung, den Aufbau und die antimikrobiellen Eigenschaften von NET haben, passen gut zu den durch beide Komponenten einzeln gemachten Beobachtungen. Die Interaktion von Lactoferrin und PolySia könnte aber ebenfalls Einfluss auf weitreichende andere Eigenschaften im Organismus haben.

Interessant sind deshalb vor allem Regionen im Organismus, an denen Lactoferrin und PolySia auf natürliche Weise oder unter inflammatorischen Bedingungen zusammentreffen können. Einige davon wie Ejakulat und Blut wurden bereits innerhalb dieser Arbeit erwähnt. Die Literatur gibt jedoch weitere Anhaltspunkte dafür, dass PolySia und Lactoferrin in unterschiedlichen Regionen des Körpers zusammentreffen könnten.

Sowohl Lactoferrin als auch PolySia werden von Zellen im Gehirn gebildet (Siebert und Huang 1997, Sato und Kitajima 2013). Zusätzlich kann Lactoferrin im Blut die Blut-Hirnschranke überwinden (Kamemori et al. 2008, Fillebeen et al. 1999). Außerdem kann intaktes bovines Lactoferrin bei Neugeborenen und 6 Wochen alten Ferkeln über den Darm in die Blutbahn transportiert werden (Harada et al. 1999). Als Erinnerung, es konnte bereits gezeigt werden, dass die Ernährung von Ferkeln mit bovinem Lactoferrin (von 3 bis 38 Tage) zu einer erhöhten Bildung von BDNF und BDNF-Signalwegproteinen, sowie dessen Bindungspartner PolySia-NCAM führt. Diese Ferkel waren besser in der Lage, Lern- und Gedächtnisaufgaben zu lösen, als eine Kontrollgruppe (Chen et al. 2015, Kanato, Kitajima, und Sato 2008). Erwähnenswert ist hier zudem, dass zahlreiche neuroendokrine Tumore PolySia auf der Zelloberfläche aufweisen (Sato und Kitajima 2013) und Lactoferrin als Mittel gegen unterschiedliche

Tumore diskutiert wird (Kanwar et al. 2015, Kanwar, Samarasinghe, et al. 2012, Kanwar et al. 2008). Hier wäre ein Zusammentreffen denkbar, dass vielleicht, ebenso wie bereits zuvor für Lactoferricin erwähnt, therapeutisch genutzt werden könnte.

Neben dem Gehirn kommen beispielsweise inflammatorische exponierte Regionen der Lunge und den weiblichen Reproduktionstrakt nach der Paarung oder Insaminierung in Frage. Von diesen Regionen ist bekannt, dass hier vermutlich PolySia zur Abwehr der zytotoxischen Histone aus NET vorkommt (Ulm et al. 2013, Simon et al. 2013). Während Lactoferrin generell in Bronchialsekret als auch Vaginalsekreten vorkommt (Levay und Viljoen 1995). Zusätzlich konnten beide Moleküle auf der Oberfläche von Spermien und im Seminalplasma gefunden werden (Simon et al. 2013, Zumoffen et al. 2013, Kühnle, Veelken, et al. 2019).

Des Weiteren stellt sich die Frage, ob beide Moleküle, da diese zusammen in Milch gefunden werden können, einen gemeinsamen Einfluss auf Brustentzündungen (Mastitis) haben könnten (Kühnle, Veelken, et al. 2019). Vor allem, da es auch hierbei zur NET-Freisetzung kommen kann (Pisanu et al. 2015, Lippolis et al. 2006). Außerdem scheint die erhöhte Bildung von Lactoferrin ein natürlicher Prozess während der bovinen Mastitis zu sein (Shimazaki und Kawai 2017).

Interessanterweise haben einzelne *E. coli* Stämme und Vertreter der Bakteriengattung *Neisseria* polysialylierte Oberflächen, um sich durch molekulares Mimikry vor dem Immunsystem des Wirtsorganismus zu tarnen. Besonders hervorzuheben sind hier vielleicht *Neisseria meningitidis* Serogruppe B und C. Interessanterweise besitzen Vertreter von *Neisseria meningitidis* zudem einen spezifischen Abwehrmechanismus gegen Lactoferrin (Adlam et al. 1987, Sato und Kitajima 2013, Vimr et al. 2004, Ostan et al. 2017). Das Bakterium bildet das Lactoferrin bindende Protein B (LbpB), welches Lactoferrin binden kann. Bei geringen Mengen von Lactoferrin kann dieses zur Eisenaufnahme genutzt werden (Ostan et al. 2017). Wissenswert wäre es herauszufinden, ob PolySia der Bakterienkapsel oder extern zugeführtes PolySia diesen Mechanismus beeinflussen.

Es wird auch diskutiert, dass Peptide wie Lactoferricin in NET-Strukturen aus Lactoferrin gebildet werden könnten, da in NET-Strukturen viele unterschiedliche Proteasen aktiv sind (Vogel 2012, Brinkmann et al. 2004). Zusätzlich besitzen unterschiedliche Bakterien unter anderem als Virulenzfaktoren ebenfalls Proteasen (Wandersman 1989). Daraufhin könnte man die Frage stellen, welchen Einfluss die Bindung von PolySia an Lactoferrin auf die Entstehung dieser Peptide haben könnte.

Durch das Zusammenspiel von PolySia und Lactoferrin oder Lactoferricin könnten sich somit mögliche Therapieansätze entwickeln, um die nachteiligen und krankheitsauslösenden Wirkungen von NET einzuschränken oder aber auch andere

physiologische Wirkungen von Lactoferrin oder Lactoferricin zu modulieren. Alle drei Moleküle werden bereits einzeln in unterschiedlichen Therapieansätzen diskutiert oder angewendet (Bruni et al. 2016, Wu et al. 2018, Kanwar et al. 2015, Svendsen et al. 2019, Ting Zhang 2014, Zhang et al. 2016). Sowohl Lactoferrin als auch PolySia werden dabei für Anwendungen in der Nanotechnologie untersucht, speziell PolySia wird dabei schon als Möglichkeit zur Anwendung gegen die zytotoxischen Histone in NET diskutiert (Yan et al. 2018, Kanwar et al. 2015, Kanwar, Samarasinghe, et al. 2012, Galuska, Dambon, et al. 2017, Wu et al. 2018, Meng et al. 2018). Interessanterweise gibt es schon klinische Studien zu beispielsweise polysialyliertem Erythropoietin. Hierbei jedoch vor allem um die Lebensdauer des Proteins im Organismus zu verlängern (Meng et al. 2018).

Insgesamt zeigte sich innerhalb meiner Arbeit, dass die Kombination der beiden Biomoleküle Lactoferrin und PolySia eine günstige therapeutische Möglichkeit bieten könnte, den Prozess der NETose zu regulieren und somit die negativen Einflüsse von NET zu senken. Außerdem könnten sich nach weiteren Untersuchungen Lactoferrin und PolySia als wirkungsvolle antibakterielle Partner herausstellen. Trotzdem sollte im Gedächtnis behalten werden, dass es sich hierbei um erste optimistische Grundlagenforschung handelt, denen definitiv weitere Untersuchungen folgen müssten.

5. Zusammenfassung

Diese Arbeit handelt von den multifunktionalen und immunmodulatorischen Biomolekülen Lactoferrin und dem Polysialinsäuren (PolySia), die beide Einfluss auf die Bildung und Aktivität von neutrophilen extrazellulären Fallen (engl. Abk. NET) haben. In vorangegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass nach Affinitätspräzipitation gegen PolySia auch Lactoferrin aus Körperflüssigkeiten wie Seminalplasma, Blut und Milch isoliert wird, obwohl Lactoferrin selbst keine PolySia-Ketten trägt. Dies ließ vermuten, dass eine Interaktion zwischen der linearen Zuckerkette PolySia und Lactoferrin stattfindet. Aus diesem Grund standen sowohl die Charakterisierung einer möglichen Interaktion zwischen Lactoferrin und PolySia sowie der Einfluss solch einer Interaktion auf deren biologische Aktivität im Fokus. Die Analysen zeigten, dass PolySia in Abhängigkeit der Kettenlänge über die N-terminale Region von Lactoferrin gebunden wird. Innerhalb der N-terminalen Region von Lactoferrin ist eine kleine basische Domäne namens Lactoferricin lokalisiert, die proteolytisch freigesetzt werden kann und antimikrobielle Eigenschaften besitzt. Unsere Analysen zeigten, dass freies Lactoferricin ebenfalls mit PolySia in Abhängigkeit der Kettenlänge interagiert und so wurde die Wirkung des antimikrobiellen Peptides Lactoferricin auf *E. coli* untersucht, während es gleichzeitig in Interaktion mit PolySia treten konnte. Es stellte sich heraus, dass PolySia egal mit welchem Polymerisationsgrad, keinen negativen Einfluss auf die antimikrobielle Wirkung von Lactoferricin hatte. Dadurch könnte sich diese Interaktion als ein interessantes, therapeutisches, antimikrobielles Pärchen darstellen.

Darüber hinaus wurde der Einfluss von PolySia auf biologische Funktionen von Lactoferrin analysiert, wobei zwei Wirkungsweisen eines Zusammenspiels der beiden Biomoleküle aufgezeigt wurden. Einerseits verstärkt die Zugabe von PolySia die Fähigkeit von Lactoferrin, die Freisetzung von NET bei neutrophilen Granulozyten zu hindern. Dabei bildet es eine Art Schild um die Membranen der neutrophilen Granulozyten und hindert somit die Ruptur dieser und somit die Ausschüttung der NET-Fasern. Andererseits ist PolySia vermutlich in der Lage, den Austausch von Lactoferrin in bereits freigesetzte und mit Lactoferrin beladenen NET-Fasern durch externes Lactoferrin zu modulieren.

