

**Interaktionen von CD22 mit Milchglykoproteinen  
und mögliche Auswirkungen auf die Regulation der  
B-Zell-Aktivierung**

**Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften  
- Dr. rer. nat. -**

**vorgelegt dem Promotionsausschuss  
des Fachbereichs 2 (Biologie und Chemie) der Universität Bremen**

**von  
Nadine Bock  
aus Kiel**



**Universität Bremen  
2004**

Tag des öffentlichen Kolloquiums: 25. August 2004

Gutachter der Dissertation: Prof. Dr. rer. nat. Sørge Kelm  
Dr. med. habil. Günther Boehm



**INHALTSVERZEICHNIS**

<b>I</b>	<b>Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen</b>	<b>vii</b>
<b>II</b>	<b>Abkürzungen</b>	<b>xi</b>
<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Einführung: die Immunantwort auf Nahrungsantigene</b>	<b>1</b>
<b>1.2</b>	<b>Das spezifische Immunsystem und die Immunantwort der B-Zellen</b>	<b>2</b>
1.2.1	B-Zellen als Teil des spezifischen adaptiven Immunsystems	2
1.2.2	Der B-Zell-Antigen-Rezeptor und die Aktivierung der B-Zellen	3
1.2.3	CD22 – akzessorisches Molekül des B-Zell-Rezeptors	4
1.2.4	Der Einfluss von T-Zellen auf die humorale Immunantwort der B-Zelle	7
<b>1.3</b>	<b>Der Gastrointestinaltrakt und seine Funktion in der Abwehr von Pathogenen und nicht-pathogenen Antigenen</b>	<b>8</b>
1.3.1	Immunologische und nicht-immunologische Faktoren in der intestinalen Abwehr	8
1.3.2	Die humorale Immunantwort des Intestinaltrakts durch IgA	9
1.3.3	Intraepitheliales IgE und IgE-vermittelte Überempfindlichkeitsreaktionen	10
1.3.4	Der Einfluss der T-Zellen bei der Regulation der Abwehr im Intestinaltrakt	10
<b>1.4</b>	<b>Die Abwehr von Pathogenen und nicht-pathogenen Antigenen beim Neugeborenen</b>	<b>11</b>
1.4.1	Schwachpunkte der nicht-immunologischen Faktoren beim Neugeborenen	11
1.4.2	Probleme bei der humoralen Immunantwort des Neugeborenen	12
<b>1.5</b>	<b>Muttermilch und ihre Auswirkungen auf den Säugling</b>	<b>13</b>
1.5.1	Funktionelle Oligosaccharide der Muttermilch	13
1.5.2	Die Proteinfractionen der Muttermilch	14
1.5.3	Protektive und antiadhäsive Proteine	15
1.5.4	Immunkompetente Proteine und Peptide der Muttermilch	15
1.5.5	Zelluläre, immunstimulierende Komponenten in der Muttermilch	16
<b>1.6</b>	<b>Muttermilchersatznahrung und ihre Auswirkungen auf den Säugling</b>	<b>16</b>
1.6.1	Muttermilchersatznahrungen und Kuhmilchallergie	16
1.6.2	Hypoallergene Säuglingsnahrung	17
1.6.3	„Functional Foods“ als Vorbeugung von Nahrungsmittelüberempfindlichkeiten	18
<b>1.7</b>	<b>Sialinsäuren und Siglecs</b>	<b>19</b>
1.7.1	Sialinsäuren und ihre Funktionen	19
1.7.2	Siglecs (Sialinsäure-bindende Immunglobulin-ähnliche Lektine)	19
1.7.3	Sialinsäure-Erkennung durch Siglecs	19
<b>1.8</b>	<b>CD22 und dessen möglicher Einfluss auf die Immundefizite des Neugeborenen</b>	<b>21</b>
<b>1.9</b>	<b>Problemstellung und Ziele der Arbeit</b>	<b>22</b>

<b>2</b>	<b>MATERIAL</b>	<b>23</b>
<b>2.1</b>	<b>Antikörper, Lektine und Glykoproteine</b>	<b>23</b>
2.1.1	Antikörper für die Durchflusscytometrie	23
2.1.2	Antikörper für die Immundetektion	23
2.1.3	Glykoproteine und Antikörper für Mikrotiterplattentests	23
2.1.4	Reagenzien für den Lektinnachweis	24
<b>2.2</b>	<b>Chemikalien und Verbrauchsmaterialien</b>	<b>24</b>
2.2.1	Allgemeine Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien	24
2.2.2	Mikrotiterplatten	24
2.2.3	Materialien für die Affinitätschromatographie	25
2.2.4	Spezielle Materialien und Reagenzien	25
2.2.5	Kits	26
<b>2.3</b>	<b>Bakterien und Zelllinien</b>	<b>26</b>
2.3.1	Bakterienstämme	26
2.3.2	Eukaryotische Zellen und Zelllinien	26
<b>2.4</b>	<b>Inhibitoren: Milchproteine/-peptide und Sialinsäurederivate</b>	<b>26</b>
<b>2.5</b>	<b>Lösungen</b>	<b>27</b>
2.5.1	Medien	27
2.5.2	Mehrfach verwendete physiologische Puffer	28
<b>2.6</b>	<b>Oligonukleotide</b>	<b>28</b>
<b>2.7</b>	<b>Plasmide</b>	<b>29</b>
<b>3</b>	<b>METHODEN</b>	<b>31</b>
<b>3.1</b>	<b>Klonierungsstrategie</b>	<b>31</b>
<b>3.2</b>	<b>Amplifikation von DNA durch PCR</b>	<b>31</b>
3.2.1	PCR oder Kolonie-PCR mit <i>Taq</i> -Polymerase	32
3.2.2	PCR mit <i>Pfu</i> -Polymerase	32
<b>3.3</b>	<b>Aufreinigung von PCR-Produkten</b>	<b>33</b>
<b>3.4</b>	<b>Ortsgerichtete Mutagenese</b>	<b>33</b>
<b>3.5</b>	<b>Auftrennung und Extraktion von DNA</b>	<b>35</b>
3.5.1	Agarosegel-Elektrophorese von DNA	35
3.5.2	DNA-Extraktion aus Agarosegelen	35
<b>3.6</b>	<b>Enzymatische Modifikation von DNA</b>	<b>36</b>
3.6.1	Restriktionsverdau von DNA	36
3.6.2	Ligation von DNA-Fragmenten	36
<b>3.7</b>	<b>Herstellung kompetenter Bakterien und Transformation von DNA in Bakterien</b>	<b>36</b>
<b>3.8</b>	<b>Präparation und Konzentrationsbestimmung von Plasmid-DNA</b>	<b>37</b>
3.8.1	Plasmid-„Mini“-Präparation von DNA	37

3.8.2	Plasmid-„Midi“-Präparation von DNA	38
3.8.3	Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration	38
3.8.4	Sequenzierung von DNA	39
<b>3.9</b>	<b>Herstellung stabiler Zelllinien</b>	<b>39</b>
3.9.1	Anzucht eukaryotischer adhärenter Zellen	39
3.9.2	Immunglobulin-Depletion	39
3.9.3	Stabile Transfektion	39
3.9.4	Selektion und Anzucht stabil transfizierter Zellen	40
<b>3.10</b>	<b>Expression, Aufreinigung und Nachweis von CD22-Fc-Chimären</b>	<b>41</b>
3.10.1	Expression von rekombinanten Fc-Chimären auf Zellkulturschalen	41
3.10.2	Expression von rekombinanten Fc-Chimären in Fermentern	41
3.10.3	Quantitativer Sandwich-ELISA zum Nachweis produzierter Fc-Chimären	42
3.10.4	Festphasenbindungstest mit Erythrozyten zum Siglec-Fc Nachweis	42
3.10.5	Aufreinigung von rekombinanten Fc-Chimären	43
<b>3.11</b>	<b>Dialyse und Bestimmung der Proteinkonzentration mit dem BCA-Test</b>	<b>44</b>
<b>3.12</b>	<b>Desialylierung von Glykoproteinen</b>	<b>44</b>
<b>3.13</b>	<b>Proteinkonzentration durch Aceton-Präzipitation</b>	<b>45</b>
<b>3.14</b>	<b>Auftrennung von Proteinen</b>	<b>45</b>
3.14.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	45
3.14.2	Zweidimensionale SDS-PAGE (2D-PAGE)	45
<b>3.15</b>	<b>Detektion von Proteinen</b>	<b>47</b>
3.15.1	Färbung mit Coomassie-Brilliantblau	47
3.15.2	Silberfärbung von SDS-Gelen	48
3.15.3	Western-Blotting	49
3.15.4	Immundetektion von Proteinen	49
3.15.5	Lektindetektion von Glykoproteinen	49
3.15.6	<i>Stripping</i> von Westernblot-Membranen	50
<b>3.16</b>	<b>Aufreinigung von CD22-Liganden mittels Affinitätschromatographie</b>	<b>50</b>
<b>3.17</b>	<b>Peptidmassen-“Fingerabdruck” mittels MALDI-MS</b>	<b>51</b>
3.17.1	Vorbereitung der Proteine für den „in-Gel“-Verdau mit Trypsin (nach Bosserhoff)	51
3.17.2	Extraktion der Peptide und Aufkonzentrierung	52
3.17.3	Vorbereitung der tryptischen Peptidextrakte für die MALDI-MS	52
<b>3.18</b>	<b>Bindungstest auf Mikrotiterplatten mit immobilisierten sialylierten Zielproteinen für Siglec Fc-Chimären</b>	<b>53</b>
3.18.1	IgM-Mikrotiterplatten-Bindungstest für CD22-Fc	53
3.18.2	Einsatz der CD22-Fc Mutanten im Mikrotiterplatten-Bindungstest	55
3.18.3	Einsatz der Inhibitoren im Mikrotiterplatten-Bindungstest	55
3.18.4	Darstellung der Bindungs- und Inhibitionsparameter	55
<b>3.19</b>	<b>Bindungstest für Siglec Fc-Chimären auf <i>GlycoWell</i><sup>TM</sup>-Platten</b>	<b>57</b>
<b>3.20</b>	<b>Bindungsstudien mit dem <i>IASys</i></b>	<b>57</b>

<b>3.21</b>	<b>Bial-Test zum Nachweis freier und gebundener Sialinsäuren</b>	<b>59</b>
<b>3.22</b>	<b>Analyse der BZR-abhängigen Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung mittels Durchflusszytometrie</b>	<b>59</b>
3.22.1	Kultivierung und Indo-1 -Beladung der Daudi-Zellen	60
3.22.2	Messung der Ca <sup>2+</sup> -Mobilisierung in Daudi-Zellen	60
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>63</b>
<b>4.1</b>	<b>Zusammenfassung der Ergebnisse</b>	<b>63</b>
<b>4.2</b>	<b>Expression von CD22-Fc Wildtyp und den Mutanten</b>	<b>64</b>
<b>4.3</b>	<b>Entwicklung eines IgM-Mikrotiterplatten-Bindungstests für CD22-Fc</b>	<b>65</b>
4.3.1	<i>GlycoWell</i> - Mikrotiterplatten-Bindungstest	65
4.3.2	Entwicklung eines Mikrotiterplatten-Bindungstests für CD22-Fc	66
<b>4.4</b>	<b>Charakterisierung der Sialinsäure-abhängigen Bindung von CD22</b>	<b>72</b>
4.4.1	Analyse der Bindung von CD22-Fc Wildtyp	72
4.4.2	Bedeutung der Mutationen in der Bindungsdomäne des CD22 für die Sialinsäure-Bindung	74
<b>4.5</b>	<b>Einfluss von Milchglykoproteinen und -peptiden auf die Sialinsäure-abhängige Bindung von CD22</b>	<b>78</b>
4.5.1	Darstellung der verwendeten Milchproteine/-peptide	78
4.5.2	Einfluss von Milchproteinen und-peptiden auf die Bindung von CD22 an IgM	78
4.5.3	Einfluss von Caseinen und Caseinpeptiden auf die Bindung von CD22 an IgM	79
4.5.4	Einfluss von Molkenproteinen und ihren Peptiden auf die Bindung von CD22 an IgM	80
4.5.5	Einfluss von Proteinen pflanzlicher Herkunft auf die Bindung von CD22 an IgM	82
4.5.6	Bindungsstudien von CD22-Fc mit humanen Caseinen im <i>IASys</i>	82
<b>4.6</b>	<b>Einfluss von Milchglykoproteinen und -peptiden auf die BZR-abhängige Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung</b>	<b>84</b>
4.6.1	Verwendete Milchproteine und -peptide und die Messung der Ca <sup>2+</sup> -Mobilisierung in B-Zellen	84
4.6.2	Humane Caseine, Molkenproteine und ihre Peptide und ihr Einfluss auf die Ca <sup>2+</sup> -Mobilisierung	85
4.6.3	Kamel-Caseinhydrolysate und ihr Einfluss auf die Ca <sup>2+</sup> -Mobilisierung	88
4.6.4	Vergleich von humanen, bovinen und Kamel-Caseinhydrolysaten in der Dämpfung der Ca <sup>2+</sup> -Mobilisierung	91
<b>4.7</b>	<b>Zusammensetzung und Sialylierung von Caseinen und Molkenproteinen</b>	<b>96</b>
4.7.1	Analyse der Caseine und Molkenproteine durch Auftrennung mittels SDS-PAGE mit Proteinfärbung und Lektinnachweis	96
4.7.2	Analyse der Caseine durch Auftrennung mittels 2D-PAGE mit Proteinfärbung und Lektindetektion	99
<b>4.8</b>	<b>Affinitätschromatographie von Milchglykoproteinen mit CD22-Fc</b>	<b>103</b>
4.8.1	Affinitätschromatographie mit bovinen, humanen und Kamel-Caseinen	103
4.8.2	Vergleichende Affinitätschromatographie von humanen Molkenproteinen mit CD22-Fc	105

4.8.3	Vergleich der Affinitätschromatographie von humanen Caseinen mit kovalent gekoppeltem und Protein A-gebundenem CD22-Fc	110
4.9	<b>Identifizierung von CD22-Liganden aus humanen Caseinen mittels Peptidmassen-, „Fingerabdrucks“</b>	<b>112</b>
5	<b>DISKUSSION</b>	<b>117</b>
5.1	<b>Die Analyse der Sialinsäure-abhängigen Bindung von CD22</b>	<b>117</b>
5.2	<b>Interaktionen von Milchglykoproteinen/-peptiden mit CD22</b>	<b>120</b>
5.3	<b>Sialylierte Milchglykoproteine und Liganden für CD22</b>	<b>123</b>
5.4	<b>Einfluss von Milchglykoproteinen/-peptiden auf die B-Zell-Aktivierung</b>	<b>128</b>
5.5	<b>Ausblick</b>	<b>130</b>
6	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>133</b>
7	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>145</b>
8	<b>SUMMARY</b>	<b>147</b>
III	<b>Anhang</b>	<b>xv</b>
IV	<b>Wissenschaftliche Poster und Vorträge</b>	<b>xvii</b>
V	<b>Curriculum Vitae</b>	<b>xviii</b>
VI	<b>Danksagung</b>	<b>xix</b>
VII	<b>Erklärung</b>	<b>xx</b>





## I Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Verweise im Text auf frühere oder spätere Tabellen und Abbildungen sind normal gedruckt. Verweise auf Tabellen und Abbildungen, die in diesem Textabschnitt genauer erläutert werden, sind fett gedruckt.