Da die Ausschüttung von NET nicht nur positive Effekte wie die Bekämpfung von Pathogenen hat, sondern auch im Zusammenhang mit vielen Krankheiten steht, ist es von besonderer Bedeutung, die Regulations- und Modulationsmechanismen von NET aufzuschlüsseln. Diese könnten dann für zukünftige Therapieentwicklungen zur Verfügung stehen. Mit der Interaktion der natürlichen Biomoleküle PolySia und Lactoferrin bzw. Lactoferricin haben wir wahrscheinlich ein solches Paar gefunden.

6. Summary

This work deals with the multifunctional and immunomodulatory biomolecules lactoferrin and polysialic acid (polySia), both of which influence the formation and activity of neutrophil extracellular traps (NETs). Previous work has shown that affinity precipitation of polySia from body fluids, such as seminal plasma, blood, and milk, also isolates lactoferrin, even though lactoferrin itself does not contain polySia chains. This suggests that an interaction occurs between the linear polySia sugar chain and lactoferrin.

For this reason, the focus of this work was to characterize a possible interaction between lactoferrin and polySia, as well as to determine what influence this type of interaction might have on their biological activity. The analyses showed that, depending on its chain length, polySia binds to the N-terminal region of lactoferrin. This N-terminal region contains a small basic domain, called lactoferricin, which can be proteolytically released and has antimicrobial properties. Results of further analyses showed that free lactoferricin also interacts with polySia, depending on the chain length. The antimicrobial effect of lactoferricin against *E. coli* was examined further while allowing the peptide to interact with polySia simultaneously. The results showed that, regardless of the degree of polymerization, polySia had no negative influence on the antimicrobial activity of lactoferricin. Therefore, this interaction could represent an interesting therapeutic antimicrobial couple.

The influence of polySia on the biological functions of lactoferrin was also analyzed. The interaction of both molecules revealed two modes of action. On the one hand, in induced neutrophil granulocytes, the addition of polySia increases the ability of lactoferrin to prevent the release of NET by neutrophils. To do this, lactoferrin forms a kind of shield around the cell surface of the neutrophil granulocytes, thereby preventing the rupture of the cell membrane and thus preventing the release of NET fibers. On the other hand, polySia is probably able to modulate the exchange of lactoferrin between NET fibers that are already loaded with lactoferrin and external lactoferrin.

Since the distribution of NET not only has positive effects, such as combating pathogens, but is also related to many diseases, exploring the regulatory and modulation mechanisms of NET is particularly important. These mechanisms could be helpful in developing novel therapeutic strategies. The interaction between the natural biomolecules polySia and lactoferrin or lactoferricin indicate that we have probably come across a promising antimicrobial couple.

7. Referenzen

- Actor, J. K., S. A. Hwang, und M. L. Kruzel. 2009. "Lactoferrin as a Natural Immune Modulator." *Current Pharmaceutical Design* 15 (17):1956-1973.
- Adlam, C., JM. Knights, A. Mugridge, J. M. Williams, und JC. Lindon. 1987. "Production of colominic acid by *Pasteurella haemolytica* serotype A2 organisms." *FEMS microbiology letters* 42 (1):23-25.
- Adlerova, L., A. Bartoskova, und M. Faldyna. 2008. "Lactoferrin: a review." *Veterinarni Medicina* 53 (9):457-468.
- Aguilera, O., H. Ostolaza, L. M. Quiros, und J. F. Fierro. 1999. "Permeabilizing action of an antimicrobial lactoferricin-derived peptide on bacterial and artificial membranes." *Febs Letters* 462 (3):273-277. doi: Doi 10.1016/S0014-5793(99)01545-8.
- Aisen, P., und A. Liebman. 1972. "Lactoferrin and Transferrin - Comparative Study." *Biochimica Et Biophysica Acta* 257 (2):314-&.
- Alghamdi, A. S., und D. N. Foster. 2005. "Seminal DNase frees spermatozoa entangled in neutrophil extracellular traps." *Biol Reprod* 73 (6):1174-81. doi: 10.1095/biolreprod.105.045666.
- Amulic, B., und G. Hayes. 2011. "Neutrophil extracellular traps." *Curr Biol* 21 (9):R297-8. doi: 10.1016/j.cub.2011.03.021.
- Angata, K., V. Huckaby, B. Ranscht, A. Terskikh, J. D. Marth, und M. Fukuda. 2007. "Polysialic Acid-Directed Migration and Differentiation of Neural Precursors Are Essential for Mouse Brain Development." *Molecular and Cellular Biology* 27 (19):6659-6668. doi: 10.1128/mcb.00205-07.
- Angata, T., und A. Varki. 2002. "Chemical diversity in the sialic acids and related α -keto acids: an evolutionary perspective." *Chemical reviews* 102 (2):439-470.

- Baker, E. N., B. F. Anderson, H. M. Baker, C. L. Day, M. Haridas, G. E. Norris, S. V. Rumball, C. A. Smith, und D. H. Thomas. 1994. "Three-dimensional structure of lactoferrin in various functional states." *Adv Exp Med Biol* 357:1-12. doi: 10.1007/978-1-4615-2548-6_1.
- Baker, E. N., und H. M. Baker. 2005. "Molecular structure, binding properties and dynamics of lactoferrin." *Cellular and Molecular Life Sciences* 62 (22):2531-2539. doi: 10.1007/s00018-005-5368-9.
- Baker, E. N., und H. M. Baker. 2009. "A structural framework for understanding the multifunctional character of lactoferrin." *Biochimie* 91 (1):3-10.
- Baker, H. M., und E. N. Baker. 2012. "A structural perspective on lactoferrin function." *Biochem Cell Biol* 90 (3):320-8. doi: 10.1139/o11-071.
- Barry, G. T., und W. F. Goebel. 1957. "Colominic acid, a substance of bacterial origin related to sialic acid." *Nature* 179 (4552):206.
- Baveye, S., E. Ellass, D. G. Fernig, C. Blanquart, J. Mazurier, und D. Legrand. 2000. "Human lactoferrin interacts with soluble CD14 and inhibits expression of endothelial adhesion molecules, E-selectin and ICAM-1, induced by the CD14-lipopolysaccharide complex." *Infection and immunity* 68 (12):6519-6525.
- Belachew, S., R. Chittajallu, A. A. Aguirre, X. Yuan, M. Kirby, S. Anderson, und V. Gallo. 2003. "Postnatal NG2 proteoglycan-expressing progenitor cells are intrinsically multipotent and generate functional neurons." *The Journal of cell biology* 161 (1):169-186.
- Bellamy, W., M. Takase, H. Wakabayashi, K. Kawase, und M. Tomita. 1992. "Antibacterial spectrum of lactoferricin B, a potent bactericidal peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin." *J Appl Bacteriol* 73 (6):472-9.
- Bellamy, W., M. Takase, K. Yamauchi, H. Wakabayashi, K. Kawase, und M. Tomita. 1992. "Identification of the bactericidal domain of lactoferrin." *Biochim Biophys Acta* 1121 (1-2):130-6.

- Birgens, H. S., H. Karle, N. E. Hansen, und L. Ostergaard Kristensen. 1984. "Lactoferrin receptors in normal and leukaemic human blood cells." *Scand J Haematol* 33 (3):275-80.
- Bonfanti, L. 2006. "PSA-NCAM in mammalian structural plasticity und neurogenesis." *Progress in Neurobiology* 80 (3):129-164. doi: <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2006.08.003>.
- Bornhöfft, K. F., T. Viergutz, A. Kühnle, und S. P. Galuska. 2019. "Nanoparticles Equipped with α 2,8-Linked Sialic Acid Chains Inhibit the Release of Neutrophil Extracellular Traps." *Nanomaterials* 9 (4):610.
- Borregaard, N., O. E. Sørensen, und K. Theilgaard-Mönch. 2007. "Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins." *Trends in Immunology* 28 (8):340-345. doi: <https://doi.org/10.1016/j.it.2007.06.002>.
- Branzk, N., und V. Papayannopoulos. 2013. "Molecular mechanisms regulating NETosis in infection and disease." *Semin Immunopathol* 35 (4):513-30. doi: 10.1007/s00281-013-0384-6.
- Brinkmann, V. 2018. "Neutrophil Extracellular Traps in the Second Decade." *J Innate Immun*:1-8. doi: 10.1159/000489829.
- Brinkmann, V., U. Reichard, C. Goosmann, B. Fauler, Y. Uhlemann, D. S. Weiss, Y. Weinrauch, und A. Zychlinsky. 2004. "Neutrophil extracellular traps kill bacteria." *Science* 303 (5663):1532-5. doi: 10.1126/science.1092385.
- Brinkmann, V., und A. Zychlinsky. 2007. "Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs." *Nat Rev Microbiol* 5 (8):577-82. doi: 10.1038/nrmicro1710.
- Brinkmann, V., und A. Zychlinsky. 2012. "Neutrophil extracellular traps: Is immunity the second function of chromatin?" *Journal of Cell Biology* 198 (5):773-783.
- Britigan, B. E., M. B. Hayek, B. N. Doebbeling, und R. B. Fick, Jr. 1993. "Transferrin and lactoferrin undergo proteolytic cleavage in the *Pseudomonas aeruginosa*-infected lungs of patients with cystic fibrosis." *Infect Immun* 61 (12):5049-55.