### Abbildung Deckblatt

Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Fettkügelchenoberfläche (Außenansicht der Membran) in frischer Humanmilch. (aus Schlimme et al., 1995)

<b>Abbildung 1</b>	Graphische Darstellung der möglichen Inhibition der B-Zell-abhängigen Immunantwort aufgrund der Sialinsäure-abhängigen Ligandenbindung von CD22.	6
<b>Abbildung 2</b>	Schematische Darstellung des sIgA-B-Zellzyklus im sekretorischen Immunsystem.	9
<b>Abbildung 3</b>	Graphische Darstellung des Modells für den Aufbau der Caseinmicellen.	14
<b>Abbildung 4</b>	Graphische Darstellung der Struktur von Me-Neu5Ac und BPC-Neu5Ac.	21
<b>Abbildung 5</b>	Graphische Darstellung und Durchführung des IgM-Mikrotiterplatten-Bindungstests	54
<b>Abbildung 6</b>	Vergleich eines Intensitäts-Häufigkeitsdiagramms und eines Kurvendiagramms bei der Darstellung der $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung ( FL5/FL4) in Abhängigkeit von der Zeit.	61
<b>Abbildung 7</b>	Elektrophoretische Auftrennung und immunologischer Nachweis der aufgereinigten Fc-Chimären des CD22.	65
<b>Abbildung 8</b>	IgM-Mikrotiterplatten-Bindungstest: Titration von IgM und CD22-Fc.	67
<b>Abbildung 9</b>	Konzentrationsabhängige Bindung von CD22-Fc an IgM im Vergleich zu der Bindung von MAG-Fc an IgM.	69
<b>Abbildung 10</b>	Sialinsäure-abhängige Bindung von CD22-Fc an IgM sowie CD22-Fc und MAG-Fc an Fetuin.	70
<b>Abbildung 11</b>	Sialinsäure-abhängige Inhibition der Bindung von CD22-Fc an IgM durch BPC-Neu5Ac und Glykoproteine wie IgM und Fetuin.	71
<b>Abbildung 12</b>	Verdrängung von CD22-Fc aus der Sialinsäure-abhängigen Bindung an IgM und Fetuin durch BPC-Neu5Ac.	72
<b>Abbildung 13</b>	Verdrängung von CD22-Fc aus der Bindung an sialylierte Zielmoleküle durch BPC-Neu5Ac und Nachweis der Dissoziation von IgM durch Bindungsstudien im <i>IAsys</i> .	73
<b>Abbildung 14</b>	Analyse der Sialinsäure-abhängigen Bindung von CD22-Fc Mutanten.	75
<b>Abbildung 15</b>	Bindungsstudien im <i>IAsys</i> mit IgM und CD22-Fc Wt und Mutanten.	76
<b>Abbildung 16</b>	Bindungsstudien von Caseinen und Caseinpeptiden mit CD22-Fc Wt im <i>IAsys</i> .	83
<b>Abbildung 17</b>	Einfluss proteolytischer Produkte humaner Caseine und Molkenproteine auf die $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung in Daudi-Zellen.	85
<b>Abbildung 18</b>	Konzentrationsabhängiger Einfluss der Peptide der GPC- und RPC-Fractionen humaner Molkenprotein-hydrolysate auf die $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung in Daudi-Zellen.	87
<b>Abbildung 19</b>	Einfluss der Peptide der RPC-Fractionen hydrolysiertes Molkenproteine und Caseine auf die $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung in Daudi-Zellen.	88

<b>Abbildung 20</b>	Einfluss proteolytischer Produkte humaner Caseine und Kamel-Caseine auf die Ca <sup>2+</sup> -Mobilisierung in Daudi-Zellen.	89
<b>Abbildung 21</b>	Konzentrationsabhängiger Einfluss unterschiedlich hydrolysierter Kamel-Caseine und ihrer Chromatographiefraktionen auf die Ca <sup>2+</sup> -Mobilisierung in Daudi-Zellen.	90
<b>Abbildung 22</b>	Einfluss der Caseinhydrolysate und ihrer Sialylierung auf die Bindung von CD22-Fc an IgM.	92
<b>Abbildung 23</b>	Konzentrations- und Sialinsäure-abhängiger Einfluss der bovinen, humanen und Kamel-Caseinhydrolysate auf die Ca <sup>2+</sup> -Mobilisierung in Daudi-Zellen.	93
<b>Abbildung 24</b>	Einfluss boviner, humaner und Kamel-Caseinhydrolysate sowie der Coinkubationen mit BPC-Neu5Ac auf die Ca <sup>2+</sup> -Mobilisierung in Daudi-Zellen.	95
<b>Abbildung 25</b>	Nachweis elektrophoretisch aufgetrennter Caseine und Molkenproteine sowie deren proteolytischer Produkte durch Silberfärbung.	96
<b>Abbildung 26</b>	Elektrophoretische Auftrennung und SNA- und PNA-Lektinnachweis von nativen und VCS-behandelten Caseinen und Molkenproteinen aus humaner, boviner und Kamel-Milch.	98
<b>Abbildung 27</b>	PNA- und SNA-Lektinnachweis von humanen Caseinen nach zweidimensionaler elektrophoretischer Auftrennung.	100
<b>Abbildung 28</b>	SNA- und Coomassie-Nachweis von bovinen, humanen und Kamel-Caseinen nach zweidimensionaler elektrophoretischer Auftrennung.	101
<b>Abbildung 29</b>	Eluate der Affinitätschromatographie von bovinen, humanen und Kamel-Caseinen mit CD22-Fc vs. den Caseinen nach zweidimensionaler elektrophoretischer Auftrennung.	104
<b>Abbildung 30</b>	Eluate der Affinitätschromatographie von bovinen, humanen und Kamel-Caseinen mit CD22-Fc vs. SNA-Nachweis von Caseinen nach zweidimensionaler elektrophoretischer Auftrennung.	105
<b>Abbildung 31</b>	Immunologischer Nachweis von CD22-Fc im Eluat der Affinitätschromatographie sowie Silberfärbung von CD22-Fc und Laktoferrin nach zweidimensionaler elektrophoretischer Auftrennung.	106
<b>Abbildung 32</b>	Eluate der Affinitätschromatographie von humanen Molkenproteinen mit CD22-Fc, CD22-Fc Triple und Protein A nach zweidimensionaler elektrophoretischer Auftrennung.	109
<b>Abbildung 33</b>	Eluat der Affinitätschromatographie von humanen Caseinen mit kovalent und nicht-kovalent gekoppeltem CD22-Fc nach zweidimensionaler elektrophoretischer Auftrennung.	111
<b>Abbildung 34</b>	Eluate der präparativen Affinitätschromatographie von humanen Caseinen mit <i>AffiSep</i> ®CD22-Fc und mit Protein A-gekoppeltem CD22-Fc nach zweidimensionaler Auftrennung.	115
<b>Abbildung 35</b>	Aminosäure-Alignment der V-set Domäne verschiedener Siglecs	xv
<b>Abbildung 36</b>	Darstellung der Aminosäuresequenz und der Domänen-Organisation von CD22-Fc	xvi

<b>Tabelle 1</b>	Relatives Inhibitionspotential von Sialinsäurederivaten mit verschiedenen Siglecs bezogen auf 9- <i>N</i> -Diphenylacetyl-amino-Neu5Ac als Referenz (rIP =1)	20
<b>Tabelle 2</b>	Darstellung und Berechnung der Bindungsparameter von CD22-Fc an IgM.	55
<b>Tabelle 3</b>	Tabellarische Auflistung der Inhibitionsparameter, IC <sub>50</sub> und rIP, und ihre Berechnung	56
<b>Tabelle 4</b>	Die erzeugten CD22-Fc-Chimären, ihre jeweils erzielten Expressionsraten und ihre immunologische Reaktivität.	64
<b>Tabelle 5</b>	Sialinsäurebestimmung von nativem und desialyliertem IgM und Fetuin.	70
<b>Tabelle 6</b>	Relative Inhibitionspotentiale (rIP in %) von humanen, bovinen und Kamel-Caseinen und ihren Präparationen auf die Bindung von CD22-Fc an IgM.	80
<b>Tabelle 7</b>	Relative Inhibitionspotentiale (rIP in %) von humanen und bovinen Molkenproteinen, und ihrer unfraktionierten und säulenchromatographisch fraktionierten proteolytischen Produkte.	81
<b>Tabelle 8</b>	Relative Inhibitionspotentiale (rIP in %) von Pflanzenproteinhydrolysaten im Vergleich zu Milchproteinhydrolysaten auf die Bindung von CD22-Fc an IgM.	82
<b>Tabelle 9</b>	Tabellarische Zusammenfassungen der Effekte humaner Molkenproteine und Caseine sowie Kamel-Caseine auf die Ca <sup>2+</sup> -Mobilisierung in stimulierten Daudi-Zellen.	91
<b>Tabelle 10</b>	Tabellarische Darstellung der Effekte (rIP) der Sialo-/Asialo-Caseinhydrolysate auf das Ca <sup>2+</sup> -Signal	94
<b>Tabelle 11</b>	Tabellarische Zusammenfassung der nachgewiesenen Proteine in Caseinen und Molkenproteinen nach Auftrennung mittels SDS-PAGE.	99
<b>Tabelle 12</b>	Tabellarische Zusammenfassung der nachgewiesenen Proteine in humanen, bovinen und Kamel-Caseinen nach Auftrennung mittels 2D-PAGE sowie Proteinfärbung und Lektinnachweis.	102
<b>Tabelle 13</b>	Tabellarische Zusammenfassung von Molkenproteinen und der verschiedenen Eluate der Affinitätschromatographie von humanen Molkenproteinen nach Auftrennung mittels 2D-PAGE und Proteinfärbung vergleichend zu den mittels Protein- und Lektindetektion nachgewiesenen Proteinen in humanen Molkenproteinen nach SDS-PAGE.	108
<b>Tabelle 14</b>	Nummerierungsgrundlage der ausgewählten Proteinssots im 2D-Polyacrylamidgel	112
<b>Tabelle 15</b>	Gruppierung der analysierten potentiellen CD22-Liganden aus humanen Caseinen aufgrund gleicher Peptidmassen.	113
<b>Tabelle 16</b>	Bemerkungen zu Art und Qualität der Proteinidentifizierung der massenspektrometrisch analysierten Peptidextrakte ausgewählter Proteinssots	114
<b>Tabelle 17</b>	Darstellung der identifizierten, potentiellen CD22-Liganden aus humanen Caseinen.	114
<b>Tabelle 18</b>	Tabellarische Darstellung der nachgewiesenen Proteine aus elektrophoretisch aufgetrennten humanen Caseinen und Molkenproteinen und ihre Übereinstimmungen mit den in der Literatur beschriebenen Milchproteinen.	125



## II Abkürzungen

Bei einigen Begriffen wurden die englischen Fachtermini verwendet wie Blot, Screening, Spots, Wells usw., für die es in der deutschsprachigen Fachliteratur nur eine unzureichende Entsprechung gibt und für die eine Übersetzung unüblich ist.

CD22-Fc	Fusionsprodukt aus den ersten drei extrazellulären Domänen von <b>humanem CD22</b> und dem Fc-Teil des humanen IgG mit einer 3c-Proteaseschnittstelle ⇒ huCD22 <sub>d1-3</sub> -(3c)-Fc
αMEM	<i>α-modified Eagle Medium</i> (Zellkulturmedium)
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
Anti-huIgG	gegen humanes IgG gerichteter Antikörper (Fc spezifisch)
Anti-huIgG-AP	Anti-huIgG konjugiert mit alkalischer Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
arc sec	Winkelsekunde
Arg	Arginin
BCA-Test	Bichinchoninsäure-Test
Bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
BZR	B-Zell-Rezeptor
CD	Cluster of Differentiation (Oberflächenantigen)
D	Domäne(n)
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP's	Desoxynukleosid-Triphosphate
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carboimid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked immunosorbend assay
Em	Emission
Ex	Excitation
Fc	Fragment crystallizable
FCS	Fetal Calf Serum (Fötales Kälberserum)
FDP	Fluoreszeindiphosphat
FL	Fluoreszenz-Licht
FSC	Forward Scatter (Vorwärts-Streuung) (∞ Methoden)
FSK	Frei Sekretorische Komponente
Gal	Galaktose
GalNAc	<i>N</i> -Acetylgalaktosamin
GlcNAc	<i>N</i> -Acetylglukosamin
GMP	Glykomakropeptid
H	Hour (Stunde)

HEPES	Hydroxyethylpiperazinethansulfonsäure
Hu	human
IC <sub>50</sub>	Konzentration bei 50 % Inhibition (50% Bindung)
Ig	Immunglobulin
IgSF	Immunglobulin-Superfamilie
IL	Interleukin
Indo-1	Indo-1 Pentacetoxymethylester
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-triphosphat
ITIM	Immunoreceptor tyrosine based inhibitory motif (Sequenzmotif)
ITAM	Immunoreceptor tyrosine based activation motif (Sequenzmotif)
K <sub>d</sub>	Gleichgewichtskonstante
kDa	Kilodalton
Kdn	Ketodeoxynonulonsäure
LB	Medium nach <i>Luria-Bertani</i>
MAG	Myelin-assoziiertes Glykoprotein
MAL II	<i>Maackia amurensis</i> Lektin II
mIgG	membranständiges Ig
min	minute (Minute )
MOPS	4-Morpholinpropansulfonsäure
Mw	Molecular weight (Molekulargewicht)
M/z	Masse/Ladungszahl
Neu5Ac	<i>N</i> -Acetylneuraminsäure
Neu5Gc	<i>N</i> -Glykolyneuraminsäure
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
NMR	Nuclear magnetic resonance (Kernspinresonanz)
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase chain reaktion (Polymerase-Kettenreaktion)
Pen/Strep	Penicillin / Streptomycin
PNA	Peanut agglutinin ( Erdnuss Agglutinin)
PNGase F	Peptid-N-( <i>N</i> -acetyl- $\beta$ -Glykosaminyl)-asparaginamidase F
Pos.	Position (in Sequenz)
ppm	parts per million (1 in 1000000 Teilchen)
PTK	Protein-Tyrosin-Kinasen
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	revolution per minute (min <sup>-1</sup> )
RPMI	<i>Roswell Parker Memorial Institute</i> ( Zellkulturmedium)
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium dodecyl sulfate (Natriumlaurylsulfat)
sec	second (Sekunde)
SH	Src-Homology
Shc	Src homologous and collagen
SHP	SH2-domain-containing Phosphatase
Sia	Sialinsäure

S/N	Signal/Noise (Signal / Hintergrund (Rausch)-Signal)
SNA	<i>Sambucus nigra</i> (Holunderstrauch)-Rinden Lektin
Spot	Engl. für Proteinflecken in der 2D-PAGE
Src	Tyrosinkinase <i>Rous Sarkom</i>
SSC	Side Scatter / Seitwärts-Streuung
ST6Gall	Galaktose- $\alpha$ 2,6-Sialyltransferase
Syk	<i>Spleen tyrosine kinase</i> ( Tyrosinkinase der Syk/ZAP-70 Familie)
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TEMED	N, N; N', N'-Tetramethylethylendiamin
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor (transformierender Wachstumsfaktor)
Th	T-Helferzelle
Tr	regulatorische T-Zelle
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton X-100	4-(2',2',4',4'-Tetramethylbutyl)-phenyldecaethylenglycolether
Trp	Tryptophan
Tween 20	(Polyethylen-Sorbitan Monolaurat)
Tyr	Tyrosin
T4	von Bakteriophagen T4 abstammend
U	Units (Enzym-Einheiten)
UCSF	University of California San Francisco
ü.N.	Über Nacht
UV	Ultraviolett
VCS	<i>Vibrio cholerae</i> Sialidase
V	Volt
v/v	Volumenverhältnis
W/v	Gewicht zu Volumen
Wells	Engl. für Vertiefungen / Löcher von Plastikplatten
Wt	Wildtyp

Die chemischen Elemente wurden mit den üblichen Symbolen abgekürzt. Verwendete Vorsilben für die Potenzen der Zahl Zehn:

F	Femto	(1*10 <sup>-15</sup> )
P	Pico	(1*10 <sup>-12</sup> )
N	Nano	(1*10 <sup>-9</sup> )
$\mu$	Mikro	(1*10 <sup>-6</sup> )
M	Milli	(1*10 <sup>-3</sup> )
K	Kilo	(1*10 <sup>3</sup> )
M	Mega	(1*10 <sup>6</sup> )





# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Einführung: die Immunantwort auf Nahrungsantigene

Substanzen, die eine spezifische Immunantwort auslösen, werden Antigene genannt. Sie sind normalerweise nicht Bestandteil unseres Körpers. Verschiedene Moleküle können antigen wirken, was vor allem eine Anpassung des Immunsystems an die Vielfalt an Mikroorganismen darstellt. Ein reifes und ausgewogenes Immunsystem gewährt einen ausreichenden Schutz vor pathogenen Mikroorganismen und eine angemessene Toleranz gegenüber Selbststrukturen. Ungleichgewichte aufgrund unreifer oder gestörter Funktionen des Immunsystems führen zu einer Immunschwäche oder Autoimmunität.

Folgende Effekte können auftreten, wenn das Immunsystem oral und damit auch intestinal mit Nahrungs- oder anderen Fremdartigen konfrontiert wird:

- 1) Es kommt zur Induktion einer gedämpften systemischen Immunantwort, der sogenannten oralen Toleranz.
- 2) Es kommt zur Sensibilisierung des Immunsystems, die die Grundlage immunologischer Überempfindlichkeitsreaktionen bildet (Strobel, 1992).

Die Mehrzahl der Bevölkerung weist eine lebenslange klinische und immunologische Toleranz gegen Nahrungsantigene und die Mikroorganismen ihrer eigenen Darmflora auf (Strobel et al., 1998). Voraussetzung für diese orale Toleranz ist eine angemessene erworbene (adaptive) Immunität gegenüber Fremdartigen.

Eine Besonderheit bildet das Immunsystem des Neugeborenen, dessen Immunantwort in quantitativer und qualitativer Hinsicht noch unreif ist. Der Mangel intrauteriner Stimulationen hemmt die Ausbildung einer lokalen Immunabwehr. Nach der Geburt wird der Gastrointestinaltrakt des Neugeborenen mit einem vielfältigen, mikrobiellen und nahrungsabhängigen Antigenangebot konfrontiert, welches in den ersten Lebensmonaten vorrangig aus der Muttermilch aber auch aus anderen Quellen stammen kann. Der Intestinaltrakt nimmt daher bei der Reifung des Immunsystems eine wesentliche Stellung ein (Strobel et al., 1998). Die Muttermilch gleicht die Schwächen des Immunsystems aus und fördert zugleich die Reifung des Immunsystems des Neugeborenen. Bei Säuglingen, die mit Ersatznahrungen, vor allem mit denen auf Kuhmilchbasis, gefüttert werden, kommt es häufiger zu der Auslösung einer Überempfindlichkeitsreaktion oder Allergie als bei gestillten Kindern. Vermutlich sind es die artspezifischen Zusammensetzungen und das Vorkommen von bestimmter Milchproteine, die zum einen die Induktion einer Toleranz, zum anderen eine Überempfindlichkeitsreaktion bewirken. Sialinsäuren haben wahrscheinlich verschiedene Funktionen bei physiologischen Interaktionen in der Muttermilch, deren Mechanismen vielfach noch nicht geklärt sind. Das Sialinsäure-bindende Protein CD22 ist eines der Moleküle, die an der Modulation der B-Zell-abhängigen Immunantwort beteiligt sind.

## 1.2 Das spezifische Immunsystem und die Immunantwort der B-Zellen

### 1.2.1 B-Zellen als Teil des spezifischen adaptiven Immunsystems

Der Begriff „erworbene (adaptive) Immunität“ resultiert aus der Fähigkeit des spezifischen Immunsystems, Antigene gezielt zu erkennen und ein „immunologisches Gedächtnis“ nach Antigenkontakt zu entwickeln, um beim nächsten Kontakt schneller und effizienter reagieren zu können. Grundlage dieser spezifischen, adaptiven Immunantwort sind immunkompetente Zellen (Lymphozyten), die Antigene erkennen können. Die sich aufgrund dieses Antigenkontakts spezialisierenden Zellen sind die T-Zellen (Reifungsort im Thymus) und B-Zellen (Reifungsort im Knochenmark, engl. bone marrow). Diese sind in der Lage, Gedächtniszellen auszubilden sowie durch Mediatoren und Rezeptoren miteinander zu kommunizieren. Je nach Antigen benötigen B-Zellen costimulatorische Signale von T-Zellen oder nicht.

B-Zellen sind verantwortlich für die humorale Immunantwort (Körperflüssigkeit, lat.: humor), da sie nach Antigenkontakt Antikörper (Immunglobuline) sezernieren können. Diese Antikörper sind hochspezifisch für das jeweilige Antigen. Aufgrund struktureller Charakteristika werden sie in verschiedene Immunglobulinklassen (Isotypen) eingeteilt. Sie können die in extrazelluläre Kompartimente des Körpers eingedrungene Antigene komplexieren, wodurch diese neutralisiert werden, oder sie opsonieren Antigene, wodurch eine Phagozytose des Antigens durch Phagozyten (Makrophagen) eingeleitet wird.

Die unterschiedlichen Immunglobulinklassen kommen in verschiedenen Bereichen des Körpers vor und bestimmen durch dieses Umfeld ihre Funktionen. Antikörper können ihre einzigartige Antigenpezifität bei einem Isotypwechsel erhalten.

Die meistens B-Zellen produzieren zuerst IgM, die Antikörperklasse der primären Immunantwort, die im zirkulierenden Blut die erste Abwehrlinie gegen Mikroorganismen darstellt. IgG ist der häufigste Antikörper im Blut und in extrazellulären Flüssigkeiten. IgG ist als einzige Immunglobulinklasse plazentagängig. Die Rolle von IgD ist noch ungeklärt. IgE-Antikörper schützen vor allem vor Darmparasiten und kommen an der Mukosaoberfläche und unter der Haut vor. IgA ist das Hauptimmunglobulin verschiedener Sekrete und dementsprechend auf Schleimhautoberflächen wie im respiratorischen Trakt und im Intestinaltrakt sowie der Milch zu finden.

Merkmal der adaptiven Immunität von B-Zellen und T-Zellen ist neben der Ausbildung von Gedächtniszellen, die Fähigkeit zwischen fremden und nicht-fremden (selbst) Antigenen unterscheiden zu können, um Autoimmunreaktionen zu verhindern. Binden B- und T-Zellen während bestimmter Entwicklungsstadien Antigen, so wird der programmierte Zelltod (Apoptose) oder Anergie eingeleitet. Anergie ist die Inaktivierung der heranreifenden Lymphozyten. Bei selbstreaktiven B-Zellen kann Anergie durch eine verminderte Expression von membrangebundenem IgM sowie durch Inhibition der Signalwege in der B-Zelle

ausgelöst werden. Die Grundlage der humoralen Immunantwort ist die Bindung eines löslichen Antigens an den B-Zell-Antigen-Rezeptors (BZR).

### 1.2.2 Der B-Zell-Antigen-Rezeptor und die Aktivierung der B-Zellen

Um eine Antigen-vermittelte Antikörperproduktion auszulösen, ist es notwendig, dass die Antigene zuerst an membranständige Immunglobuline (mIg) als Teil des Multiproteinkomplexes des B-Zell-Rezeptors binden.

Vorraussetzung für die Lokalisierung in der Membran ist eine Transmembrandomäne des Immunglobulins. Das mIgM ist ausschließlich für die Bindung des Antigens zuständig. Für eine effektive Signalübertragung ist das mIgM daher nicht-kovalent mit dem Heterodimer  $I\alpha$  und  $I\beta$  assoziiert (Hombach et al., 1988; Schamel et al., 2000). Der cytoplasmatische Teil von  $I\alpha$  und  $I\beta$  enthält ITAM-Sequenzmotive (Immunoreceptor tyrosine based activation motif). Werden die Tyrosine dieser ITAMs phosphoryliert, werden sie durch spezielle Signalmoleküle erkannt, die wiederum eine intrazelluläre Signalkaskade einleiten (Sanchez et al., 1993). Die Bindung eines multivalenten Antigens führt zu einer Kreuzvernetzung des BZR auf der Oberfläche der B-Zellen. Dadurch werden die cytoplasmatischen Domänen der Heterodimere in Kontakt zueinander gebracht und es kommt zur Aktivierung von Protein-Tyrosinkinasen wie Syk, Fyn und Lyn, welche die Tyrosine der ITAMs von  $I\alpha/I\beta$  phosphorylieren. Die Tyrosinkinasen können an die phosphorylierten ITAMs binden und weitere Kinasen, sowie akzessorische Moleküle wie CD19, CD22 und CD45 phosphorylieren (Pleiman et al., 1994).

Aktiviertes Syk leitet eine Signalkaskade ein, die zur Freisetzung von intrazellulärem  $Ca^{2+}$  aus dem Endoplasmatischen Retikulum ins Cytoplasma führt (Berridge, 1995). Die Entleerung der intrazellulären Speicher leitet das Öffnen der  $Ca^{2+}$ -Kanäle ein, wodurch der Einstrom von extrazellulärem  $Ca^{2+}$  in die Zelle erfolgt. Das cytoplasmatische  $Ca^{2+}$  bindet an  $Ca^{2+}$ -abhängige Enzyme, die nachfolgend Transkriptionsfaktoren aktivieren, die zu einer veränderten Genexpression führen.

Eine tyrosinspezifische Phosphatase, SHP-1, inaktiviert die Tyrosinkinasen durch Dephosphorylierung und begrenzt somit die Reaktion der aktivierten B-Zelle.

Die Bindung eines Antigens an den BZR löst die Aktivierung der B-Zelle und damit letztendlich die Zellteilung und Differenzierung der Nachkommenzellen zu Antikörper-seziernden Plasmazellen aus (Cambier et al., 1994; DeFranco et al., 1995). Nach der Antigenstimulierung differenzieren einige B-Zell-Nachkommen zu Plasmazellen, die zunächst die sezernierte Form des IgM (sIgM) produzieren. Im weiteren Verlauf der Reifung produzieren Nachkommenzellen nach einem Klassenwechsel membrangebundene Immunglobuline eines anderen Isotyps, bevor sie auf die Produktion der entsprechenden sezernierten Form umschalten.

Bei den verschiedenen möglichen Signalkaskaden ist aber auch die Lokalisierung der beteiligten Moleküle wichtig. Neue Studien beschreiben entwicklungspezifische Unterschiede in der Lokalisierung des BZR und seine Bewegung in sogenannte „lipid rafts“ nach Antigen-Bindung. „Lipid rafts“ sind Mikrodomänen in der Zellmembran mit einem hohen Anteil an Cholesterin, Sphingo- und Phospholipiden. Es wird diskutiert, dass die Einleitung spezifischer Signaltransduktionswege erst durch die in „lipid rafts“ entstehenden Signalkomplexe ermöglicht wird (Pierce, 2002). Weiterführende Modelle postulieren eine Organisation von vier BZR-Komplexen (Tetrameren) in der Zellmembran. Die Organisation zu einer oligomeren Struktur könnte zu einer Verstärkung des Signals führen, die Auflösung zu einer Abnahme der Signalstärke. Über diesen Mechanismus kann die Variabilität der Signalstärke und deren Auswirkungen gesteuert werden (Reth, 2001).

Neben dem BZR dienen verschiedene Oberflächenrezeptoren auf B-Zellen dazu, dass BZR-Signal zu modulieren. Eines dieser akzessorischen Moleküle ist CD22, das einen inhibierenden Einfluss auf das intrazelluläre Signal des BZR hat und damit eine wichtige Rolle in dessen Schwellenwert-Regulation spielt.

### **1.2.3 CD22 – akzessorisches Molekül des B-Zell-Rezeptors**

CD22 ist ein Typ-1 Transmembranprotein, welches ausschließlich auf B-Zellen und deren Tumorzellen vorkommt (Stamenkovic et al., 1990). Intrazelluläres CD22 ist schon im Pro-B-Zellen detektierbar. CD22 wird ab dem Prä-B-Zell-Stadium exprimiert (Stoddart et al., 1997) und die Konzentration des Proteins an der Zelloberfläche korreliert mit dem Vorkommen an mIgM und auch mIgD (Erickson et al., 1996). Während der B-Zellentwicklung im Knochenmark und der Reifung in der Peripherie steigt die Expression von CD22 kontinuierlich an (Nitschke et al., 1997; Stoddart et al., 1997). Ein geringer Anteil des CD22 ist mit dem BZR assoziiert (Leprince et al., 1993). Die CD22-Expression wird infolge der BZR-Aktivierung verstärkt, nimmt aber bei der Differenzierung zu Antikörperproduzierenden Zellen ab. Auf Plasmazellen ist es nicht nachweisbar (Wilson et al., 1991a).

CD22 gehört zu der Familie der Siglecs, den Sialinsäure-bindenden Immunglobulin-ähnlichen Lektinen (Crocker et al., 1998). Die Siglecs gehören zu den I-Typ-Lektinen, einer Untergruppe der Immunglobulinsuperfamilie (IgSF). Die Adhäsionsdomäne der Siglecs und damit auch die des CD22 wird in Kapitel 1.7 beschrieben. CD22 besitzt sieben extrazelluläre Ig-ähnliche Domänen, einen Transmembrananker und eine cytoplasmatische Domäne. Die Sialinsäure-Bindungsstelle ist in der N-terminalen extrazellulären Domäne lokalisiert.