- Britigan, B. E., Jonathan, S. Serody, und M. S. Cohen. 1994. "The Role of Lactoferrin as an Anti-Inflammatory Molecule." In *Lactoferrin: Structure and Function*, edited by T. William Hutchens, Sylvia V. Rumball and Bo Lönnerdal, 143-156. Boston, MA: Springer US.
- Brock, J. 1995. "Lactoferrin: a multifunctional immunoregulatory protein?" *Immunol Today* 16 (9):417-9.
- Broussard, D. L. 1995. "Gastrointestinal motility in the neonate." *Clinics in perinatology* 22 (1):37-59.
- Bruni, N., M. T. Capucchio, E. Biasibetti, E. Pessione, S. Cirrincione, L. Giraud, A. Corona, und F. Dosio. 2016. "Antimicrobial activity of lactoferrin-related peptides and applications in human and veterinary medicine." *Molecules* 21 (6):752.
- Buderus, S., J. H. Boone, und M. J. Lentze. 2015. "Fecal Lactoferrin: Reliable Biomarker for Intestinal Inflammation in Pediatric IBD." *Gastroenterology research and practice* 2015:578527-578527. doi: 10.1155/2015/578527.
- Bullen, JJ., und E. Griffiths. 1987. *Iron and infection: molecular, physiological, and clinical aspects*: John Wiley & Sons.
- Caccavo, D., N. M. Pellegrino, M. Altamura, A. Rigon, L. Amati, A. Amoroso, und E. Jirillo. 2002. "Antimicrobial and immunoregulatory functions of lactoferrin and its potential therapeutic application." *Journal of Endotoxin Research* 8 (6):403-417.
- Chen, Y., Z. Zheng, X. Zhu, Y. Shi, D. Tian, F. Zhao, N. Liu, P. S. Huppi, F. A. Troy, 2nd, und B. Wang. 2015. "Lactoferrin Promotes Early Neurodevelopment and Cognition in Postnatal Piglets by Upregulating the BDNF Signaling Pathway and Polysialylation." *Mol Neurobiol* 52 (1):256-69. doi: 10.1007/s12035-014-8856-9.
- Cheng, J. B., J. Q. Wang, D. P. Bu, G. L. Liu, C. G. Zhang, H. Y. Wei, L. Y. Zhou, und J. Z. Wang. 2008. "Factors affecting the lactoferrin concentration in bovine milk." *Journal of Dairy Science* 91 (3):970-976. doi: 10.3168/jds.2007-0689.

- Chou, HH., H. Takematsu, S. Diaz, J. Iber, E. Nickerson, K. L. Wright, E. A. Muchmore, D. L. Nelson, S. T. Warren, and A. Varki. 1998. "A mutation in human CMP-sialic acid hydroxylase occurred after the Homo-Pan divergence." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95 (20):11751. doi: 10.1073/pnas.95.20.11751.
- Chuong, CM., and G. M. Edelman. 1984. "Alterations in neural cell adhesion molecules during development of different regions of the nervous system." *Journal of Neuroscience* 4 (9):2354-2368.
- Coddeville, B., G. Strecker, JM. Wieruszeski, J. FG. Vliegenthart, H. van Halbeek, J. Peter-Katalinić, H. Egge, and G. Spik. 1992. "Heterogeneity of bovine lactotransferrin glycans. Characterization of α -D-Galp-(1 \rightarrow 3)- β -D-Gal-and α -NeuAc-(2 \rightarrow 6)- β -D-GalpNAc-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcNAc-substituted N-linked glycans." *Carbohydrate research* 236:145-164.
- Cohen, M., and A. Varki. 2010. "The sialome—far more than the sum of its parts." *OmicS: a journal of integrative biology* 14 (4):455-464.
- Colley, K. J., K. Kitajima, and C. Sato. 2014. "Polysialic acid: biosynthesis, novel functions and applications." *Crit Rev Biochem Mol Biol* 49 (6):498-532. doi: 10.3109/10409238.2014.976606.
- Cornish, J., K. E. Callon, D. Naot, K. P. Palmano, T. Banovic, U. Bava, M. Watson, J. M. Lin, P. C. Tong, Q. Chen, V. A. Chan, H. E. Reid, N. Fazzalari, H. M. Baker, E. N. Baker, N. W. Haggarty, A. B. Grey, and I. R. Reid. 2004. "Lactoferrin is a potent regulator of bone cell activity and increases bone. formation in vivo." *Endocrinology* 145 (9):4366-4374.
- Curreli, S., Z. Arany, R. Gerardy-Schahn, D. Mann, and N. M. Stamatou. 2007. "Polysialylated neuropilin-2 is expressed on the surface of human dendritic cells and modulates dendritic cell-T lymphocyte interactions." *J Biol Chem* 282 (42):30346-56. doi: 10.1074/jbc.M702965200.
- Davidson, L. A., and B. Lönnerdal. 1987. "Persistence of human milk proteins in the breast-fed infant." *Acta Paediatrica* 76 (5):733-740.

- de Buhr, N., und M. von Köckritz-Blickwede. 2016. "How neutrophil extracellular traps become visible." *Journal of immunology research* 2016.
- Donovan, S. M. 2016. "The role of lactoferrin in gastrointestinal and immune development and function: a preclinical perspective." *The Journal of pediatrics* 173:S16-S28.
- Doyle, L. W., und J. L. Y. Cheong. 2019. "Does bovine lactoferrin prevent late-onset neonatal sepsis?" *The Lancet* 393 (10170):382-384. doi: 10.1016/S0140-6736(18)32390-0.
- Drago-Serrano, M. E., M. de la Garza-Amaya, J. S. Luna, und R. Campos-Rodríguez. 2012. "Lactoferrin-lipopolysaccharide (LPS) binding as key to antibacterial and antiendotoxic effects." *International Immunopharmacology* 12 (1):1-9. doi: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2011.11.002>.
- Drake, P. M., J. K. Nathan, C. M. Stock, P. V. Chang, M. O. Muench, D. Nakata, J. R. Reader, P. Gip, K. PK. Golden, und B. Weinhold. 2008. "Polysialic acid, a glycan with highly restricted expression, is found on human and murine leukocytes and modulates immune responses." *The Journal of Immunology* 181 (10):6850-6858.
- Egan, W., TY. Liu, D. Dorow, J. S. Cohen, J. D. Robbins, E. C. Gotschlich, und J. B. Robbins. 1977. "Structural studies on the sialic acid polysaccharide antigen of *Escherichia coli* strain Bos-12." *Biochemistry* 16 (16):3687-3692.
- Ellison, RT. 3rd, T. J. Giehl, und F. M. LaForce. 1988. "Damage of the outer membrane of enteric gram-negative bacteria by lactoferrin and transferrin." *Infection and Immunity* 56 (11):2774-2781.
- Fadok, V. A., A. de Cathelineau, D. L. Daleke, P. M Henson, und D. L Bratton. 2001. "Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts." *Journal of Biological Chemistry* 276 (2):1071-1077.
- Farnaud, S., und R. W. Evans. 2003. "Lactoferrin--a multifunctional protein with antimicrobial properties." *Mol Immunol* 40 (7):395-405.

- Faurschou, M., und N. Borregaard. 2003. "Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation." *Microbes Infect* 5 (14):1317-27.
- Ferguson, A. D., W. Welte, E. Hofmann, B. Lindner, O. Holst, J. W. Coulton, und K. Diederichs. 2000. "A conserved structural motif for lipopolysaccharide recognition by procaryotic and eucaryotic proteins." *Structure* 8 (6):585-592.
- Fillebeen, C., L. Descamps, M.-P. Dehouck, L. Fenart, M. Benaïssa, G. Spik, R. Cecchelli, und A. Pierce. 1999. "Receptor-mediated transcytosis of lactoferrin through the blood-brain barrier." *Journal of Biological Chemistry* 274 (11):7011-7017.
- Finne, J. 1982. "Occurrence of Unique Polysialosyl Carbohydrate Units in Glycoproteins of Developing Brain." *Journal of Biological Chemistry* 257 (20):1966-1970.
- Finne, J., U. Finne, H. Deagostinibazin, und C. Goridis. 1983. "Occurrence of Alpha-2-8 Linked Polysialosyl Units in a Neural Cell-Adhesion Molecule." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 112 (2):482-487.
- Förster, R., A. C. Davalos-Misslitz, und A. Rot. 2008. "CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance." *Nature Reviews Immunology* 8 (5):362-371. doi: 10.1038/nri2297.
- Fuchs, T. A., U. Abed, C. Goosmann, R. Hurwitz, I. Schulze, V. Wahn, Y. Weinrauch, V. Brinkmann, und A. Zychlinsky. 2007. "Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps." *J Cell Biol* 176 (2):231-41. doi: 10.1083/jcb.200606027.
- Fujita, K.-i., E. Matsuda, K. Sekine, M. Ligo, und H. Tsuda. 2004. "Lactoferrin enhances Fas expression and apoptosis in the colon mucosa of azoxymethane-treated rats." *Carcinogenesis* 25 (10):1961-1966. doi: 10.1093/carcin/bgh205.
- Galuska, C. E., J. A. Dambon, A. Kühnle, K. F. Bornhöfft, G. Prem, K. Zlatina, T. Lütke, und S. P. Galuska. 2017. "Artificial Polysialic Acid Chains as Sialidase-Resistant Molecular-Anchors to Accumulate Particles on Neutrophil Extracellular Traps." *Frontiers in Immunology* 8. doi: ARTN 122910.3389/fimmu.2017.01229.

- Galuska, C. E., T. Lütteke, und S. P. Galuska. 2017. "Is Polysialylated NCAM Not Only a Regulator during Brain Development But also during the Formation of Other Organs?" *Biology (Basel)* 6 (2). doi: 10.3390/biology6020027.
- Galuska, S. P., C. E. Galuska, T. Tharmalingam, K. Zlatina, G. Prem, F. C. O. Husejnov, P. M. Rudd, W. F. Vann, C. Reid, J. Vionnet, M. E. Gallagher, F. A. Carrington, S. L. Hassett, und S. D. Carrington. 2017. "In vitro generation of polysialylated cervical mucins by bacterial polysialyltransferases to counteract cytotoxicity of extracellular histones." *FEBS J* 284 (11):1688-1699. doi: 10.1111/febs.14073.
- Galuska, S. P., R. Geyer, R. Gerardy-Schahn, M. Mühlenhoff, und H. Geyer. 2008. "Enzyme-dependent variations in the polysialylation of the neural cell adhesion molecule (NCAM) in vivo." *J Biol Chem* 283 (1):17-28. doi: 10.1074/jbc.M707024200.
- Galuska, S. P., M. Rollenhagen, M. Kaup, K. Eggers, I. Oltmann-Norden, M. Schiff, M. Hartmann, B. Weinhold, H. Hildebrandt, R. Geyer, M. Mühlenhoff, und H. Geyer. 2010. "Synaptic cell adhesion molecule SynCAM 1 is a target for polysialylation in postnatal mouse brain." *Proc Natl Acad Sci U S A* 107 (22):10250-5. doi: 10.1073/pnas.0912103107.
- Gifford, J. L., H. N. Hunter, und H. J. Vogel. 2005. "Lactoferricin: a lactoferrin-derived peptide with antimicrobial, antiviral, antitumor and immunological properties." *Cell Mol Life Sci* 62 (22):2588-98. doi: 10.1007/s00018-005-5373-z.
- Giza, J., und T. Biederer. 2010. "Polysialic acid: a veteran sugar with a new site of action in the brain." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (23):10335-10336.
- Goldmann, O., und E. Medina. 2013. "The expanding world of extracellular traps: not only neutrophils but much more." *Frontiers in Immunology* 3.
- Gonsalves, S., M. Lim, P. Finan, P. Sagar, und D. Burke. 2013. "Fecal Lactoferrin: A Noninvasive Fecal Biomarker for the Diagnosis and Surveillance of Pouchitis." *Diseases of the Colon & Rectum* 56 (6):733-737. doi: 10.1097/DCR.0b013e318280194a.