CD22 enthält im cytoplasmatischen Teil sechs Tyrosinreste. Drei dieser Tyrosinreste befinden sich innerhalb von ITIM-Sequenzmotiven (Immunoreceptor tyrosine based inhibitory motif). Die inhibitorische Wirkung von CD22 auf das BZR-Signal wurde postuliert, nachdem eine Interaktion von CD22 mit der Tyrosinphosphatase SHP-1 nach BZR-Stimulierung gezeigt worden war (Campbell et al., 1995; Doody et al., 1995). Die Tyrosinphosphatase SHP-1 ist

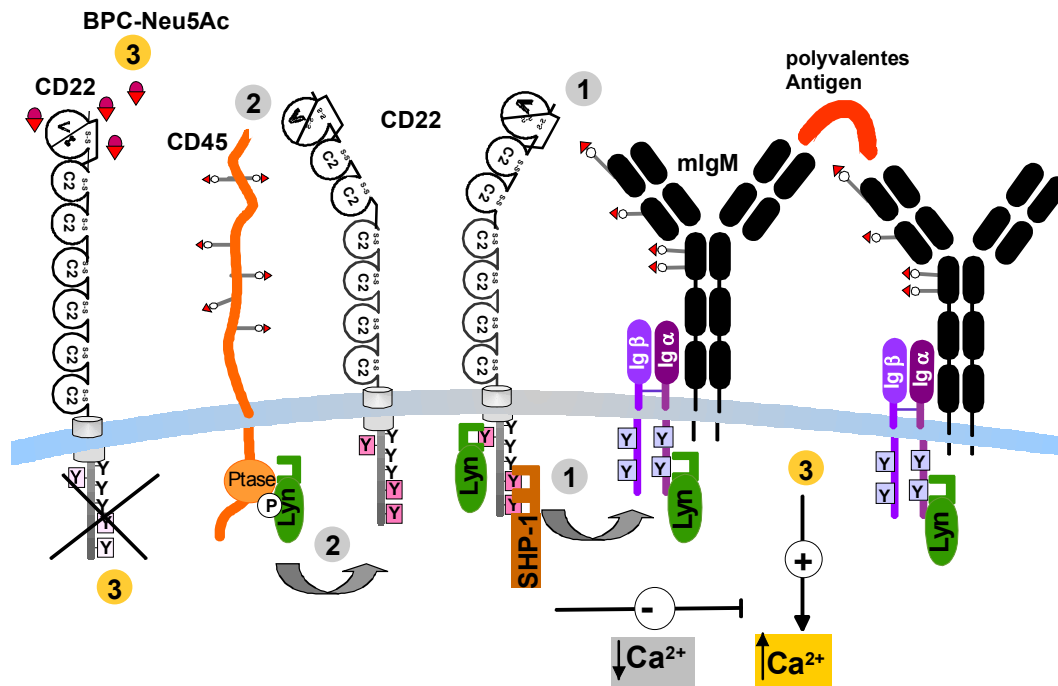
ein wichtiger negativer Regulator verschiedener Signalwege in hämatopoetischen Zellen. Infolge der BZR-Aktivierung und der damit verbundenen Aktivierung der Phospho-Tyrosinkinase werden die ITIMs des BZR-assoziierten CD22 durch die Src-Tyrosinkinase Lyn phosphoryliert und aktiviert (Doody et al., 1995; Smith et al., 1998). Daraufhin kann die Tyrosinphosphatase SHP-1 über ihre SH<sub>2</sub>-Domänen an die ITIMs des CD22 rekrutiert und in der Folge aktiviert werden (Doody et al., 1995). Außerdem erfolgt die Anbindung der Tyrosinkinase Syk, der Phospholipase C $\gamma$ 2 und weiterer intrazellulärer Proteine, deren Bedeutung teilweise noch unklar ist (Yohannan et al., 1999; Poe et al., 2000; Cyster et al., 1997; Nitschke et al., 1997).

Der dämpfende Einfluss von CD22 auf das BZR-Signal konnte durch Versuche mit CD22-defizienten Mäusen (CD22 „knock-out“-Mäuse) bestätigt werden. Milz-B-Zellen dieser CD22-„knock-out“-Mäuse zeigten ein erhöhtes und verlängertes Ca<sup>2+</sup>-Signal nach Stimulierung mit einem anti-IgM-Antikörper (Nitschke et al., 1997; Okeefe et al., 1996; Otipoby et al., 1996; Sato et al., 1996).

Ein Bindungspartner für die Sialinsäure-Bindungsstelle von CD22 (Siglec-2) konnten bisher nicht sicher identifiziert werden. Humanes und murines CD22 erkennen spezifisch  $\alpha$ 2,6-verknüpfte Sialinsäuren (Kelm et al., 1994a). Während murines CD22 nur eine schwache Bindung an Neu5Ac, aber eine starke Bindung an Neu5Gc (Kelm et al., 1994b) zeigt, bindet humanes CD22 gleich gut an Neu5Ac und Neu5Gc (Sjoberg et al., 1994; Kelm et al., 1998), obwohl Neu5Gc beim Menschen in gesunden Geweben nicht vorkommt. Zellen, die keine N-Glykane mit  $\alpha$ 2,6-verknüpften Sialinsäuren tragen und nach Transfektion CD22 exprimieren, sind in der Lage, Sialinsäure-abhängige Bindung an verschiedene Zellen zu vermitteln (Stamenkovic et al., 1991; Kelm et al., 1994b). Diese Bindung fehlt bei Coexpression mit der ST6GalII und kann durch eine Sialidase-Behandlung wiederhergestellt werden (Hanasaki et al., 1995b; Braesch-Andersen et al., 1994). Auf peripheren B-Zellen mit hoher Expression an  $\alpha$ 2,6-verknüpften Sialinsäuren auf der Zelloberfläche ist CD22 daher hauptsächlich an Bindungspartner auf derselben Zelle (in *cis*) gebunden (Floyd et al., 2000). Dennoch kann CD22 *in vivo* als „Homing Receptor“ für rezirkulierende B-Zellen in das Knochenmark dienen, vermutlich indem es im sinusoidalem Endothel an besonders hochaffine Liganden bindet (Nitschke et al., 1999). Außerdem konnte eine Bindung an  $\alpha$ 2,6-sialylierte Liganden nach Aktivierung humaner B-Zellen nachgewiesen werden (Razi et al., 1998). Diese Möglichkeit zur *trans*-Interaktion (mit Bindungspartnern auf anderen Zellen) lässt sich durch eine Reduktion der *cis*-Liganden aufgrund erhöhter Sialidase-Aktivität (Razi et al., 1998) oder verminderter  $\alpha$ 2,6-Sialylierung (Lo et al., 1996b) nach Aktivierung der B-Zellen erklären.

Die inhibitorische Aktivität von CD22 könnte über eine Expression an  $\alpha$ 2,6-verknüpften Sialinsäuren auf der B-Zelle reguliert werden. Mögliche Liganden auf der B-Zelle sind das häufig vorkommende, hoch-glykosylierte Protein CD45 und das mIgM. Beide konnten bereits mit CD22 copräzipitiert werden (SgROI et al., 1995; LePrince et al., 1993; Peaker et al., 1993).

Studien von Jin et al. 2002 und Kelm et al. 2002 weisen daraufhin, dass die Sialinsäure-abhängige Bindung an extrazelluläre Liganden der B-Zelle einen Einfluss auf die inhibitorische Funktion des cytoplasmatischen Teils von CD22 in der BZR-vermittelten Immunantwort hat (⇨ **Abbildung 1**).



**Abbildung 1** Graphische Darstellung der möglichen Inhibition der B-Zell-abhängigen Immunantwort aufgrund der Sialinsäure-abhängigen Ligandenbindung von CD22.

In bezug auf die diskutierten Liganden CD45 oder mIgM könnten folgende Modelle postuliert werden. ❶ Die Sialinsäure-abhängige Bindung von CD22 an IgM könnte zu einer intrazellulären Colokalisierung der beteiligten Signalmoleküle führen. ❷ Die Sialinsäure-vermittelte Bindung von CD22 an CD45 könnte dessen cytoplasmatische Tyrosinphosphatase-Funktion aktivieren. Es ist bekannt, dass CD45 Lyn dephosphoryliert. Das dadurch aktivierte Lyn kann die Tyrosine der ITIMs von CD22 phosphorylieren und aktivieren. Die Ligandenbindung könnte somit zu einer dichteren subzellulären Lokalisierung des gesamten Signalkomplexes führen. Dadurch könnte Lyn dem BZR angenähert und aktiviert werden. Lyn kann dann die ITIMs von CD22 phosphorylieren. Die Rekrutierung und Aktivierung von SHP-1 an die ITIMs führt zu einer Inhibition der BZR-vermittelten Signalkaskade, messbar durch eine Dämpfung des Ca<sup>2+</sup>-Signals. ❸ Die Zugabe von BPC-Neu5Ac führt zu einer Erhöhung der Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung, was für eine Inhibition der Sialinsäure-abhängigen CD22-Bindung und nachfolgend zu der fehlenden Rekrutierung von SHP-1 spricht.

In B-Zellen führte die Inhibition der Ligandenbindung durch das CD22-spezifische hochaffine Sialinsäurederivat BPC-Neu5Ac zu einer geringeren Tyrosinphosphorylierung des cytoplasmatischen Teils von CD22, einer verminderten Rekrutierung von SHP-1 und einer erhöhten Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung (Kelm et al., 2002). Dieselben Effekte wurden erzielt, indem CD22 mit einer mutierten Sialinsäure-Bindungsdomäne in einer B-Zelllinie exprimiert wurde (Jin et al., 2002). Dieses deutet auf eine fehlende Inhibition der intrazellulären Signalwege durch CD22 aufgrund fehlender extrazellulärer Ligandenbindung hin. Eine Inhibition dieser Ligandenbindung von CD22 könnte somit zu einer Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung führen.

Neuere Studien sprechen für die Interaktion von CD22 mit mIgM (Gerlach et al., 2003). Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass CD22 eng mit dem mIgM-Rezeptorkomplex assoziiert sein muss, um seine Funktion als negativer Regulator durch die Rekrutierung von SHP-1 ausführen zu können (Cyster et al., 1997; Justement, 2000).

Wie beschrieben, können akzessorische Moleküle wie CD22 Einfluss auf das BZR Signal nehmen. Für die Differenzierung einer B-Zelle zu Antikörper-produzierenden und sezernierenden Tochterzellen sind aber zusätzliche, aktivierende Stimulierungen von entsprechend aktivierten T-Zellen notwendig.

#### **1.2.4 Der Einfluss von T-Zellen auf die humorale Immunantwort der B-Zelle**

Die Art des Antigens bestimmt, ob die Einleitung der humoralen Immunantwort costimulatorische Signale von T-Zellen benötigt oder nicht.

Die T-Zell-unabhängige Immunantwort wird durch Antigene mit polyvalenten Zuckerstrukturen eingeleitet. Bei der Bindung proteinogener Antigene ist die Immunantwort T-Zell-abhängig. Die T-Zelle wird durch Antigenprodukte, die durch spezialisierte Zellen präsentiert werden, aktiviert (Lanzavecchia, 1985). Die Art des Antigens entscheidet, welcher Typ von T-Helferzelle mit welchem Repertoire an löslichen Mediatoren, den Cytokinen, entsteht. Die spezialisierten T-Helferzellen können nun mit spezialisierten B-Zellen, die zuvor durch dasselbe Antigen aktiviert wurden, reagieren. Dies wird auch „gekoppelte Erkennung“ genannt.

Die T-Helferzellen (Th1, Th2, Th3-Zellen) kontrollieren, modulieren und unterstützen die Zellteilung und Differenzierung der B-Zelle in den sekundären lymphatischen Organen, wie der Milz oder den Lymphknoten, zu Nachkommen, die dieselben Immunglobuline wie die Mutterzelle produzieren (Stavnezer, 1996). Einige Nachkommen werden zu Plasmazellen, die lösliche Antikörper sezernieren, andere zirkulieren im Körper als Gedächtniszellen und werden nach einem Zweitkontakt mit dem Antigen zu Plasmazellen mit einer gesteigerten Antikörperproduktion.

Außerdem kontrollieren und regulieren T-Zellen durch ihre Cytokine nicht nur die Aktivität anderer Immunzellen, sondern auch ihre eigene. Eine ausgewogene Balance der verschiedenen T-Helferzellen ist für eine angemessene humorale Immunantwort wichtig.

### **1.3 Der Gastrointestinaltrakt und seine Funktion in der Abwehr von Pathogenen und nicht-pathogenen Antigenen**

#### **1.3.1 Immunologische und nicht-immunologische Faktoren in der intestinalen Abwehr**

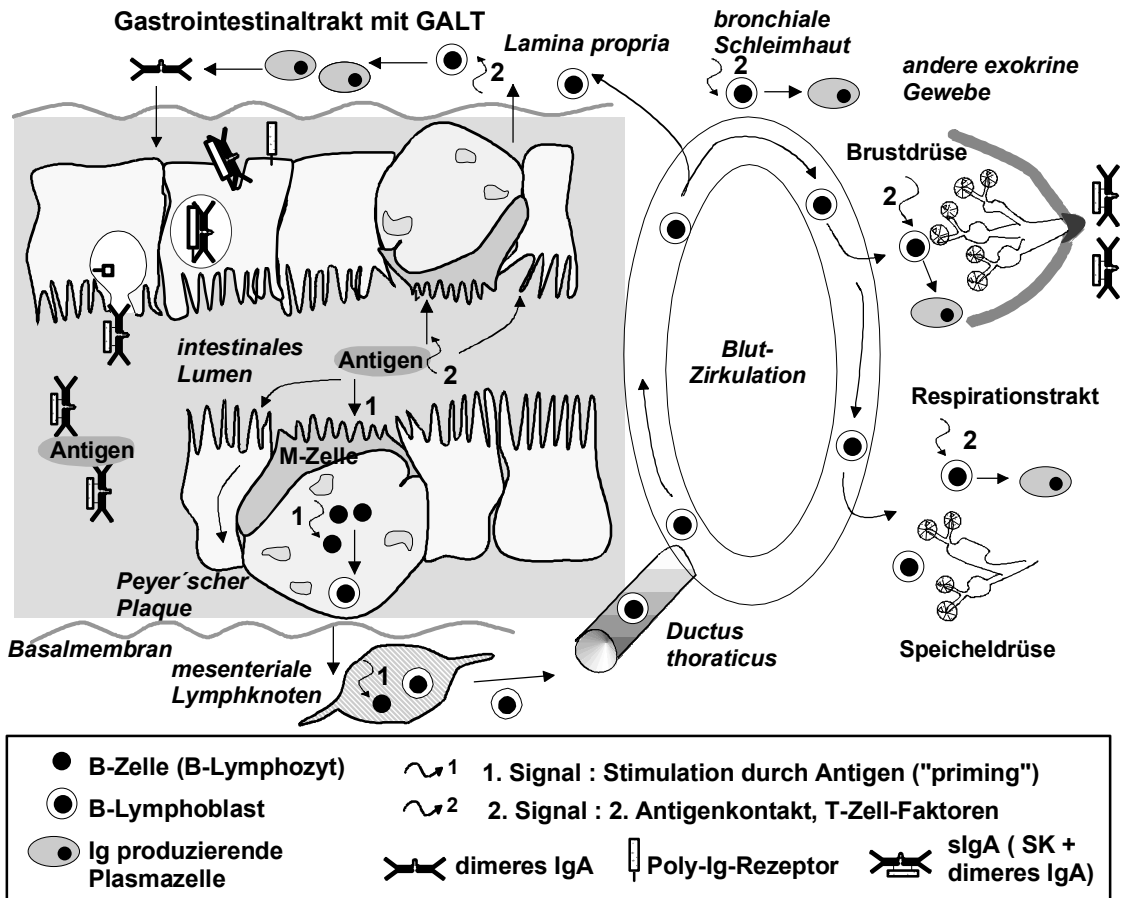
Der Gastrointestinaltrakt ist als Organ für die Verdauung und Absorption von Nährstoffen der Bereich der unmittelbar mit der Invasion von Pathogenen konfrontiert wird. Es ist daher verständlich, dass der Intestinaltrakt das größte immunologische Organ darstellt. Lokale immunologische und nicht-immunologische Prozesse stellen die effektive, sogenannte intestinale, mukosale Barriere da (Walker et al., 1974; Walker, 1978; Walker, 1986; Schreiber et al., 1988). Dabei unterscheidet sich die lokale intestinale Immunantwort teilweise von der systemischen Immunantwort.

Verschiedene nicht-immunologische Faktoren limitieren eine Invasion oral aufgenommener Pathogene, vorwiegend indem ihre Adhäsion und damit eine Penetration des Darmoberflächenepithels verringert wird. Dazu zählen die Motilität und Peristaltik des Magen-Darm-Trakts, die sauren oder alkalischen Bedingungen, die Verdauung potentieller Antigene durch die proteolytischen Enzyme des Pankreas und des Magens sowie durch intrazelluläre degradative Enzyme. Des weiteren bedarf es einer intakten körpereigenen Bakterienflora, eines Oberflächenepithels mit einem ausgereiften Bürstensaum und einer Glykokalyx sowie der Sekretion des mukösen intestinalen Schleims, der eine Vielzahl antimikrobieller Stoffe enthält (Schreiber et al., 1988).

Antigene, die in das Epithelgewebe des Intestinaltrakts eindringen, sind dem Darm-assoziierten lymphoiden Gewebe (GALT) ausgesetzt. Das GALT besteht aus verschiedenen immunkompetenten Zellen wie Makrophagen, Mastzellen, B-Zellen, T-Zellen und Plasmazellen im Schleimhautbindegewebe (*Lamina propria*), intraepithelial zwischen den intestinalen Epithelzellen (Enterozyten), sowie aus Aggregaten dieser lymphoiden Zellen, den sogenannten Peyer'schen Plaques (Schreiber et al., 1988; Bienenstock et al., 1987), die über M-Zellen (microfold-Zellen) an ihrer apikalen Seite Kontakt zum intestinalen Lumen haben (Brandtzaeg et al., 1987). Für die Auslösung einer spezifischen Immunreaktion müssen die Antigene mit den entsprechenden immunkompetenten Zellen in Kontakt kommen. Dazu müssen die Antigene über spezielle Bereiche des Schleimhautepithels aufgenommen werden. Neben den Enterozyten, die über „tight junctions“ dicht verbunden sind, dienen spezialisierte Epithelzellen, die M-Zellen, der Antigenaufnahme. Nur bestimmte Antigene, vor allem intakte Nahrungsproteine, wandern über die M-Zellen in das Epithel. Der dabei wirksame Selektionsmechanismus ist noch ungeklärt. Die bei der Geburt relativ hohe Permeabilität des intestinalen Epithels nimmt kontinuierlich ab. Neben der direkten Aufnahme ist auch die Anbindung an luminalen Moleküle möglich, die einen Transport durch das Epithel ohne intrazelluläre Hydrolyse erleichtern.



1.3.2 Die humorale Immunantwort des Intestinaltrakts durch IgA



**Abbildung 2** Schematische Darstellung des sIgA-B-Zellzyklus im sekretorischen Immunsystem.

Aufgenommene Antigene können im GALT von Antigen-präsentierenden Zellen den T-Zellen präsentiert werden. Außerdem können die Antigene an den B-Zell-Rezeptor binden, diesen kreuzvernetzen und die B-Zelle aktivieren (1). Die aktivierten B-Zellen wandern in die mesenterialen Lymphknoten, in denen die Proliferation und Differenzierung unter dem Einfluss der entsprechenden, spezialisierten T-Zellen stattfindet (1). Es entstehen die Vorläuferzellen der Plasmazellen, die Lympho- oder Plasmablasten. Diese erreichen über den *Ductus thoracicus* die systemische Blutzirkulation. Von dort wandern sie in die verschiedenen sekretorischen Gewebe sowie zurück in die *Lamina propria* des Darmepithels. Diese Wanderung benötigt 4-6 Tage. Erhalten sie dort das zweite Antigen-abhängige Signal, erfolgt die terminale Differenzierung zu Ig-produzierenden Plasmazellen (2). Alternativ können sie auch in den andere sezernierende Gewebe, wie der laktierende Brustdrüse (enteromammäre Achse), den Bronchen und Speicheldrüsen aber auch in der Milz, reifen (2). Das Haupt-Immunglobulin des Darms ist das sekretorische IgA. Dieses polymere Molekül besteht aus zwei IgA Molekülen, die über ein Peptid, die J-Kette, miteinander verbunden sind. Letzteres wird von Plasmazellen der Schleimhautbindegewebschicht (*Lamina propria*) synthetisiert (2). Das dimere IgA bindet an der basalen Seite der Enterozyten an den sogenannten Poly-Ig-Rezeptor, mit dessen Hilfe es in Transportvesikeln an die apikale Oberfläche gebracht wird. Dort wird der Rezeptor gespalten und das dimere IgA gelangt zusammen mit dem extrazellulären Teil des Rezeptors, der sekretorischen Komponente (SK), in das intestinale Lumen. Die sekretorische Komponente schützt das sIgA im intestinalen Lumen vor proteolytischen Angriffen. Im intestinalen Lumen oder im Schleim komplexiert sIgA Mikroorganismen, Toxine und Antigene (Neutralisierung). Es verhindert damit die Anheftung oder die Penetration in das Epithel, da diese Antigen-Immunglobulin-Komplexe über die Lymphe und das Blut in die Leber gelangen, wo sie abgebaut werden (Tomasi, 1989).

Die humorale Immunantwort des GALT mit dem sIgA-B-Zellzyklus (Bienenstock et al., 1987) wurde in **Abbildung 2** graphisch dargestellt und beschrieben. Diese Mechanismen der B-Zell-Wanderung sind noch nicht völlig verstanden. Die Antigenbindung durch IgA, dem Hauptimmunglobulin des Darms, unterdrückt die Synthese anderer Ig-Plasmazellen. Eine Antigenbindung an IgG/IgM und damit die Aktivierung der systemischen Immunantwort oder die Bindung an IgE und eine mögliche allergische Reaktion kann damit verhindert werden (Laissue et al., 1992). IgA-Mangel wurde daher mit allergischen Erkrankungen in Zusammenhang gebracht, bei denen z.B. zirkulierende Immunkomplexe und präzipitierende Antikörper gegen bovine Milchproteine nachgewiesen wurden (Schreiber et al., 1988).

### **1.3.3 Intraepitheliales IgE und IgE-vermittelte Überempfindlichkeitsreaktionen**

Neben IgA spielt ein weiteres Immunglobulin, das IgE eine wichtige Rolle in der intestinalen Abwehr. IgE ist wichtig für die Eliminierung von Darmparasiten, deren Aufnahme in das Darmepithel durch IgA nicht verhindert werden konnte. IgE-Antikörper werden bevorzugt über Fc-Rezeptoren an intraepitheliale Mastzellen gebunden und kommen daher vor allem auf Schleimhautoberflächen vor. Eine Antigenbindung an IgE bewirkt eine Aktivierung der Mastzellen, worauf diese starke chemische Mediatoren freisetzen. Diese Mediatoren induzieren Entzündungsreaktionen und Phagozytose, die der lokalen Eliminierung des infektiösen Agens dienen sollen (Sutton et al., 1993). Da 30 % der Weltbevölkerung an parasitären Wurminfektionen leiden, herrscht hinsichtlich der Wirksamkeit des IgE ein hoher Evolutionsdruck. In den Industrienationen überwiegt heute allerdings der negative Einfluss des IgE bei der Auslösung allergischer Reaktionen, die ein verbreitetes Problem darstellen. 40% der Bevölkerung in den Industrienationen neigt dazu, auf Umweltantigene mit übertriebenen IgE-Antworten zu reagieren. Diese Veranlagung nennt man Atopie. Die Bindung bestimmter Antigene an bestimmte T-Helferzellen (Th2-Zellen) kann dazu führen, dass diese selektiv durch ein von ihnen freigesetzte Cytokin (Interleukin-4) in B-Zellen einen Isotypwechsel zu IgE hervorrufen. Diese Antigene nennt man Allergene.

### **1.3.4 Der Einfluss der T-Zellen bei der Regulation der Abwehr im Intestinaltrakt**

Die Mehrzahl der T-Zellen in der *Lamina propria* sind regulatorische T-Helferzellen (Tr-/Th3-Zellen). Das von ihnen freigesetzte Cytokin, TGF- $\beta$ , soll einen Isotypwechsel direkt zu IgA fördern und eine selektive Differenzierung von IgA-B-Zellen zu IgA-Plasmazellen beschleunigen (Schreiber et al., 1988). Außerdem blockieren diese Zellen die Aktivierung nicht-eliminierter, selbstreaktiver T-Zellen, die zu Autoimmunerkrankungen führen können (Weiner, 2001; Faria et al., 1998). In diesem Zusammenhang ist es bedeutsam, dass hohe Mengen oral aufgenommener und präsentierter Antigene in der Schleimhaut zum Untergang der aktivierten T-Zellen führen. Dagegen induzieren geringe Antigen-Dosen das Vorkommen der Th3-Zellen (Zheng et al., 2004).

Andere T-Zellen sind anscheinend bei der Unterdrückung der systemischen IgG- und IgM-

abhängigen Immunantwort auf Nahrungsantigene beteiligt (Dobbins, III, 1986). Ihre Zahl steigt bei Kuhmilch-Überempfindlichkeitsreaktionen und ist reduziert bei Tieren, die unter keimfreien Bedingungen gehalten werden (Schreiber et al., 1988).

#### **1.4 Die Abwehr von Pathogenen und nicht-pathogenen Antigenen beim Neugeborenen**

Nach der Geburt wird das Neugeborene einem vielfältigen Antigen- und Pathogenangebot ausgesetzt. Dabei handelt es sich vorrangig um oral aufgenommene Antigene und Pathogene. Die Erstabwehr von Antigenen und Pathogenen im Intestinaltrakt spielt daher eine wesentliche Rolle (Strobel et al., 1998). Beim Neugeborenen ist jedoch die Kapazität sowohl der nicht-immunologischen, als auch der unspezifischen und spezifischen immunologischen Faktoren noch schwach entwickelt.

##### **1.4.1 Schwachpunkte der nicht-immunologischen Faktoren beim Neugeborenen**

Beim Neugeborenen sind die Sekretion von Magensäuren sowie die Pepsin-Aktivität des Magens gering. Sie wird zusätzlich verringert, da während einer Milchmahlzeit der pH im Magen vom optimalen pH 1,5-2,5 auf pH 5-6 steigt. Die Bedeutung des Pepsin-Verdau im Säugling wird daher als gering angesehen. Auch die katalytische Aktivität der pankreatischen Proteasen Trypsin und Chymotrypsin ist zunächst erniedrigt (Lindberg et al., 1989). Die Kohlenhydratzusammensetzung der Schleimschicht und in der Bürstensaummembran des Schleimhautepithels ist beim Neugeborenen verändert. Dies führt wahrscheinlich zu einer unzureichenden Kompetenz bei der Inhibition der Anheftung von Bakterien (Walker, 1987).

Außerdem ist die Membranfluidität der Bürstensaumzellen erhöht. Dies wird als Grund für die erhöhte Membranpermeabilität und die Aufnahme von intakten Makromolekülen diskutiert (Walker, 1987; Schreiber et al., 1988). Intaktes bovines Serumalbumin konnte im Serum Kuhmilch-gefütterter Säuglinge nachgewiesen werden (Robertson et al., 1982). Der Transport von intakten Makromolekülen durch die Enterozyten, die Zell-Zell-Verbindung zwischen ihnen und durch die M-Zellen ist beim Neugeborenen stark erhöht und nimmt erst während der zunehmenden Entwicklung des Schleimhautgewebes ab. Die diesem Phänomen zugrunde liegenden Mechanismen, das auch „Closure“ (engl. Abschließen) genannt wird, sind bisher nicht vollständig aufgeklärt.

Unter physiologischen Aspekten ist die Aufnahme von Makromolekülen in den ersten Wochen nach der Geburt äußerst wichtig, da die mütterlichen Immunglobuline und andere immunstimulierende Mediatoren auf diesem Weg die systemische Zirkulation erreichen oder die lokale Immunantwort mitprägen können. Andererseits ist es wichtig, bei zunehmender Immunkompetenz des Neugeborenen, Fremdatigene auszuschließen. Diese könnten über die Stimulierung der systemischen Immunantwort zu einer Überempfindlichkeitsreaktion führen. Verschiedene Faktoren aus der Muttermilch sind in der Lage diesen Prozess des „Closure“ zu beschleunigen (Laissue et al., 1992).

### 1.4.2 Probleme bei der humoralen Immunantwort des Neugeborenen

Neben den nicht-immunologischen Faktoren ist auch die Leistung phagozytischer Zellen verringert, sowie die humorale Immunantwort des Neugeborenen unterentwickelt.

Beim Neugeborenen überwiegen zunächst T-Zell-unabhängige B-Zellen, die vor allem Antikörper gegen polyvalente Zuckerstrukturen, wie man sie auf Oberflächenproteinen der Bakterienzellmembran findet, produzieren. Es handelt sich hauptsächlich um schnelle Immunantworten (Oliver et al., 1999), bei denen keine Gedächtniszellen ausgebildet werden. Die involvierten B-Zellen sind beim Erwachsenen in der Minderzahl, spielen aber eine wichtige Rolle in der primären Immunantwort des Neugeborenen (Holt et al., 2000). Diese Immunantwort stellt eine Überbrückung zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort da.

Bei der Geburt dominieren T-Zellen, die Defizite in der Expression von Proteinen vor allem der Cytokine zeigen, die aber für die Bindung an B-Zellen und den Klassenwechsel der Immunglobuline notwendig sind (Brugnoni et al., 1994; Durandy et al., 1990; van der Velden et al., 2001). Das Neugeborene produziert daher nach Antigenstimulierung hauptsächlich IgM. Ein Wechsel zu anderen Immunglobulinklassen findet in den ersten Wochen nach der Geburt nicht statt. Erst nach dem ersten Lebensmonat nehmen bei der systemischen Immunantwort die dominierenden IgM-produzierenden Zellen zugunsten von IgG-exprimierenden Zellen ab.

Die bisher fehlende Konfrontation mit oral präsentierten Antigenen führt auch zu einer schwachen lokalen Immunantwort des Darm-assoziierten Immunsystems, erkennbar an mangelnden oder fehlenden Plasmazellen, Gedächtniszellen sowie aktiven T-Zellen (Strobel et al., 1998; Strobel, 2002). Die Besiedelung des Darms mit Bakterien während der ersten Tage nach der Geburt fördert eine Rekrutierung und damit Aktivierung von T-Zellen, deren freigesetzte Mediatoren wiederum die Voraussetzung für eine optimale Proliferation von B-Zellen und ihren Klassenwechsel zu IgA produzierenden Zellen sind (Brinkmann et al., 1992). Protektiv wirksame Mengen IgA-produzierender Plasmazellen in der *Lamina propria* sind daher erst nach den ersten Lebenswochen nachweisbar (Savilahti, 1972).

Beim Neugeborenen kann es durch die überwiegenden Th2-Zellen, aufgrund der fehlenden Regulation durch andere T-Zellen (Adkins, 1999), zu einer erhöhten Produktion an IgE kommen. Die ersten 6 Lebensmonate scheinen bei der Entwicklung einer Atopie, einer Überproduktion von IgE infolge der Exposition mit Umweltantigenen, kritisch zu sein.

Um so bedeutsamer ist die mütterliche Leihimmunität, die in den letzten Wochen der Schwangerschaft stattfindet. Dabei werden plazentagängige IgGs von der Mutter auf den Fötus übertragen und gleichen einen wesentlichen Teil der Defizite des Neugeborenen aus. Die Konzentrationen von IgGs im Serum des Neugeborenen können dabei die der mütterlichen Serumkonzentration erreichen.

## 1.5 Muttermilch und ihre Auswirkungen auf den Säugling

Studien an Versuchstieren haben gezeigt, dass für die Entwicklung der oralen Toleranz eine adäquate, lokale Immunabwehr durch sIgA und die Unterdrückung der systemischen Immunantwort wichtig sind (Strobel et al., 1998). Das unreife Immunsystem des Neugeborenen muss diese Kompetenzen jedoch erst entwickeln. Durch die Inhaltsstoffe der Muttermilch wird das Immunsystem des Neugeborenen ausbalanciert und zur weiteren Reifung stimuliert (Slade et al., 1987).