- Görmez, U., M. Kürkcü, M. E Benlidayi, K. Ulubayram, Y. Sertdemir, und K. Dağlıoğlu. 2015. "Effects of bovine lactoferrin in surgically created bone defects on bone regeneration around implants." *Journal of oral science* 57 (1):7-15.
- Grey, A., T. Banovic, Q. Zhu, M. Watson, K. Callon, K. Palmano, J. Ross, D. Naot, I. R. Reid, und J. Cornish. 2004. "The low-density lipoprotein receptor-related protein 1 is a mitogenic receptor for lactoferrin in osteoblastic cells." *Molecular Endocrinology* 18 (9):2268-2278.
- Groves, M. L. 1960. "The isolation of a red protein from Milk2." *Journal of the American Chemical Society* 82 (13):3345-3350.
- Hahn, S., S. Giaglis, I. Hoesli, und P. Hasler. 2012. "Neutrophil NETs in reproduction: from infertility to preeclampsia and the possibility of fetal loss." *Front Immunol* 3:362. doi: 10.3389/fimmu.2012.00362.
- Harada, E., Y. Itoh, K. Sitizyo, T. Takeuchi, Y. Araki, und H. Kitagawa. 1999. "Characteristic transport of lactoferrin from the intestinal lumen into the bile via the blood in piglets." *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 124 (3):321-327.
- Hasler, P., S. Giaglis, und S. Hahn. 2016. "Neutrophil extracellular traps in health and disease." *Swiss Med Wkly* 146:w14352. doi: 10.4414/smw.2016.14352.
- He, Y., L. Cao, und J. Yu. 2018. "Prophylactic lactoferrin for preventing late-onset sepsis and necrotizing enterocolitis in preterm infants: A PRISMA-compliant systematic review and meta-analysis." *Medicine* 97 (35):e11976-e11976. doi: 10.1097/MD.00000000000011976.
- Hildebrandt, H., M. Mühlenhoff, und R. Gerardy-Schahn. 2010. "Polysialylation of NCAM." In *Structure and Function of the Neural Cell Adhesion Molecule NCAM*, 95-109. Springer.
- Hoskin, D. W. 2011. "Lactoferricin Antiangiogenesis Inhibitor." In *Encyclopedia of Cancer*, edited by Manfred Schwab, 1968-1971. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

- Hunter, H. N., A. R. Demcoe, H. Jenssen, T. J. Gutteberg, und H. J. Vogel. 2005. "Human lactoferricin is partially folded in aqueous solution and is better stabilized in a membrane mimetic solvent." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49 (8):3387-3395.
- Hwang, P. M., N. Zhou, X. Shan, C. H. Arrowsmith, und H. J. Vogel. 1998. "Three-dimensional solution structure of lactoferricin B, an antimicrobial peptide derived from bovine lactoferrin." *Biochemistry* 37 (12):4288-98. doi: 10.1021/bi972323m.
- Inoue, M., J. Yamada, N. Kitamura, K. Shimazaki, A. Andren, und T. Yamashita. 1993. "Immunohistochemical Localization of Lactoferrin in Bovine Exocrine Glands." *Tissue & Cell* 25 (5):791-797.
- Irie, A., S. Koyama, Y. Kozutsumi, T. Kawasaki, und A. Suzuki. 1998. "The Molecular Basis for the Absence of N-Glycolylneuraminic Acid in Humans." *Journal of Biological Chemistry* 273 (25):15866-15871.
- Isomura, R., K. Kitajima, und C. Sato. 2011. "Structural and functional impairments of polysialic acid by a mutated polysialyltransferase found in schizophrenia." *Journal of Biological Chemistry* 286 (24):21535-21545.
- Jameson, G. B., B. F. Anderson, G. E. Norris, D. H. Thomas, und E. N. Baker. 1998. "Structure of human apolactoferrin at 2.0 Å resolution. Refinement and analysis of ligand-induced conformational change." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 54 (Pt 6 Pt 2):1319-35. doi: 10.1107/s0907444498004417.
- Janas, T., K. Nowotarski, und T. Janas. 2010. "Polysialic acid can mediate membrane interactions by interacting with phospholipids." *Chemistry and physics of lipids* 163 (3):286.
- Janas, T., und T. Janas. 2011. "Membrane oligo- and polysialic acids." *Biochim Biophys Acta* 1808 (12):2923-32. doi: 10.1016/j.bbamem.2011.08.036.
- Jenssen, H., und R. E. W. Hancock. 2009. "Antimicrobial properties of lactoferrin." *Biochimie* 91 (1):19-29. doi: 10.1016/j.biochi.2008.05.015.

- Johnson, C. P., I. Fujimoto, U. Rutishauser, und D. E. Leckband. 2005. "Direct evidence that neural cell adhesion molecule (NCAM) polysialylation increases intermembrane repulsion and abrogates adhesion." *Journal of Biological Chemistry* 280 (1):137-145.
- Kai, K, KI. Komine, Y. Komine, T. Kuroishi, T. Kozutsumi, J. Kobayashi, M. Ohta, H. Kitamura, und K. Kumagai. 2002. "Lactoferrin stimulates a *Staphylococcus aureus* killing activity of bovine phagocytes in the mammary gland." *Microbiology and immunology* 46 (3):187-194.
- Kallolimath, S., A. Castilho, R. Strasser, C. Grunwald-Gruber, F. Altmann, S. Strubl, C. E. Galuska, K. Zlatina, S. P. Galuska, S. Werner, H. Thiesler, S. Werneburg, H. Hildebrandt, R. Gerardy-Schahn, und H. Steinkellner. 2016. "Engineering of complex protein sialylation in plants." *Proc Natl Acad Sci U S A* 113 (34):9498-503. doi: 10.1073/pnas.1604371113.
- Kamemori, N., T. Takeuchi, A. Sugiyama, M. Miyabayashi, H. Kitagawa, H. Shimizu, K. Ando, und E. Harada. 2008. "Trans-endothelial and trans-epithelial transfer of lactoferrin into the brain through BBB and BCSFB in adult rats." *Journal of Veterinary Medical Science* 70 (3):313-315.
- Kanato, Y., K. Kitajima, und C. Sato. 2008. "Direct binding of polysialic acid to a brain-derived neurotrophic factor depends on the degree of polymerization." *Glycobiology* 18 (12):1044-53. doi: 10.1093/glycob/cwn084.
- Kanwar, J. R., K. Roy, Y. Patel, S. F. Zhou, M. R. Singh, D. Singh, M. Nasir, R. Sehgal, A. Sehgal, R. S. Singh, S. Garg, und R. K. Kanwar. 2015. "Multifunctional iron bound lactoferrin and nanomedicinal approaches to enhance its bioactive functions." *Molecules* 20 (6):9703-31. doi: 10.3390/molecules20069703.
- Kanwar, J. R., X. Y. Sun, V. Punj, B. Sriramoju, R. R. Mohan, S. F. Zhou, A. Chauhan, und R. K. Kanwar. 2012. "Nanoparticles in the treatment and diagnosis of neurological disorders: untamed dragon with fire power to heal." *Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine* 8 (4):399-414. doi: 10.1016/j.nano.2011.08.006.

- Kanwar, J. R., K. P. Palmano, X. Sun, R. K. Kanwar, R. Gupta, N. Haggarty, A. Rowan, S. Ram, and G. W. Krissansen. 2008. "'Iron-saturated' lactoferrin is a potent natural adjuvant for augmenting cancer chemotherapy." *Immunology & Cell Biology* 86 (3):277-288. doi: 10.1038/sj.icb.7100163.
- Kanwar, J. R., R. M. Samarasinghe, R. Sehgal, and R. K. Kanwar. 2012. "Nano-lactoferrin in diagnostic, imaging and targeted delivery for cancer and infectious diseases." *Journal of cancer science & therapy* 4 (3):31-42.
- Kanyshkova, T. G., D. V. Semenov, V. N. Buneva, and G. A. Nevinsky. 1999. "Human milk lactoferrin binds two DNA molecules with different affinities." *FEBS letters* 451 (3):235-237.
- Kaplan, M. J., and M. Radic. 2012. "Neutrophil Extracellular Traps: Double-Edged Swords of Innate Immunity." *Journal of Immunology* 189 (6):2689-2695.
- Karav, S., J. B. German, C. Rouquie, A. Le Parc, and D. Barile. 2017. "Studying Lactoferrin N-Glycosylation." *International Journal of Molecular Sciences* 18 (4).
- Kawai, K., S. Hagiwara, A. Anri, and H. Nagahata. 1999. "Lactoferrin concentration in milk of bovine clinical mastitis." *Vet Res Commun* 23 (7):391-8. doi: 10.1023/a:1006347423426.
- Keller, H. U., and E. Sorkin. 1968. "Chemotaxis of leucocytes." *Experientia* 24 (7):641-652. doi: 10.1007/bf02138287.
- Kenny, E. F., A. Herzig, R. Kruger, A. Muth, S. Mondal, P. R. Thompson, V. Brinkmann, H. V. Bernuth, and A. Zychlinsky. 2017. "Diverse stimuli engage different neutrophil extracellular trap pathways." *Elife* 6. doi: 10.7554/eLife.24437.
- Kiermaier, E., C. Moussion, C. T. Veldkamp, R. Gerardy-Schahn, I. de Vries, L. G. Williams, G. R. Chaffee, A. J. Phillips, F. Freiberger, R. Imre, D. Taleski, R. J. Payne, A. Braun, R. Forster, K. Mechtler, M. Mühlenhoff, B. F. Volkman, and M. Sixt. 2016. "Polysialylation controls dendritic cell trafficking by regulating chemokine recognition." *Science* 351 (6269):186-90. doi: 10.1126/science.aad0512.