Die Muttermilch enthält alle Nährstoffe und Wachstumsfaktoren, die für eine optimale körperliche und geistige Entwicklung des Kindes notwendig sind. Zusätzlich enthält sie anti-infektiöse, immunstimulierende aber auch immunsuppressive Inhaltsstoffe (Goldman et al., 1982). Diese sollen nicht nur vor Infektionen schützen, sondern die Ausbildung von Überempfindlichkeiten vermeiden (Cunningham, 1979).

Die Muttermilch entsteht in dem laktierenden Brustdrüsengewebe, deren Produktionseinheiten aus Alveolen mit laktierenden Zellen besteht. In den laktierenden Zellen werden Milchproteine wie die Caseine,  $\alpha$ -Laktalbumin, Laktoferrin, verschiedene Enzyme aber auch Laktose und Lipide produziert (Patton, 1978). Sie werden mit Wasser, Vitaminen und Mineralien als Milch in das benachbarte Lumen sezerniert, von wo sie über ein Gängesystem an die Hautaußenfläche geleitet wird. Einige Milchkomponenten werden nicht von der Milchdrüse synthetisiert, sondern treten vom Blut in die Milch über. Dazu zählen Immunglobuline, Serumalbumin, Hormone, Cytokine und zelluläre Bestandteile (Schlimme et al., 1995).

### 1.5.1 Funktionelle Oligosaccharide der Muttermilch

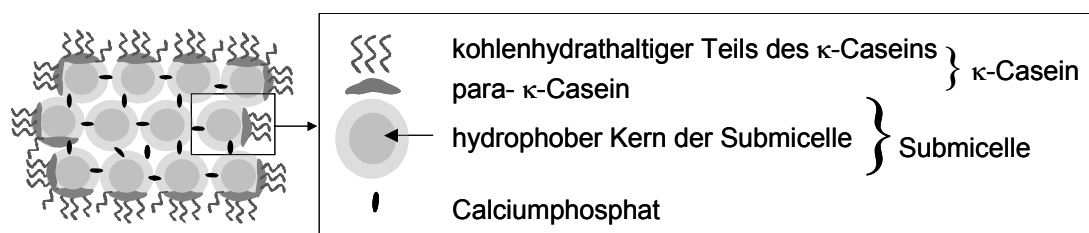
Ein Kennzeichen der Muttermilch ist das Vorkommen heterogener und komplexer Sialinsäure-haltiger Oligosaccharide (Newburg et al., 1995; Rudloff et al., 1997). Der Gehalt an Sialinsäuren in der humanen Milch ist 40-fach höher als in Kuhmilch (Speer et al., 1993). In humaner Milch kommen vor allem  $\alpha$ 2,6-Sialyllaktose aber auch die  $\alpha$ 2,3-Sialyllaktose in terminalen Positionen höherer Oligosaccharide vor (Egge, 1993). Diese Glykane sind vielfach mit Proteinen oder Lipiden konjugiert.

Die Menge komplexer sialylierter Oligosaccharide ist im frühen Stadium der Laktation hoch (Egge, 1993) und nimmt in späteren Stadien ab (Carlson, 1985). Diese Milch oligosaccharide konnten sowohl im Stuhl als auch im Urin gestillter Kinder nachgewiesen werden. Sie können daher in freier oder in proteingebundener Form nicht nur mit den Zellen des intestinalen Lumens, sondern auch mit denen anderer lymphatischer Gewebe interagieren (Egge, 1993). In diesem Zusammenhang wurde festgestellt, dass Intestinaltraktserkrankungen (Portelli et al., 1998) und Urogenitaltraktserkrankungen bei gestillten Kindern seltener vorkommen als bei nichtgestillten Kindern (Coppa et al., 1993). Eine Erklärung dafür sind vermutlich die antiadhäsiven Eigenschaften dieser Oligosaccharide gegenüber pathogenen Bakterien und

Viren (Newburg et al., 1995). Muttermilch enthält unter anderem den Bifidusfaktor, einen Aminozucker. Er dient als Wachstumsfaktor für das Bifidobakterium *Lactobacillus bifidus*, welches ein Charakteristikum der mikrobiellen Flora des Intestinaltrakts gestillter Kinder darstellt (Lonnerdal et al., 1995) und im Intestinaltrakt des Säuglings das Wachstum potentiell pathogener Mikroorganismen verhindert (Montreuil, 1993). Die Darmflora von Säuglingen, die mit Säuglingsnahrung gefüttert werden, enthalten zu einem größeren Teil potentiell pathogene Bakterien (Yoshioka et al., 1983).

### 1.5.2 Die Proteinfractionen der Muttermilch

Die Gesamtproteinfraction wird in zwei Hauptgruppen unterteilt. Die Caseine, die aus der Milch bei pH 4,6 präzipitiert werden können, und die Molkenproteine, die im Milchserum verbleiben. Während in der humanen Milch die Molkenproteine geringfügig überwiegen, stellen in der bovinen Milch die Caseine mit 80 % die Hauptproteinfraction da (Kunz et al., 1990a). Die Caseine sind eine inhomogene Gruppe, die in die verschiedenen Caseinfractionen ( $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\kappa$ -Casein) eingeteilt wird. Caseine sind hydrophobe Proteine, die mehr oder minder phosphoryliert und glykosyliert sind. In den Golgivakuolen der Milchdrüsenzelle werden die Micellen aus einer Vielzahl an Untereinheiten (Submicellen) zusammen mit Calcium und Phosphat gebildet. Die Verteilung der einzelnen Caseine innerhalb einer Submicelle ist nicht gleichmäßig. Das kappa-( $\kappa$ -)Casein ist vorrangig an der Micellenoberfläche lokalisiert (Donnelly et al., 1984; Schlimme et al., 1995). Die relativ kleinen Caseinmicellen der Humanmilch enthalten aufgrund ihrer größeren spezifischen Oberfläche relativ mehr  $\kappa$ -Casein als die Caseinmicellen der Kuhmilch (Donnelly et al., 1984; Schlimme et al., 1995).



**Abbildung 3** Graphische Darstellung des Modells für den Aufbau der Caseinmicellen.  
(nach Schlimme et al., 1995)

Die Molkenproteine sind globuläre Proteine, die in eine Globulinfraction und eine Albuminfraction unterteilt werden. Zur ersteren zählen die Immunglobuline, Laktoferrin sowie Peptidhormone und Enzyme. Zur letzteren zählen Serumalbumin,  $\alpha$ -Laktalbumin und  $\beta$ -Laktoglobulin (Schlimme et al., 1995).  $\beta$ -Laktoglobulin kommt in humaner Milch nicht vor. Bovines  $\beta$ -Laktoglobulin kann durch die Mutter aufgenommen und in die Muttermilch abgegeben werden (Machtinger et al., 1986).

### 1.5.3 Protektive und antiadhäsive Proteine

Die gastrischen Funktionen des Neugeborenen sind funktionell noch unterentwickelt. Die Muttermilch enthält zudem hohe Konzentrationen an Proteaseinhibitoren, die Trypsin und Chymotrypsin hemmen (Lindberg et al., 1982). Sie unterstützen zusammen mit der natürlichen Säure- und Proteaseresistenz vieler protektiver Muttermilchkomponenten, deren unbeschadete Passage durch den Magen-Darm-Trakt.

Verschiedene mütterliche gastrointestinale Hormone können bei gestillten Kindern intestinale Funktionen wie Peristaltik, Magensäuresekretion und gesteigerte Aktivität der intestinalen Enzyme verbessern (Berseth et al., 1990). Wachstumsfaktoren in der Muttermilch haben einen positiven Effekt auf die Entwicklung des intestinalen Epithels und auch auf die Expression der Enzyme der Bürstensaummembran des Darmepithels. Die Verfügbarkeit der aufgenommenen Nahrung wird verbessert und die Penetration des Schleimhautepithels wird verringert („Closure“) (Bernt et al., 1999). Sialylierte Glyko-Makromoleküle, die Mucine, können als lösliche Rezeptoren für pathogene Mikroorganismen dienen und damit deren Adhäsion an Glykanstrukturen von Epithelien kompetitiv hemmen (Schroten et al., 1992; Hanisch, 1993). Auch Laktoferrin, Lysozym, Fibronektin und glykosylierte Immunglobuline (sIgA) gehören zu den Proteinen, die Ausbreitung, Adhäsion und Besiedelung von pathogenen Mikroorganismen im Intestinaltrakt des Kindes verhindern können (Goldman et al., 1995; Wold et al., 1990).

### 1.5.4 Immunkompetente Proteine und Peptide der Muttermilch

Alle Immunglobulinklassen wurden in der Muttermilch nachgewiesen (Xanthou et al., 1995). Das vorherrschende Immunglobulin ist mit 90% das sekretorische Immunglobulin A (Goldman et al., 1982). Diese IgA-Antikörper reagieren auf Antigene, die dem Darm-assoziierten lymphatischen Gewebe der Mutter präsentiert wurden. Die dort aktivierten B-Zellen wandern über die enteromammäre Achse (☞ 1.3.2, Abbildung 2) in die Brustdrüse (Slade et al., 1987). An den glandulären Epithelzellen binden die sezernierten Antikörper an den Poly-Ig-Rezeptor und gelangen mit der sekretorischen Komponente in die Milch. Diese sIgA versorgen den Säugling innerhalb kürzester Zeit mit spezifischen, der „Mikroumwelt“ der Mutter und damit des Säuglings angepassten Antikörpern (Ogra et al., 1983). Bis zu 75% der mütterlichen sIgA können im Stuhl der gestillten Kinder in ihrer aktiven Form nachgewiesen werden (Ogra et al., 1983). Intestinale IgA-Antikörper können die Resorption von intakten Proteinen, möglicherweise durch die Bildung von Immunkomplexen, die phagozytiert werden können, verhindern (Walker, 1979). Ein sIgA-Mangel wurde mit einer Prädisposition für Nahrungsmittelallergien in Zusammenhang gebracht (Jarvinen et al., 2000).

Weiterhin enthält die Muttermilch auch Cytokine, die die immunkompetenten Zellen des Neugeborenen beeinflussen können. Diese Cytokine sollen immunsuppressive Eigenschaften besitzen, die die Produktion inflammatorischer Cytokine inhibieren (Tilg et al., 1997) und die IgA-Produktion stimulieren, wahrscheinlich durch die Begünstigung TGF- $\beta$  produzierender,

regulatorischer Th3-Zellen. Die Th3-Zellen könnten eine Verschiebung von Th2-Zellen zu Th1-Zellen und damit zu einem Isotypwechsel von IgE zu IgA bewirken. Eine Rolle bei der Prävention von Überempfindlichkeitsreaktionen und Allergien ist daher denkbar (Bernt et al., 1999).

$\alpha_S$ - und  $\beta$ -Caseine aus Kuh- und Humanmilch sollen immunstimulierend wirken (Fiat et al., 1993; Migliore-Samour et al., 1989). Für Fragmente und Peptide von Caseinen werden bioaktive Fähigkeiten wie opioide, antithrombotische, antihypersive und immunstimulierende Eigenschaften nachgewiesen (Brantl et al., 1981; Meisel, 1986). Eine Sialinsäure-abhängige, immunstimulierende Wirkung wurde auch für das Glykomakropeptid des  $\kappa$ -Caseins beschrieben (Li et al., 2004). Für pepsinisiertes Laktoferrin und Laktalbumin wurde eine stimulierende Wirkung auf B-Zellen und deren IgA-Expression nachgewiesen (Miyachi et al., 1997).

### **1.5.5 Zelluläre, immunstimulierende Komponenten in der Muttermilch**

Muttermilch enthält nicht nur lösliche, sondern auch zelluläre Komponenten, die eine Magen-Darm-Passage vermutlich unbeschadet überstehen und immunregulatorische Funktionen im gesamten Gastrointestinaltrakt ausüben können (Speer et al., 1985). Die T-Zellen der Muttermilch sind in der Lage B-Zellen zu aktivieren (Bertotto et al., 1990; Wirt et al., 1992). Die mütterlichen T-Zellen können einen Isotypwechsel induzieren, so dass die B-Zellen des Säuglings neben IgM auch andere Immunglobuline (z.B. IgA in colostralen Lymphozyten) produzieren können (Slade et al., 1987).

## **1.6 Muttermilchersatznahrung und ihre Auswirkungen auf den Säugling**

Aufgrund der nutritiven und der immunprotektiven Inhaltsstoffe ist Muttermilch zumindest während des ersten Lebenshalbjahres die ideale Ernährung für den Säugling (Speer et al., 1993). Für Säuglinge, deren Mütter aus verschiedenen Gründen nicht Stillen können, gibt es eine Vielzahl an Ersatzfertignahrungen, die hauptsächlich auf Kuhmilch basieren.

### **1.6.1 Muttermilchersatznahrungen und Kuhmilchallergie**

Die Zusammensetzung von Milch ist artentypisch und daher unterschiedlich. Dieses artspezifische Vorkommen von Proteinen führt zu einem ernstzunehmenden Problem bei der Säuglingsernährung. Bei 2-5% aller Säuglinge manifestiert sich in den ersten Lebensmonaten eine Kuhmilchallergie (CMA, cow's milk allergy) (Savilahti et al., 1992; Moneret-Vautrin, 1999). Eine Allergie ist im engeren Sinne „eine Krankheit, die durch eine Immunreaktion gegenüber einem ansonsten harmlosen Antigen ausgelöst wird“. Die Symptome von CMA beim Säugling treten innerhalb weniger Tage bis Wochen nach dem Einsetzen von Kuhmilch-basierender Ersatznahrung auf. Bei Kuhmilch-trinkenden Müttern können Kuhmilchantigene durch Transfer in die Muttermilch gelangen und auch beim gestillten Säugling eine Allergie auslösen (Machtlinger et al., 1986; Sorva et al., 1994; Isolauri et al., 1999).



Die Pathogenese der CMA ist noch nicht eindeutig geklärt, prinzipiell jedoch sind alle Proteinfractionen der Kuhmilch potentiell antigen und allergen (Lo et al., 1996a). Durch die orale Gabe des Nahrungsantigens kommt es zu einer Stimulierung des Immunsystems und zur Induktion einer humoralen und zellulären Immunantwort. Dabei handelt es sich sowohl um Th2-Zell-abhängige, IgE-vermittelte, als auch IgE-unabhängige Mechanismen (Isolauri et al., 1996).

Von dem bovinen Hauptmolkeprotein,  $\beta$ -Laktoglobulin, ist bekannt, dass es die Plazenta passiert (Szepfalusi et al., 2000) und in der Lage ist eine Antikörperproduktion bei Müttern und Neugeborenen zu veranlassen. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass neben  $\beta$ -Laktoglobulin auch die Caseinfraktion, vor allem  $\beta$ -Casein, ein allergenes Potential besitzt (Savilahti et al., 1992; Restani et al., 1995). IgE gegen humanes  $\beta$ -Casein konnte im Serum von CMA-Patienten nachgewiesen werden (Bernard et al., 2000). Dabei scheint es sich aber um spezifische IgE geringer Affinität und damit unbedeutender klinischer Relevanz zu handeln (Wal, 2002).