- Kiselyov, V. V. 2010. "NCAM and the FGF-Receptor." In *Structure and Function of the Neural Cell Adhesion Molecule NCAM*, 67-79. Springer.
- Kiselyov, V. V, G. Skladchikova, A. M. Hinsby, P. H. Jensen, N. Kulahin, V. Soroka, N. Pedersen, V. Tsetlin, F. M. Poulsen, und V. Berezin. 2003. "Structural basis for a direct interaction between FGFR1 and NCAM and evidence for a regulatory role of ATP." *Structure* 11 (6):691-701.
- Kitajima, K., Y. Inoue, und S. Inoue. 1986. "Polysialoglycoproteins of Salmonidae fish eggs. Complete structure of 200-kDa polysialoglycoprotein from the unfertilized eggs of rainbow trout (*Salmo gairdneri*)." *Journal of Biological Chemistry* 261 (12):5262-5269.
- Kruger, P., M. Saffarzadeh, A. N. R. Weber, N. Rieber, M. Radsak, H. von Bernuth, C. Benarafa, D. Roos, J. Skokowa, und D. Hartl. 2015. "Neutrophils: between host defence, immune modulation, and tissue injury." *PLoS pathogens* 11 (3):e1004651.
- Kühnle, A., T. Lütke, K. F. Bornhöfft, und S. P. Galuska. 2019. "Polysialic Acid Modulates the Binding of External Lactoferrin in Neutrophil Extracellular Traps." *Biology (Basel)* 8 (2). doi: 10.3390/biology8020020.
- Kühnle, A., R. Veelken, C. E. Galuska, M. Saftenberger, M. Verleih, H. C. Schuppe, S. Rudloff, C. Kunz, und S. P. Galuska. 2019. "Polysialic acid interacts with lactoferrin and supports its activity to inhibit the release of neutrophil extracellular traps." *Carbohydrate Polymers* 208:32-41. doi: 10.1016/j.carbpol.2018.12.033.
- Kühnle, A., C. E. Galuska, K. Zlatina, und S. P. Galuska. 2020. "The Bovine Antimicrobial Peptide Lactoferricin Interacts with Polysialic Acid without Loss of Its Antimicrobial Activity against *Escherichia coli*." *Animals* 10 (1):1.
- Kuwata, H., T. T. Yip, M. Tomita, und T. W. Hutchens. 1998. "Direct evidence of the generation in human stomach of an antimicrobial peptide domain (lactoferricin) from ingested lactoferrin." *Biochimica Et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology* 1429 (1):129-141.

- Lackie, P. M., C. Zuber, und J. Roth. 1990. "Polysialic acid and N-CAM localisation in embryonic rat kidney: mesenchymal and epithelial elements show different patterns of expression." *Development* 110 (3):933-947.
- Lackie, P. M., C. Zuber, und J. Roth. 1991. "Expression of polysialylated N-CAM during rat heart development." *Differentiation* 47 (2):85-98.
- Lackie, P. M., C. Zuber, und J. Roth. 1994. "Polysialic acid of the neural cell adhesion molecule (N-CAM) is widely expressed during organogenesis in mesodermal and endodermal derivatives." *Differentiation* 57 (2):119-131.
- Lambert, L. A. 2012. "Molecular evolution of the transferrin family and associated receptors." *Biochim Biophys Acta* 1820 (3):244-55. doi: 10.1016/j.bbagen.2011.06.002.
- Le Parc, A., D. C. Dallas, S. Duaut, J. Leonil, P. Martin, und D. Barile. 2014. "Characterization of goat milk lactoferrin N-glycans and comparison with the N-glycomes of human and bovine milk." *Electrophoresis* 35 (11):1560-70. doi: 10.1002/elps.201300619.
- Le Parc, A., S. Karav, C. Rouquie, E. A. Maga, A. Bunyatratchata, und D. Barile. 2017. "Characterization of recombinant human lactoferrin N-glycans expressed in the milk of transgenic cows." *Plos One* 12 (2). doi: ARTN e0171477 10.1371/journal.pone.0171477.
- Legrand, D. 2016. "Overview of Lactoferrin as a Natural Immune Modulator." *Journal of Pediatrics* 173:S10-S15.
- Legrand, D., A. Pierce, E. Ellass, M. Carpentier, C. Mariller, und J. Mazurier. 2008. "Lactoferrin structure and functions." *Adv Exp Med Biol* 606:163-94. doi: 10.1007/978-0-387-74087-4_6.
- Legrand, D., E. Ellass, M. Carpentier, und J. Mazurier. 2006. "Interactions of lactoferrin with cells involved in immune function." *Biochemistry and cell biology* 84 (3):282-290.

- Leiding, J. W. 2017. "Neutrophil Evolution and Their Diseases in Humans." *Frontiers in immunology* 8:1009-1009. doi: 10.3389/fimmu.2017.01009.
- Levay, P. F., und M. Viljoen. 1995. "Lactoferrin - a General-Review." *Haematologica* 80 (3):252-267.
- Li, H., Y. Tong, L. Bai, L. Ye, L. Zhong, X. Duan, und Y. Zhu. 2018. "Lactoferrin functionalized PEG-PLGA nanoparticles of shikonin for brain targeting therapy of glioma." *Int J Biol Macromol* 107 (Pt A):204-211. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.08.155.
- Liao, Y., R. Jiang, und B. Lönnnerdal. 2012. "Biochemical and molecular impacts of lactoferrin on small intestinal growth and development during early life." *Biochem Cell Biol* 90 (3):476-84. doi: 10.1139/o11-075.
- Liedtke, S., H. Geyer, M. Wuhrer, R. Geyer, G. Frank, R. Gerardy-Schahn, U. Zähringer, und M. Schachner. 2001. "Characterization of N-glycans from mouse brain neural cell adhesion molecule." *Glycobiology* 11 (5):373-384.
- Lippolis, J. D., T. A. Reinhardt, J. P. Goff, und R. L. Horst. 2006. "Neutrophil extracellular trap formation by bovine neutrophils is not inhibited by milk." *Veterinary Immunology and Immunopathology* 113 (1-2):248-255. doi: 10.1016/j.vetimm.2006.05.004.
- Lönnnerdal, B. 2019. "History of the International Conferences on Lactoferrin Structure and Function." accessed 13.03. <https://www.lactoferrinconference2019.com/history.html>.
- Lönnnerdal, B. 2013. "Bioactive proteins in breast milk." *Journal of paediatrics and child health* 49:1-7.
- Maacks, S., H. Z. Yuan, und W. G. Wood. 1989. "Development and Evaluation of Luminescence-Based Sandwich Assay for Plasma Lactoferrin as a Marker for Sepsis and Bacterial-Infections in Pediatric Medicine." *Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence* 3 (4):221-226. doi: DOI 10.1002/bio.1170030411.

- Mader, J. S., Jayme S., David M. C., and D. W. Hoskin. 2005. "Bovine lactoferricin selectively induces apoptosis in human leukemia and carcinoma cell lines." *Molecular Cancer Therapeutics* 4 (4):612-624. doi: 10.1158/1535-7163.Mct-04-0077.
- Maneva, A. I., L. M. Sirakov, and V. V. Manev. 1983. "Lactoferrin binding to neutrophilic polymorphonuclear leucocytes." *Int J Biochem* 15 (7):981-4.
- Marx, M., E. Rivera-Milla, K. Stummeyer, R. Gerardy-Schahn, and M. Bastmeyer. 2007. "Divergent evolution of the vertebrate polysialyltransferase Stx and Pst genes revealed by fish-to-mammal comparison." *Developmental biology* 306 (2):560-571.
- Masson, P. L., and J. F. Heremans. 1971. "Lactoferrin in milk from different species." *Comp Biochem Physiol B* 39 (1):119-29. doi: 10.1016/0305-0491(71)90258-6.
- Masson, P. L., J. F. Heremans, J. J. Prignot, and G. Wauters. 1966. "Immunohistochemical localization and bacteriostatic properties of an iron-binding protein from bronchial mucus." *Thorax* 21 (6):538-44. doi: 10.1136/thx.21.6.538.
- Mather, I. H. 2000. "A review and proposed nomenclature for major proteins of the milk-fat globule membrane." *Journal of dairy science* 83 (2):203-247.
- Meng, H, C. Lockshin, S. Jain, U. Shaligram, J. Martinez, D. Genkin, DB. Hill, C. Ehre, D. Clark, and H. Hoppe. 2018. "Clinical application of polysialylated therapeutic proteins." *Recent Patents on Drug Delivery & Formulation*.
- Metzboutigue, M. H., J. Jolles, J. Mazurier, F. Schoentgen, D. Legrand, G. Spik, J. Montreuil, and P. Jolles. 1984. "Human Lactotransferrin - Amino-Acid Sequence and Structural Comparisons with Other Transferrins." *European Journal of Biochemistry* 145 (3):659-676.
- Metzler, K. D., C. Goosmann, A. Lubojemska, A. Zychlinsky, and V. Papayannopoulos. 2014. "A myeloperoxidase-containing complex regulates neutrophil elastase release and actin dynamics during NETosis." *Cell reports* 8 (3):883-896.

- Mishra, B., M. von der Ohe, C. Schulze, S. Bian, T. Makhina, G. Loers, R. Kleene, and M. Schachner. 2010. "Functional role of the interaction between polysialic acid and extracellular histone H1." *J Neurosci* 30 (37):12400-13. doi: 10.1523/JNEUROSCI.6407-09.2010.
- Mohanty, D., R. Jena, P. K. Choudhury, R. Pattnaik, S. Mohapatra, and M. R. Saini. 2016. "Milk Derived Antimicrobial Bioactive Peptides: A Review." *International Journal of Food Properties* 19 (4):837-846.
- Mühlenhoff, M., M. Rollenhagen, S. Werneburg, R. Gerardy-Schahn, and H. Hildebrandt. 2013. "Polysialic acid: versatile modification of NCAM, SynCAM 1 and neuropilin-2." *Neurochem Res* 38 (6):1134-43. doi: 10.1007/s11064-013-0979-2.
- Nazir, S., M. Nasir, A Yasmeen, and S. Usman. 2017. "Review study on lactoferrin: A multifunctional protein." *Sky Journal of Food Science* 6 (2):014 - 020.
- Neeli, I., N. Dwivedi, S. Khan, and M. Radic. 2009. "Regulation of extracellular chromatin release from neutrophils." *Journal of innate immunity* 1 (3):194-201.
- Neeli, I., S. N. Khan, and M. Radic. 2008. "Histone deimination as a response to inflammatory stimuli in neutrophils." *The Journal of Immunology* 180 (3):1895-1902.
- Nel, J. G., A. J. Theron, R. Pool, C. Durandt, G. R. Tintinger, and R. Anderson. 2016. "Neutrophil extracellular traps and their role in health and disease." *South African Journal of Science* 112 (1-2):01-09.
- Nissen, G. A. S. 2019. "Einflussfaktoren der ex vivo-Migration neutrophiler Granulozyten."
- Okubo, K., M. Kamiya, Y. Urano, H. Nishi, J. M. Herter, T. Mayadas, D. Hirohama, K. Suzuki, H. Kawakami, M. Tanaka, M. Kurosawa, S. Kagaya, K. Hishikawa, M. Nangaku, T. Fujita, M. Hayashi, and J. Hirahashi. 2016. "Lactoferrin Suppresses Neutrophil Extracellular Traps Release in Inflammation." *EBioMedicine* 10:204-15. doi: 10.1016/j.ebiom.2016.07.012.

- Oltmann-Norden, I., S. P. Galuska, H. Hildebrandt, R. Geyer, R. Gerardy-Schahn, H. Geyer, und M. Mühlhoff. 2008. "Impact of the polysialyltransferases ST8SialI and ST8SialIV on polysialic acid synthesis during postnatal mouse brain development." *Journal of Biological Chemistry* 283 (3):1463-1471.
- Ono, S., M. Hane, K. Kitajima, und C. Sato. 2012. "Novel regulation of fibroblast growth factor 2 (FGF2)-mediated cell growth by polysialic acid." *J Biol Chem* 287 (6):3710-3722. doi: 10.1074/jbc.M111.276618.
- Ostan, N. K. H., RH. Yu, D. Ng, C. CL. Lai, A. K. Pogoutse, V. Sarpe, M. Hepburn, J. Sheff, S. Raval, D. C. Schriemer, T. F. Moraes, und A. B. Schryvers. 2017. "Lactoferrin binding protein B – a bi-functional bacterial receptor protein." *PLOS Pathogens* 13 (3):e1006244. doi: 10.1371/journal.ppat.1006244.
- Papayannopoulos, V., K. D. Metzler, A. Hakkim, und A. Zychlinsky. 2010. "Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps." *The Journal of cell biology* 191 (3):677-691.
- Parker, H., M. Dragunow, M. B. Hampton, A. J. Kettle, und C. C. Winterbourn. 2012. "Requirements for NADPH oxidase and myeloperoxidase in neutrophil extracellular trap formation differ depending on the stimulus." *Journal of leukocyte biology* 92 (4):841-849.
- Phillipson, M., und P. Kubes. 2011. "The neutrophil in vascular inflammation." *Nat Med* 17 (11):1381-90. doi: 10.1038/nm.2514.
- Pillay, J., I. den Braber, N. Vrisekoop, L. M. Kwast, R. J de Boer, J. AM. Borghans, K. Tesselaar, und L. Koenderman. 2010. "In vivo labeling with $^2\text{H}_2\text{O}$ reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days." *Blood* 116 (4):625-627.
- Pilsczek, F. H., D. Salina, K. KH. Poon, C. Fahey, B. G. Yipp, C. D. Sibley, S. M. Robbins, F. HY. Green, M. G. Surette, und M. Sugai. 2010. "A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to *Staphylococcus aureus*." *The Journal of Immunology* 185 (12):7413-7425.

- Pisanu, S., T. Cubeddu, D. Pagnozzi, S. Rocca, C. Cacciotto, A. Alberti, G. Marogna, S. Uzzau, und M. F. Addis. 2015. "Neutrophil extracellular traps in sheep mastitis." *Vet Res* 46:59. doi: 10.1186/s13567-015-0196-x.
- Preeti, J. K. R., M. Suman, U. Kannegundla, M. Thakur, und R. Kumar. 2018. "A multifunctional bioactive protein: Lactoferrin."
- Remijsen, Q., T. V. Berghe, E. Wirawan, B. Asselbergh, E. Parthoens, R. De Rycke, S. Noppen, M. Delforge, J. Willems, und P. Vandenabeele. 2011. "Neutrophil extracellular trap cell death requires both autophagy and superoxide generation." *Cell Research* 21 (2):290-304. doi: 10.1038/cr.2010.150.
- Rey-Gallardo, A., C. Delgado-Martín, R. Gerardy-Schahn, J. L. Rodríguez-Fernández, und M. A. Vega. 2011. "Polysialic acid is required for neuropilin-2a/b-mediated control of CCL21-driven chemotaxis of mature dendritic cells and for their migration in vivo." *Glycobiology* 21 (5):655-662.
- Rørvig, S., O. Østergaard, N. H. H. Heegaard, und N. Borregaard. 2013. "Proteome profiling of human neutrophil granule subsets, secretory vesicles, and cell membrane: correlation with transcriptome profiling of neutrophil precursors." *Journal of Leukocyte Biology* 94 (4):711-721. doi: 10.1189/jlb.1212619.
- Rothbard, JB., R. Brackenbury, B. A. Cunningham, und G. M. Edelman. 1982. "Differences in the carbohydrate structures of neural cell-adhesion molecules from adult and embryonic chicken brains." *Journal of Biological Chemistry* 257 (18):11064-11069.
- Rutishauser, U., A. Acheson, AK. Hall, DM. Mann, und J. Sunshine. 1988. "The neural cell adhesion molecule (NCAM) as a regulator of cell-cell interactions." *Science* 240 (4848):53-57. doi: 10.1126/science.3281256.
- Rutishauser, U. 2008. "Polysialic acid in the plasticity of the developing and adult vertebrate nervous system." *Nature Reviews Neuroscience* 9 (1):26-35.
- Rutishauser, U., M. Watanabe, J. Silver, F. A. Troy, und E. R. Vimr. 1985. "Specific alteration of NCAM-mediated cell adhesion by an endoneuraminidase." *J Cell Biol* 101 (5 Pt 1):1842-9. doi: 10.1083/jcb.101.5.1842.

- Saffarzadeh, M., C. Juenemann, M. A. Queisser, G. Lochnit, G. Barreto, S. P. Galuska, J. Lohmeyer, und K. T. Preissner. 2012. "Neutrophil Extracellular Traps Directly Induce Epithelial and Endothelial Cell Death: A Predominant Role of Histones." *Plos One* 7 (2). doi: ARTN e32366 10.1371/journal.pone.0032366.
- Sapon, K., T. Janas, A. F. Sikorski, und T. Janas. 2018. "Polysialic acid chains exhibit enhanced affinity for ordered regions of membranes." *Biochim Biophys Acta*. doi: 10.1016/j.bbamem.2018.07.008.
- Sato, C., und K. Kitajima. 2013. "Disialic, oligosialic and polysialic acids: distribution, functions and related disease." *J Biochem* 154 (2):115-36. doi: 10.1093/jb/mvt057.
- Sato, C. 2004. "Chain length diversity of sialic acids and its biological significance." *Trends in Glycoscience and Glycotechnology* 16 (91):331-344.
- Sato, C., und K. Kitajima. 1999. "Glycobiology of di- and oligosialyl glycotopes." *Trends in Glycoscience and Glycotechnology* 11 (62):371-390.
- Sato, C., und K. Kitajima. 2015. "Polysialic Acid." In *Glycoscience: Biology and Medicine*, edited by Naoyuki Taniguchi, Tamao Endo, Gerald W. Hart, Peter H. Seeberger and Chi-Huey Wong, 519-528. Tokyo: Springer Japan.
- Schauer, R. 2009. "Sialic acids as regulators of molecular and cellular interactions." *Current Opinion in Structural Biology* 19 (5):507-514. doi: 10.1016/j.sbi.2009.06.003.
- Schiff, M., B. Weinhold, C. Grothe, und H. Hildebrandt. 2009. "NCAM and polysialyltransferase profiles match dopaminergic marker gene expression but polysialic acid is dispensable for development of the midbrain dopamine system." *Journal of neurochemistry* 110 (5):1661-1673.
- Schnaar, R. L., R. Gerardy-Schahn, und H. Hildebrandt. 2014. "Sialic acids in the brain: gangliosides and polysialic acid in nervous system development, stability, disease, and regeneration." *Physiol Rev* 94 (2):461-518. doi: 10.1152/physrev.00033.2013.