Neben einer Immunglobulin-vermittelten Reaktion auf Kuhmilchallergene besteht die Möglichkeit, dass diese Immunglobuline auch auf Antigene anderer Spezies reagieren. Diese Kreuzreaktivität tritt auf, wenn unterschiedliche Proteine z.B. innerhalb ihrer Aminosäuresequenz oder aufgrund ihrer dreidimensionalen Struktur so starke Ähnlichkeiten aufweisen, dass ein Spezies-typischer Antikörper diese als Epitope für Interaktion erkennt (Spitzauer, 1999; Restani et al., 2002). Elektrophoretisch aufgetrennte Milchproteine zeigen Spezies-typische Bandenmuster. Die Proteinbanden von Büffelmilch und Schafsmilch aber auch Kamelmilch ähneln denen aus Kuhmilch. Die Kamelmilchproteine unterscheiden sich durch das Fehlen (oder Spuren) von  $\beta$ -Laktoglobulin. In der humanen Milch fehlt  $\beta$ -Laktoglobulin, dafür ist Laktoferrin deutlich nachweisbar. Mit einem Antikörper gegen bovines  $\beta$ -Laktoglobulin konnte  $\beta$ -Laktoglobulin in der Milch von Ziege, Schaf und Büffel nachgewiesen werden, während nur eine schwache Kreuzreaktivität in der Milch von Esel und Stute auftrat. Ähnliche Nachweise konnte mit monoklonalen anti-Casein-Antikörpern und dem Serum von Kindern mit einer CMA-Symptomatik erbracht werden (Restani et al., 1999). Humanes  $\alpha$ -Laktalbumin und  $\beta$ -Casein kreuzreagierten mit den Antikörpern gegen bovines  $\alpha$ -Laktalbumin und  $\beta$ -Casein.

### **1.6.2 Hypoallergene Säuglingsnahrung**

Um die CMA-Problematik zu lindern, bietet die Industrie eine große Anzahl derivatisierter, hypoallergener Ersatzfertignahrungen an. Es handelt sich dabei meist um Produkte mit partiell hydrolysierten Caseinen oder Molkenproteinen, Fertignahrungen auf Aminosäurebasis sowie auf Basis von Sojaproteinderivaten (Niggemann et al., 1999). Es wurde jedoch festgestellt, dass auch Peptide mit einem Molekulargewicht unter 1200 Da allergen sein können, da sie noch in der Lage sind, eine Produktion von Antikörpern sowie eine T-Zell-Aktivierung zu induzieren (Vaarala et al., 1995). Für diese Restallergenität werden bei hydrolysierten

Kuhmilchproteinen Reste an bovinem  $\beta$ -Laktoglobulin und bei aminosäurebasierenden Nahrungen Aminosäure/Protein-„Kontaminationen“ in Fett- und Kohlenhydratbestandteilen der Milch verantwortlich gemacht (Niggemann et al., 1999). Bei letzteren besteht zudem die Gefahr einer Schädigung der Enterozyten durch die hohe Osmolarität der Nahrung (Moro et al., 2002).

### **1.6.3 „Functional Foods“ als Vorbeugung von Nahrungsmittelüberempfindlichkeiten**

Muttermilch ist aufgrund ihrer Zusammensetzung in der Lage, Schädigungen der Schleimhaut infolge einer Überempfindlichkeitsreaktion oder einer IgE-vermittelten Entzündungsreaktion auf Kuhmilchallergene vorzubeugen. Damit kann die Kuhmilchallergie auch als „Muttermilch-Defizienz-Krankheit“ angesehen werden (Harms et al., 1990). Neben dem allergenem Potential von Proteinen aus Kuhmilch aber auch aus anderen Milchen ist der Mangel an immunprotektiven Proteinen und anderen Komponenten in diesen Milchen entscheidend. Die Muttermilch kann neben den nutritiven Bedürfnissen auch die Entwicklung der intestinalen und immunologischen Prozesse derart beeinflussen und modulieren, dass eine Überreaktion auf die eigenen Komponenten gar nicht erst auftritt.

In sogenannten „Functional Foods“ (Arai, 2000) wird eine Möglichkeit gesehen, Allergien vorzubeugen oder sie zu therapieren. Dazu zählen die sogenannten Prä- und Probiotika (Van den Driessche M. et al., 2002) .

Präbiotika sind Substanzen, die in der Lage sind, gezielt das Wachstum und die Aktivität protektiver, im Darm bereits vorhandener Mikroorganismen zu fördern. Beim Neugeborenen zählt dazu das Bifidobakterium. Diese Präbiotika werden vom Wirt nicht verdaut, sondern von dessen Mikroorganismen fermentiert. Der Bifidofaktor in der Muttermilch ist ein solches Präbiotikum. Probiotika sind spezielle Stämme fördernder und protektiver Mikroorganismen, die oral aufgenommen werden. Die Besiedelung des Intestinaltrakts durch diese Mikroorganismen kann aktiv stimulierend auf T-Zellen wirken (Roberfroid, 2000). Eine daraus folgende Verschiebung zu Th1-Zellen und eine Induzierung der IgA-Produktion werden postuliert (Moro et al., 2002; Laiho et al., 2002). Diese Mechanismen werden auch für Cytokine aus der Muttermilch diskutiert (↪ 1.5.4)

Auch bestimmte Glykokonjugate können immunprotektive Wirkungen entfalten, indem sie die Adhäsion von Bakterien und Viren hemmen, aber auch die Bindung an bestimmte Rezeptoren vermitteln. Dabei stellen Sialinsäuren eine bedeutsame terminale Komponente von Glykokonjugaten dar.

## 1.7 Sialinsäuren und Siglecs

### 1.7.1 Sialinsäuren und ihre Funktionen

Die Sialinsäuren sind Derivate der Neuraminsäure (Neu), einem C9-Zucker mit einer Carboxylatgruppe an C1. Die Aminogruppe am C-5 kann durch eine Acetylgruppe (*N*-Acetylneuraminsäure, Neu5Ac) oder eine Glykolylgruppe (*N*-Glykolylneuraminsäure, Neu5Gc) ersetzt sein. Neu5Ac ist die verbreitetste Form (Schauer et al., 1997). Aufgrund ihrer häufig terminalen Position, ihrer negativen Ladung sowie ihrer Hydrophilie tragen Sialinsäuren zu verschiedenen Interaktionen von Glykanen mit ihrer Umwelt, sowohl auf Zelloberflächen als auch in Lösung bei. Sie können durch sterische Behinderung und/oder elektrostatische Abstoßung Rezeptoren, Antigene und Liganden maskieren und vor dem Angriff von Proteasen oder Pathogenen schützen. Weiterhin sind Sialinsäuren als Rezeptordeterminanten an der Bindung von Zellen, Hormonen, Toxinen, Antikörpern und Lektinen beteiligt (Kelm et al., 1997; Schauer, 1985).

### 1.7.2 Siglecs (Sialinsäure-bindende Immunglobulin-ähnliche Lektine)

Lektine sind kohlenhydratbindende Proteine tierischen, pflanzlichen und mikrobiellen Ursprungs (Varki, 1997). Die Siglecs, Sialinsäure-bindende Immunglobulin-ähnliche Lektine (Crocker et al., 1998), sind die ersten molekular charakterisierten Proteine aus Säugetierzellen, die als Adhäsionsmoleküle spezifisch Sialinsäure-abhängige zelluläre Interaktionen vermitteln, indem sie spezifisch mehrere funktionelle Gruppen der Sialinsäure erkennen (Kelm et al., 1996). Alle Siglecs bestehen aus mehreren extrazellulären Ig-ähnlichen Domänen, gefolgt von einer Transmembrandomäne und dem intrazellulären C-Terminus. Letzterer enthält bei den meisten Siglecs sogenannte ITIM-Sequenzen (immunoreceptor tyrosine based inhibitory motif) (Crocker et al., 2001), die auf eine Rolle in der Signaltransduktion hinweisen. Die Funktion der drei ITIMs von Siglec-2 (CD22) in der negativen Regulation der B-Zell-Signaltransduktion ist bekannt (Doody et al., 1995; Smith et al., 1998) und wurde in Kapitel 1.2.3 genauer beschrieben. Die extrazellulären Ig-ähnlichen Domänen bestehen aus einer N-terminalen V-set Domäne und einer oder mehreren (bis zu 16) C2-set Domänen. Die V-set und C-set-Domänen weisen typische Anordnungen der  $\beta$ -Faltblätter auf, die üblicherweise ausgehend vom N-Terminus mit A,B,C,C',D,E,F und G bezeichnet werden (Barclay et al., 1993). Charakteristisch für die Siglecs sind die Disulfidbrücken zwischen den Strängen B und F innerhalb der ersten Domäne und zwischen den ersten zwei N-terminalen Domänen (Kelm et al., 1997). Während die C2-set-Domänen hauptsächlich stabilisierend auf die N-terminale V-set-Domäne wirken (Nath et al., 1995), ist letztere für die Sialinsäure-Erkennung und -Bindung zuständig.

### 1.7.3 Sialinsäure-Erkennung durch Siglecs

Die Interaktionen der funktionellen Gruppen der Sialinsäure mit den Aminosäuren der *N*-

terminalen Domäne der Siglecs sind relativ genau bekannt und sollen nachfolgend beschrieben werden.

Ortsgerichtete Mutageneseversuche mit Sialoadhäsın (Vinson et al., 1996) und CD22 (van der Merwe et al., 1996) zeigten, dass die Sialinsäure-Bindungsstelle in dem GFCC'- $\beta$ -Faltblatt der N-terminalen Domäne lokalisiert ist. Die Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse des Sialoadhäsıns mit gebundener  $\alpha$ 2,3-Sialyllaktose ermöglichte es, die Interaktionen einzelner funktioneller Gruppen der terminalen Sialinsäure mit der Bindungsdomäne des Sialoadhäsıns auf atomarer Ebene zu ermitteln (May et al., 1998). Es zeigte sich, dass die Guanidino-Gruppe des Arg97 des F-Stranges von Sialoadhäsın über Ionenbindung mit der Carboxylgruppe der Sialinsäure interagiert. Hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Trp2 und der Methylgruppe des *N*-Acetyl-Rests der Sialinsäure sowie zwischen Trp106 und dem Rückgrat der Glycerolseitenkette stabilisieren die Bindung der Sialinsäure, da ein Austausch des Trp2 gegen Gln zu einem kompletten Verlust der Bindung bei Sialoadhäsın führt (Crocker et al., 1999). Die Hydroxylgruppen an C-8 und C-9 der Glycerolseitenkette der Sialinsäure bilden Wasserstoffbrückenbindungen zu der Amido- bzw. der Carbonylgruppe des Leu107 des Sialoadhäsıns aus. Das Arg105 des G-Stranges bildet eine Wasserstoffbrücke mit dem Stickstoff der *N*-Acetylgruppe des C-5 der Sialinsäure.

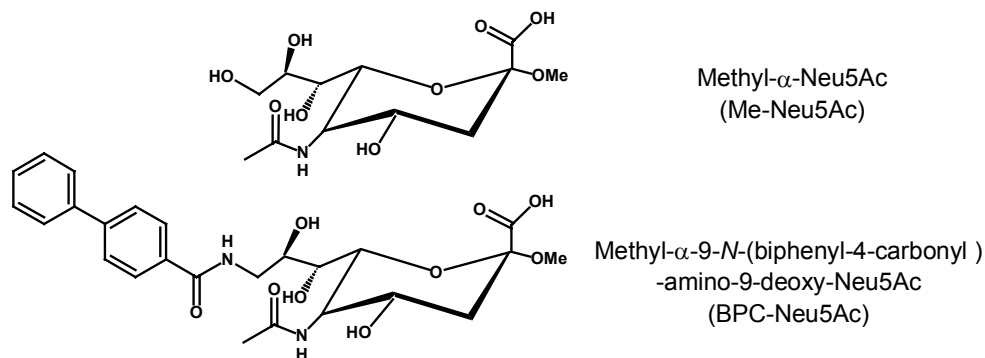
Der Vergleich der Primärsequenzen zeigt (☞ Abbildung 35, Anhang), dass von den an der Bindung beteiligten Aminosäureresten nur das Arg97 bei allen Siglecs zu finden ist. Andere Aminosäuren wie das Trp2 oder Trp106 bei Sialoadhäsın sind bei anderen Siglecs durch mehr oder weniger ähnliche Aminosäuren ausgetauscht (Kelm et al., 1997; Cornish et al., 1998; Patel et al., 1999). Solche Unterschiede in der Primärsequenz im Bereich der Bindungstasche sind vermutlich die Ursache für die Spezifität der Siglecs gegenüber verschiedenen Sialinsäuremodifikationen.

Bindungsversuche mit synthetischen Sialinsäurederivaten tragen zum Verständnis der Interaktionen der Siglecs mit der Sialinsäure oder sialylierten Glykanen auf submolekularer Ebene bei. Sie können im Zusammenhang mit den Erkenntnissen aus der Röntgenstruktur, Aufschlüsse über die bei der Bindung beteiligten Atome und Gruppen geben (Diplomarbeit Bock, 2000; Kelm et al., 1998; Strengge et al., 1998). Sialinsäurederivate mit voluminösen, ringförmigen hydrophoben Acylamino-Substituenten am C-9 der Sialinsäure zeigten dabei die deutlichsten Unterschiede in den Spezifitäten der Sigles (Diplomarbeit Bock, 2000; Kelm et al., 2002).

**Tabelle 1** Relatives Inhibitionspotential von Sialinsäurederivaten mit verschiedenen Siglecs bezogen auf 9-*N*-Diphenylacetyl-amino-Neu5Ac als Referenz (rIP =1)

Substituenten an C-9 von Neu5Ac	MAG	Sialoadhäsın	murines CD22	humanes CD22
9- <i>N</i> -Diphenylacetyl-amino-	1	1	1	1
9- <i>N</i> -(biphenyl-4-carbonyl)-amino-9-desoxy-	1	132	0,06	20
9- <i>N</i> -Benzoylamino-	3,2	5,6	<0,13	0,1

Anhand der Kristallstruktur von Sialoadhäsion mit gebundenem BPC-Neu5Ac (Zaccai et al., 2003) konnte gezeigt werden, dass bei Sialoadhäsion die Aminosäuren Val109 und Leucin107 den direkten Kontakt zu dem Biphenyl-Rest bilden. Bei CD22 befinden sich an dieser Stelle das Arg111 und Met109. Das BPC-Neu5Ac richtet sich dabei so aus, dass es zwischen diesen beiden Aminosäuren liegt. Die entstehende energetisch günstige Aminosäurestapelung ist der Grund für die hohe Affinität des BPC-Neu5Ac für CD22 (Zaccai et al., 2003).



**Abbildung 4** Graphische Darstellung der Struktur von Me-Neu5Ac und BPC-Neu5Ac.

## 1.8 CD22 und dessen möglicher Einfluss auf die Immundefizite des Neugeborenen

Die Kommunikation zwischen T-Zellen und B-Zellen sichert eine angemessene humorale Immunantwort. Sie ist beim Neugeborenen infolge mangelnder Kommunikationsfähigkeiten von T- und B-Zellen noch unterentwickelt. Der Grund für diese fehlende Kommunikation ist bisher nicht bekannt. *In vitro* Studien konnten zeigen, dass prinzipiell eine B- und T-Zell-Kommunikation neonataler Zellen möglich ist (Macardle et al., 1997). Das Vorkommen unreifer, neonataler T-Zellen erklärt aber noch nicht allein die ungenügende T-Zell-abhängige Immunantwort und vor allem nicht die gestörte humorale T-Zell-unabhängige Immunantwort (Viemann et al., 2000). Voraussetzung für eine B-Zell-abhängige Immunantwort und deren Modulation sind der Antigen-Rezeptor (BZR) und akzessorische Moleküle wie CD22. Bei Neugeborenen ist der Anteil an mIgM sowie des Heterodimers  $Ig\alpha / Ig\beta$  im Vergleich zum Erwachsenen erhöht (Macardle et al., 1997). Nach T-Zell-abhängiger Stimulierung von neonatalen B-Zellen erhöhte sich die Expressionsrate von CD22. Bei einer T-Zell-unabhängigen Aktivierung neonataler B-Zellen durch einen polyklonalen Antikörper konnte eine dramatische Abnahme an CD22 festgestellt werden (Viemann et al., 2000). Möglicherweise besteht ein Zusammenhang zwischen der unterschiedlichen Expressionsrate von akzessorischen BZR-Molekülen auf adulten und neonatalen B-Zellen und den damit verbundenen Unterschieden in der humoralen Immunantwort.