- Schulz, E. C., D. Schwarzer, M. Frank, K. Stummeyer, M. Mühlenhoff, A. Dickmanns, R. Gerardy-Schahn, und R. Ficner. 2010. "Structural basis for the recognition and cleavage of polysialic acid by the bacteriophage K1F tailspike protein EndoNF." *Journal of molecular biology* 397 (1):341-351.
- SeGall, G. K., und W. J. Lennarz. 1979. "Chemical characterization of the component of the jelly coat from sea urchin eggs responsible for induction of the acrosome reaction." *Developmental biology* 71 (1):33-48.
- Seki, T., und Y. Arai. 1993. "Distribution and possible roles of the highly polysialylated neural cell adhesion molecule (NCAM-H) in the developing and adult central nervous system." *Neuroscience research* 17 (4):265-290.
- Sherman, M. P., D. H. Adamkin, P. G. Radmacher, J. Sherman, und V. Niklas. 2012. "Protective proteins in mammalian milks: lactoferrin steps forward." *NeoReviews* 13 (5):e293-e301.
- Shi, P., Q. Wang, C. Yu, F. Fan, M. Liu, M. Tu, W. Lu, und M. Du. 2017. "Hydroxyapatite nanorod and microsphere functionalized with bioactive lactoferrin as a new biomaterial for enhancement bone regeneration." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 155:477-486.
- Shimazaki, K. I., und K. Kawai. 2017. "Advances in lactoferrin research concerning bovine mastitis." *Biochem Cell Biol* 95 (1):69-75. doi: 10.1139/bcb-2016-0044.
- Siebert, P. D., und B. CB. Huang. 1997. "Identification of an alternative form of human lactoferrin mRNA that is expressed differentially in normal tissues and tumor-derived cell lines." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94 (6):2198-2203.
- Simon, P., S. Baumner, O. Busch, R. Rohrich, M. Kaese, P. Richterich, A. Wehrend, K. Muller, R. Gerardy-Schahn, M. Mühlenhoff, H. Geyer, R. Geyer, R. Middendorff, und S. P. Galuska. 2013. "Polysialic acid is present in mammalian semen as a post-translational modification of the neural cell adhesion molecule NCAM and the polysialyltransferase ST8Siall." *J Biol Chem* 288 (26):18825-33. doi: 10.1074/jbc.M113.451112.

- Simon, P., C. Feuerstacke, M. Kaese, F. Saboor, R. Middendorff, und S. P. Galuska. 2015. "Polysialylation of NCAM characterizes the proliferation period of contractile elements during postnatal development of the epididymis." *PLoS One* 10 (3):e0123960. doi: 10.1371/journal.pone.0123960.
- Singh, P. K., M. R. Parsek, E. P. Greenberg, und M. J. Welsh. 2002. "A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development." *Nature* 417 (6888):552.
- Sinnis, P., T. E. Willnow, MR. Briones, J. Herz, und V. Nussenzweig. 1996. "Remnant lipoproteins inhibit malaria sporozoite invasion of hepatocytes." *Journal of Experimental Medicine* 184 (3):945-954.
- Skinner, B. M., und E. EP. Johnson. 2017. "Nuclear morphologies: their diversity and functional relevance." *Chromosoma* 126 (2):195-212.
- Sorensen, M., und SPL. Sorensen. 1940. "The proteins in whey." *Compte rendu des Travaux du Laboratoire de Carlsberg, Ser. Chim.* 23 (7):55-99.
- Suzuki, Y. A., V. Lopez, und B. Lönnerdal. 2005. "Mammalian lactoferrin receptors: structure and function." *Cell Mol Life Sci* 62 (22):2560-75. doi: 10.1007/s00018-005-5371-1.
- Svendsen, J. S. M., T. M. Grant, D. Rennison, M. A. Brimble, und J. Svenson. 2019. "Very Short and Stable Lactoferricin-Derived Antimicrobial Peptides: Design Principles and Potential Uses." *Accounts of Chemical Research* 52 (3):749-759.
- The UniProt, Consortium. 2018. "UniProt: a worldwide hub of protein knowledge." *Nucleic Acids Research* 47 (D1):D506-D515. doi: 10.1093/nar/gky1049.
- Theolier, J., I. Fliss, J. Jean, und R. Hammami. 2014. "Antimicrobial Peptides of Dairy Proteins: From Fundamental to Applications." *Food Reviews International* 30 (2):134-154. doi: 10.1080/87559129.2014.896017.
- Thiery, J. P., J. L. Duband, U. Rutishauser, und G. M. Edelman. 1982. "Cell adhesion molecules in early chicken embryogenesis." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 79 (21):6737-6741. doi: 10.1073/pnas.79.21.6737.

- Ting, Z., Z. She, Z. Huang, J. Li, X. Luo, Y. Deng. 2014. "Application of sialic acid/polysialic acid in the drug delivery systems." *Asian journal of pharmaceutical sciences* 9:75 -81. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajps.2014.03.001>.
- Tiralongo, J., and I. M. Duncker, (Eds.). 2013. *Sialobiology: Structure, biosynthesis and function. Sialic acid glycoconjugates in health and disease*. (Vol. 1). Bentham Science Publishers.
- Tomita, M., H. Wakabayashi, K. Shin, K. Yamauchi, T. Yaeshima, and K. Iwatsuki. 2009. "Twenty-five years of research on bovine lactoferrin applications." *Biochimie* 91 (1):52-57. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2008.05.021>.
- Ulm, C., M. Saffarzadeh, P. Mahavadi, S. Muller, G. Prem, F. Saboor, P. Simon, R. Middendorff, H. Geyer, I. Henneke, N. Bayer, S. Rinne, T. Lütteke, E. Bottcher-Friebertshausen, R. Gerardy-Schahn, D. Schwarzer, M. Mühlenhoff, K. T. Preissner, A. Gunther, R. Geyer, and S. P. Galuska. 2013. "Soluble polysialylated NCAM: a novel player of the innate immune system in the lung." *Cell Mol Life Sci* 70 (19):3695-708. doi: 10.1007/s00018-013-1342-0.
- Valenti, P., and G. Antonini. 2005. "Lactoferrin." *Cellular and Molecular Life Sciences* 62 (22):2576.
- van Berkel, P. H., M. E. Geerts, H. A. van Veen, M. Mericskay, H. A. de Boer, and J. H. Nuijens. 1997. "N-terminal stretch Arg2, Arg3, Arg4 and Arg5 of human lactoferrin is essential for binding to heparin, bacterial lipopolysaccharide, human lysozyme and DNA." *Biochem J* 328 (Pt 1):145-51.
- van Veen, H. A., M. E. J. Geerts, P. H. C. van Berkel, and J. H. Nuijens. 2004. "The role of N-linked glycosylation in the protection of human and bovine lactoferrin against tryptic proteolysis." *European Journal of Biochemistry* 271 (4):678-684. doi: 10.1111/j.1432-1033.2003.03965.x.
- vanBerkel, P. H. C., H. A. vanVeen, M. E. J. Geerts, H. A. deBoer, and J. H. Nuijens. 1996. "Heterogeneity in utilization of N-glycosylation sites Asn(624) and Asn(138) in human lactoferrin: A study with glycosylation-site mutants." *Biochemical Journal* 319:117-122. doi: DOI 10.1042/bj3190117.

- Villanueva, E., S. Yalavarthi, C. C. Berthier, J. B. Hodgins, R. Khandpur, A. M. Lin, C. J. Rubin, W. Zhao, S. H. Olsen, and M. Klinker. 2011. "Netting neutrophils induce endothelial damage, infiltrate tissues, and expose immunostimulatory molecules in systemic lupus erythematosus." *The Journal of Immunology* 187 (1):538-552.
- Vimr, E. R., K. A. Kalivoda, E. L. Deszo, and S. M. Steenbergen. 2004. "Diversity of microbial sialic acid metabolism." *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68 (1):132-153.
- Vogel, H. J. 2012. "Lactoferrin, a bird's eye view." *Biochem Cell Biol* 90 (3):233-44. doi: 10.1139/o2012-016.
- Vorland, L. H., and Q. Rekdal. 2002. "Evidence for a direct antitumor mechanism of action of bovine lactoferricin." *Anticancer research* 22:2703-2710.
- Vorland, L. H., H. Ulvatne, J. Andersen, H. H. Haukland, Ø. Rekdal, J. S. Svendsen, and T. J. Gutteberg. 1998. "Lactoferricin of Bovine Origin is More Active than Lactoferricins of Human, Murine and Caprine Origin." *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 30 (5):513-517. doi: 10.1080/00365549850161557.
- Wandersman, C. 1989. "Secretion, Processing and Activation of Bacterial Extracellular Proteases." *Molecular Microbiology* 3 (12):1825-1831.
- Wang, B., Y. P. Timilsena, E. Blanch, and B. Adhikari. 2017. "Lactoferrin: Structure, function, denaturation and digestion." *Crit Rev Food Sci Nutr*:1-17. doi: 10.1080/10408398.2017.1381583.
- Wang, M., Z. Sun, T. Yu, F. Ding, L. Li, X. Wang, M. Fu, H. Wang, J. Huang, N. Li, and Y. Dai. 2017. "Large-scale production of recombinant human lactoferrin from high-expression, marker-free transgenic cloned cows." *Scientific Reports* 7 (1):10733. doi: 10.1038/s41598-017-11462-z.
- Wang, Y., M. Li, S. Stadler, S. Correll, P. Li, D. Wang, R. Hayama, L. Leonelli, H. Han, S. A. Grigoryev, C. D. Allis, and S. A. Coonrod. 2009. "Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation." *J Cell Biol* 184 (2):205-13. doi: 10.1083/jcb.200806072.

- Ward, P. A. 1970. "Neutrophil chemotactic factors and related clinical disorders." *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology* 13 (2):181-186.
- Ward, PP., E. Paz, und OM. Conneely. 2005. "Lactoferrin." *Cellular and Molecular Life Sciences* 62 (22):2540.
- Weinhold, B., R. Seidenfaden, I. Rockle, M. Mühlenhoff, F. Schertzing, S. Conzelmann, J. D. Marth, R. Gerardy-Schahn, und H. Hildebrandt. 2005. "Genetic ablation of polysialic acid causes severe neurodevelopmental defects rescued by deletion of the neural cell adhesion molecule." *J Biol Chem* 280 (52):42971-7. doi: 10.1074/jbc.M511097200.
- Werneburg, S., Falk F. R. Buettner, L. Erben, M. Mathews, H. Neumann, M. Mühlenhoff, und H. Hildebrandt. 2016. "Polysialylation and lipopolysaccharide-induced shedding of E-selectin ligand-1 and neuropilin-2 by microglia and THP-1 macrophages." *Glia* 64 (8):1314-1330. doi: 10.1002/glia.23004.
- Werneburg, S., M. Mühlenhoff, M. Stangel, und H. Hildebrandt. 2015. "Polysialic acid on SynCAM 1 in NG2 cells and on neuropilin-2 in microglia is confined to intracellular pools that are rapidly depleted upon stimulation." *Glia* 63 (7):1240-1255.
- Williams, E. J., J. Furness, F. S. Walsh, und P. Doherty. 1994. "Activation of the FGF receptor underlies neurite outgrowth stimulated by L1, N-CAM, and N-cadherin." *Neuron* 13 (3):583-594.
- Winterbourn, C. C., A. J. Kettle, und M. B. Hampton. 2016. "Reactive oxygen species and neutrophil function." *Annual review of biochemistry* 85:765-792.
- Wu, J., X. Zhan, L. Liu, und X. Xia. 2018. "Bioproduction, purification, and application of polysialic acid." *Applied Microbiology and Biotechnology* 102 (22):9403-9409. doi: 10.1007/s00253-018-9336-3.
- Xu, Y. R., S. Asghar, L. Yang, H. Y. Li, Z. L. Wang, Q. N. Ping, und Y. Y. Xiao. 2017. "Lactoferrin-coated polysaccharide nanoparticles based on chitosan hydrochloride/hyaluronic acid/PEG for treating brain glioma." *Carbohydrate Polymers* 157:419-428. doi: 10.1016/j.carbpol.2016.09.085.

- Yabe, U., C. Sato, T. Matsuda, and K. Kitajima. 2003. "Polysialic acid in human milk. CD36 is a new member of mammalian polysialic acid-containing glycoprotein." *J Biol Chem* 278 (16):13875-80. doi: 10.1074/jbc.M300458200.
- Yamasaki, R., and B. Bacon. 1991. "Three-dimensional structural analysis of the group B polysaccharide of *Neisseria meningitidis* 6275 by two-dimensional NMR: the polysaccharide is suggested to exist in helical conformations in solution." *Biochemistry* 30 (3):851-857.
- Yamauchi, K., M. Tomita, T. J. Giehl, and R. T. Ellison, 3rd. 1993. "Antibacterial activity of lactoferrin and a pepsin-derived lactoferrin peptide fragment." *Infect Immun* 61 (2):719-28.
- Yan, X. J., L. X. Xu, C. C. Bi, D. Y. Duan, L. X. Chu, X. Yu, Z. M. Wu, A. P. Wang, and K. X. Sun. 2018. "Lactoferrin-modified rotigotine nanoparticles for enhanced nose-to-brain delivery: LESA-MS/MSbased drug biodistribution, pharmacodynamics, and neuroprotective effects." *International Journal of Nanomedicine* 13:273-281. doi: 10.2147/Ijn.S151475.
- Yousefi, S., C. Mihalache, E. Kozlowski, I. Schmid, and H. U. Simon. 2009. "Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps." *Cell Death & Differentiation* 16 (11):1438-1444. doi: 10.1038/cdd.2009.96.
- Zhang, R., G. Loers, M. Schachner, R. Boelens, H. Wienk, S. Siebert, T. Eckert, S. Kraan, M. A. Rojas-Macias, T. Lütke, S. P. Galuska, A. Scheidig, A. K. Petridis, S. Liang, M. Billeter, R. Schauer, J. Steinmeyer, J. M. Schroder, and H. C. Siebert. 2016. "Molecular Basis of the Receptor Interactions of Polysialic Acid (polySia), polySia Mimetics, and Sulfated Polysaccharides." *ChemMedChem* 11 (9):990-1002. doi: 10.1002/cmdc.201500609.
- Zhu, X., D. E. Bergles, and A. Nishiyama. 2008. "NG2 cells generate both oligodendrocytes and gray matter astrocytes." *Development* 135 (1):145-157.
- Zlatina, K., and S. P. Galuska. 2019. "Polysialic Acid Modulates Only the Antimicrobial Properties of Distinct Histones." *Acs Omega* 4 (1):1601-1610.

- Zlatina, K., T. Lütke, und S. P. Galuska. 2017. "Individual Impact of Distinct Polysialic Acid Chain Lengths on the Cytotoxicity of Histone H1, H2A, H2B, H3 and H4." *Polymers* 9 (12).
- Zlatina, K., M. Saftenberger, A. Kühnle, C. E. Galuska, U. Gartner, A. Rebl, M. Oster, A. Vernunft, und S. P. Galuska. 2018. "Polysialic Acid in Human Plasma Can Compensate the Cytotoxicity of Histones." *International Journal of Molecular Sciences* 19 (6).
- Zuber, C., P. M. Lackie, W. A. Catterall, und J. Roth. 1992. "Polysialic Acid Is Associated with Sodium-Channels and the Neural Cell-Adhesion Molecule N-Cam in Adult-Rat Brain." *Journal of Biological Chemistry* 267 (14):9965-9971.
- Zumoffen, CM., R. Gil, AM. Caille, C. Morente, MJ. Munuce, und SA. Ghersevich. 2013. "A protein isolated from human oviductal tissue in vitro secretion, identified as human lactoferrin, interacts with spermatozoa and oocytes and modulates gamete interaction." *Human Reproduction* 28 (5):1297-1308.

Liste an Publikationen

Kühnle, A., R. Veelken, C. E. Galuska, M. Saftenberger, M. Verleih, H. C. Schuppe, S. Rudloff, C. Kunz, und S. P. Galuska. 2019. "Polysialic acid interacts with lactoferrin and supports its activity to inhibit the release of neutrophil extracellular traps." *Carbohydrate Polymers* 208:32-41. doi: 10.1016/j.carbpol.2018.12.033.

Kühnle, A., T. Lütteke, K. F. Bornhöfft, und S. P. Galuska. 2019. "Polysialic Acid Modulates the Binding of External Lactoferrin in Neutrophil Extracellular Traps." *Biology (Basel)* 8 (2). doi: 10.3390/biology8020020.

Kühnle, A., C. E. Galuska, K. Zlatina, und S. P. Galuska. 2020. "The Bovine Antimicrobial Peptide Lactoferricin Interacts with Polysialic Acid without Loss of Its Antimicrobial Activity against *Escherichia coli*." *Animals* 10 (1):1.

Bornhöfft, K. F., T. Viergutz, **A. Kühnle**, und S. P. Galuska. 2019. "Nanoparticles Equipped with α 2,8-Linked Sialic Acid Chains Inhibit the Release of Neutrophil Extracellular Traps." *Nanomaterials* 9 (4):610.

Zlatina, K., M. Saftenberger, **A. Kühnle**, C. E. Galuska, U. Gartner, A. Rebl, M. Oster, A. Vernunft, und S. P. Galuska. 2018. "Polysialic Acid in Human Plasma Can Compensate the Cytotoxicity of Histones." *International Journal of Molecular Sciences* 19 (6).

Galuska, C. E., J. A. Dambon, **A. Kühnle**, K. F. Bornhofft, G. Prem, K. Zlatina, T. Lütteke, und S. P. Galuska. 2017. "Artificial Polysialic Acid Chains as Sialidase-Resistant Molecular-Anchors to Accumulate Particles on Neutrophil Extracellular Traps." *Frontiers in Immunology* 8. doi: ARTN 1229 10.3389/fimmu.2017.01229.

Strubl, S., U. Schubert, **A. Kühnle**, A. Rebl, N. Ahmadvand, S. Fischer, K. T. Preissner, und S. P. Galuska. 2018. "Polysialic acid is released by human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) in vitro." *Cell and Bioscience* 8.

Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, 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

Danksagung

Als aller erstes möchte ich natürlich ganz herzlich bei meinem Doktorvater Dr. Sebastian P. Galuska bedanken, für die fortwährende Unterstützung und das Vertrauen in meine Arbeit. Außerdem möchte ich mich für die wirklich sehr gute und kollegiale Atmosphäre in der Arbeitsgruppe bedanken, die zu großen Teilen von Ihm aufgebaut wurde. Des Weiteren möchte ich mich wertschätzend für die vielen Diskussionen, guten Gesprächen und neuen Denkansätzen bedanken und dafür manchmal ins kalte Wasser geworfen zu werden. Gerade dadurch war es meiner Meinung nach möglich mich, weiter zu entwickeln.

Als nächstes möchte ich mich bei allen Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe bedanken, darunter Gesine Krüger, Kristina Zlatina, Kim F. Bornhöfft, Marzia Venuto, Christina Galuska, Rhea Veelken, Julia Hinterseher und Jan Philipp Huisl vor allem für den guten Zusammenhalt und die gegenseitige Unterstützung.

Gerne möchte ich mich auch für die liebevolle technische als auch methodische Hilfestellung im Labor vor allem bei Gesine Krüger bedanken aber auch bei Dr. Torsten Viergutz, Ursula Antkewitz, Swanhild Rodewald, Petra Reckling, Lisa Speck und Hannelore Klückmann. Besonders für die guten Absprachen, für die Zeit, die Ihr euch genommen habt um uns Materialien und Geräte zu erklären, rauszusuchen und eure ständige Motivation.

Mit Freude möchte ich mich für die Zusammenarbeit mit meinen Kooperationspartnern wie Marieke Verleih und Thomas Lütteke bedanken.

Ich freue mich außerdem darüber, dass mir meine Familie als auch mein Mann Holger Kühnle halt gaben, mich besonders motivierten und mich unterstützt haben.