Studien von Jin et al. (2002) und Kelm et al. (2002) weisen daraufhin, dass die Sialinsäure-abhängige Bindung von CD22 an *cis*-Liganden auf der B-Zelle einen Einfluss auf die inhibitorische Funktion des CD22 in der BZR-vermittelten Immunantwort hat. Aber auch eine Bindung von CD22 „*in trans*“ kann vermutlich die Signalstärke der B-Zelle kontrollieren.

Studien von Lanoue (Lanoue et al., 2002) zeigen, dass die B-Zell-Aktivierung durch ein Antigen auf einer Zielzelle erniedrigt ist, wenn auf dieser Zelle  $\alpha$ 2,6-gebundene Sialinsäure coexprimiert wird. Interpretiert wird dieser Effekt mit einer Bewegung des CD22 zu den Zell-Zell-Kontaktflächen aufgrund der Interaktion mit dem *trans*-Liganden. An diesen Kontaktflächen kommen auch „Cluster“ von mIgM vor (☞ 1.2.2). Aktuelle Immunfluoreszenzstudien mit Milzzellen konnten zeigen, dass CD22 in Einzel-B-Zellen gleichmäßig und bei B-Zellen in lymphoiden „Clustern“ an den Zell-Zell-Kontaktflächen lokalisiert ist (Collins et al., 2004). Es konnte mehr CD22 an den Kontaktflächen bei B-Zellen mit B-Zellen als bei B-Zellen in Interaktion mit T-Zellen nachgewiesen werden. Dagegen war CD22 in ST6GalI-defizienten B-Zellen (Hennet et al., 1998), denen der CD22-Ligand Neu5Gc $\alpha$ 2,6- $\beta$ Gal fehlte, gleichmäßig in der Zelle verteilt.

## 1.9 Problemstellung und Ziele der Arbeit

Einer Vielzahl von Proteinen und Peptiden aus der Milch werden immunstimulierende Eigenschaften zugeschrieben. Ein bekannter Mechanismus bei der Regulation der humoralen Immunantwort läuft über CD22, das die BZR-vermittelte Immunantwort dämpft. Die Sialinsäure-abhängige Bindung an einen *cis*-Liganden scheint entscheidend für seine Lokalisierung in der B-Zelle sowie für seine inhibitorische Aktivität bei der B-Zell-abhängigen Immunantwort zu sein. Um weitere Anhaltspunkte für immunmodulierende Eigenschaften von Muttermilchproteinen einerseits und allergene Eigenschaften boviner Milchproteine andererseits zu erhalten, schienen Sialinsäure-abhängige Bindungsstudien mit CD22 eine geeignetes Modellsystem zu sein.

Ziel dieser Arbeit war es zunächst, rekombinante Proteine von CD22 herzustellen und ein geeignete Testsysteme mit rekombinantem CD22 zu entwickeln, um die Sialinsäure-abhängige Bindung von CD22 genauer analysieren und Interaktionen von Milchglykoproteinen/-peptiden mit CD22 nachweisen zu können. Für die Kontrolle einer Sialinsäure-abhängigen CD22-Bindung diente zudem die Herstellung und Charakterisierung von rekombinanten CD22-Mutanten mit einer defekten Sialinsäure-Bindungsdomäne.

In Bindungs- und Inhibitionstests mit rekombinantem CD22 sollten unverdaute Milchproteine sowie ihre proteolytisch verdauten und säulenchromatographisch fraktionierten Produkte, die reich an Bindungspartnern für CD22 sind, identifiziert werden. Die Proteine der Hauptproteinfraktionen der Milch sollten mittels elektrophoretischer Methoden anhand ihres Molekulargewichts, isoelektrischen Punkts und durch Lektinnachweise charakterisiert werden. Durch Affinitätsisolierung von Milchproteinen mit rekombinantem CD22 sollten Sialinsäure-abhängige, spezifische Bindungspartner von CD22 isoliert und massenspektrometrisch analysiert und identifiziert werden. In B-Zell-Aktivierungsversuchen sollte weiterhin der Einfluss von Milchglykoproteinen/-peptiden unterschiedlicher Herkunft auf die von CD22-vermittelte Dämpfung der Immunantwort untersucht werden.

## 2 MATERIAL

### 2.1 Antikörper, Lektine und Glykoproteine

Die Konzentrationen und Verdünnungen für die folgenden Reagenzien sind Richtwerte, die für die jeweilige Charge neu ausgetestet werden müssen.

#### 2.1.1 Antikörper für die Durchflusszytometrie

Bezeichnung	Hersteller	Konzentration/ Verdünnung
Maus anti human IgM (BU.1)	Lars Nitschke (Hybridomazelllinie) chemals The Binding Site, UK	0,4 –0,8 µg/mL

#### 2.1.2 Antikörper für die Immundetektion

Bezeichnung	Hersteller	Konzentration/ Verdünnung
Kaninchen anti huLaktoferrin	Dianova (Jackson)	1:200 in Blockierungspuffer (5 % Magermilch in TBS-T)
Ziege anti-CD22	Santa Cruz,	1:200 in TBS-T
Ziege anti-huIgG (Fc) (14 mg/mL)	Dunn (Biodesign)	1:1000 in Blockierungspuffer
Peroxidase konjugierter Esel anti-Ziege IgG	Dianova ( Jackson)	1:20000 in Blockierungspuffer
Peroxidase konjugierter Esel anti-Kaninchen IgG	Dianova ( Jackson)	1:20000 in Blockierungspuffer

#### 2.1.3 Glykoproteine und Antikörper für Mikrotiterplattentests

Bezeichnung	Hersteller	Konzentration/ Verdünnung
<u>Sandwich-ELISA / Festphasentest:</u>		
Ziege anti human IgG (Fc)	Dunn	15 µg/mL in NaHCO <sub>3</sub> pH 9,6
verschiedene Siglec <sub>d1-3</sub> -Fc	Arbeitskreis	1 µg/mL in HBA oder PBA
Alkalische Phosphatase-konjugierter Ziege anti-human IgG (Fc) (0,3 mg/mL)	Dianova (Jackson)	1:1000 in HBA
<u>Mikrotiterplatten-Bindungstest:</u>		
bovines IgM	Sigma	3µg/mL in NaHCO <sub>3</sub> pH 9,6
bovines Fetuin	Sigma	3µg/mL in NaHCO <sub>3</sub> pH 9,6
Asialofetuin (Hirmo et al., 1996)	Hirmo, S.	3µg/mL in NaHCO <sub>3</sub> pH 9,6 0,1-0,4 µg/mL (in 20 µL)
CD22-Fc	N. Bock	1 µg/mL ( in 5 µL HBS-T)
Alkalische Phosphatase-konjugierter Ziege anti-human IgG (Fc) (3 mg/mL)	Dianova (Jackson)	1:2000 (in 20 µL HBS-T) 1:1000 (in 5 µL HBS-T)
<u>Glyco-well-Plate Bindungstest</u>		
verschiedene Siglec <sub>d1-3</sub> -Fc	Arbeitskreis	0,4 µg / mL (in 20µL HBS-T)
Alkalische Phosphatase-konjugierter Ziege anti-human IgG (Fc) (3 mg/mL)	Dianova (Jackson)	1:666 (in 20 µL in HBS-T )

### 2.1.4 Reagenzien für den Lektinnachweis

Bezeichnung	Firma	Konzentration/ Verdünnung
biotinyliertes MAL II ( <i>Maackia Amurensis</i> Lektin II)	Vector Laboratories	10 µg/ml in 0,2 % BSA
biotinyliertes PNA (Peanut Agglutinin )	Vector Laboratories	10 µg/ml in 0,2 % BSA
biotinyliertes SNA ( <i>Sambucus nigra</i> Rinden Agglutinin)	Vector Laboratories	2 µg/ml in 0,2 % BSA
Peroxidase konjugiertes ABC Reagenz ( <i>Vectastain</i> ®)	Vector Laboratories	1:1,1 in 0,2 % BSA in TBS-T

## 2.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

### 2.2.1 Allgemeine Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien

Alle Lösungen wurden in Wasser angesetzt, welches zuvor mit einer *UltraClear Inegra UV Plus* Wasseraufbereitungsanlage (SG, Barsbüttel) zweifach deionisiert wurde (ddH<sub>2</sub>O). Medien und Pufferlösungen wurden autoklaviert (30 min, 121°C) oder sterilfiltriert (0,22 µm).

Sofern nicht anders angegeben, wurden Chemikalien der Reinheitsgrade "pro analysii" (p.a.) bzw. "reinst" verwendet. Zellkulturmedien und -reagenzien wurden im allgemeinen von der Firma Gibco, Materialien und Geräte für die SDS-PAGE sowie IEF von der Firma BIO-RAD bezogen. DNA-modifizierende Enzyme, DNA-Polymerasen sowie Basenpaarstandards wurden von den Firmen MBI Fermentas, NewEngland Biolabs, Promega und Gibco verwendet.

Serologische Einwegpipetten, Bakterien- und Plastikröhrchen, Zellkulturschalen, Pipettenspitzen und 1,5 mL-Reagiergefäße wurden von der Firma Sarstedt, die 0,2 mL-PCR-Reaktionsgefäße wurden von der Firma Biozym bezogen. Mehrkanalpipetten *Research* 12- und 8-Kanal und Mehrkanalpipettenspitzen (20-300 µL), Multipette und Kombitips, 1,5 mL-Reagiergefäße und Küvetten, (220-1600 nm) wurden von der von Firma Eppendorf bezogen.

### 2.2.2 Mikrotiterplatten

Bezeichnung	Hersteller	Typ	Verwendung
Microolon	Greiner	klar, 96-Well, Flachboden, hochbindend	ELISA, Festphasentest
96-Well	Sarstedt	klar, 96-Well, Flachboden	BCA-Test, BIAL-Test
<i>GlycoWell</i> <sup>TM</sup>	Lundonia Biotech	schwarz, 2x 8-Well-Streifen, Flachboden	Bindungstest
-Blank -Neu5Ac		mit immobilisierter Acetyl-Gruppe mit immobilisierter Neu5Ac-Gruppe	
<i>Cliniplate</i> 384	Thermo	schwarz, 384-Well,U-Form	Bindungstest
<i>Cliniplate</i>	Thermo	schwarz, 96-Well,U-Form	Bindungstest



### 2.2.3 Materialien für die Affinitätschromatographie

Bezeichnung	Hersteller
Chromatographie-Säulenkartuschen <i>Poly Prep</i> ®	BIO-RAD
NHS-Sepharose Fast Flow (Kapazität 35 mg Protein / mL Matrix)	Amersham Bioscience
Protein A-Sepharose Fast Flow (Kapazität 35 mg IgG / mL Matrix)	Amersham Bioscience

Humanes CD22-Fc wurde von der Firma GALAB Technologies (Geesthacht) kovalent an eine Matrix (*AffiSep*) gekoppelt und das matrixgebundene CD22-Fc (*AffiSep*®CD22-Fc) in Suspension oder in Säulenkartuschen gepackt zur Verfügung gestellt.

1) 3,5 mg CD22-Fc Wt pro g (mL) Matrix immobilisiert : 500 µL <i>AffiSep</i> ®CD22-Fc		
2) <i>AffiSep</i> ®- MiniSpin-Säulen	0,1 mL-Matrix	0,5 mL Auftragsvolumen
a) mit 3,5 mg CD22-Fc Wt /g (mL) Matrix		
b) mit 0,67 mg CD22-Fc Dreifachmutante (R120A, W128Q, W24Q) /g (mL) Matrix		
3) <i>AffiSep</i> ®-Säulen	0,5 mL-Matrix	0,5 mL Auftragsvolumen
mit 5,85 mg CD22-Fc Wt /g (mL) Matrix		

### 2.2.4 Spezielle Materialien und Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller
Acetonitril (Methylcyanid)	Sigma
Basenpaar-/Molekulargewichtsstandard (80-10000 bp)	MBI Fermentas
BSA (Fraktion V)	PAA Laboratories
<i>Calibration Mixture 2</i> in <i>Sequazyme</i> ™ Peptide Mass Standard Kit	Applied Biosystems
Carboxylat-Küvette, planar, 2-Kammern für <i>IAsys</i>	Thermo LifeScience
Carboxymethyl-Dextran (CMD)-Küvette, 2-Kammern für <i>IAsys</i>	Thermo LifeScience
<i>Cellline CL350</i> oder <i>CL1000</i> -Fermenter	Integra
Dialyseschlauch ( <i>Visking</i> ® 8/32, Ausschlußgrenze 10 kD)	Serva
<i>ExGen500 in vitro</i> Transfection reagent	MBI Fermentas
FDP (Fluoreszein Diphosphat)	MoBiTec (Gibco)
Hygromycin	PAA Laboratories
Indo 1 AM (I-223)	Molecular Probes
Magermilchpulver	Heirler GmbH
pluoronisches F-127 (20 %ig (w/v))	Molecular Probes
Röntgenfilm <i>Hyperfilm ECL</i>	Amersham Bioscience
Protein- Molekulargewichtsstandard ( <i>prestained + unstained</i> )	MBI Fermentas
PVDF-Membran <i>Hybond P</i>	Amersham Bioscience
Trifluoressigsäure 99,5 % (TFA, 1 %ig (w/v) in ddH <sub>2</sub> O gelöst)	Fluka
Trypsin ( <i>Sequencing Grade Modified</i> )	Promega
<i>Vibrio cholera</i> Sialidase (VCS) 1 Unit /ml	Dade Behring
immobilisierte <i>Vibrio cholera</i> Sialidase: <i>GlycoCleave</i> ®VCS 1 Unit /mL Matrix	GALAB Technologies

### 2.2.5 Kits

Bezeichnung	Hersteller
BCA-Protein Assay Reagent	Pierce
ECL Westernblotting Detektionsreagenz	Amersham Bioscience
EDC /NHS, Ethanolamin-Kit für <i>IASys</i>	Thermo LifeScience
<i>FastPlasmid™</i> Mini Kit	Qiagen
<i>HiSpeed™</i> Plasmid Midi Kit	Qiagen
<i>QIAquick™</i> Gel Extraction Kit	Qiagen
<i>QIAquick™</i> PCR Purification Kit	Qiagen
<i>CalibrationMixture2</i> in <i>Sequazyme™</i> PeptideMass Standard Kit	Applied Biosystems
Vectastain® ABC Kit	Vector Laboratories

## 2.3 Bakterien und Zelllinien

### 2.3.1 Bakterienstämme

Bezeichnung	Hersteller
DH5α <i>Escherichia coli</i> ( <i>E. coli</i> )	Dr. Klipp, Bochum
XL1-blue <i>Escherichia coli</i> ( <i>E. coli</i> )	Stratagene

### 2.3.2 Eukaryotische Zellen und Zelllinien

Bezeichnung	Hersteller
CHO K1-Zelllinie (Subclon von Ovarzellen des Chinesischen Hamsters)	DSMZ, Heidelberg
Daudi-Zelllinie (humane lymphoblastoide B-Zelllinie, Burkitt-Lymphom )	Lars Nitschke, Würzburg (DSMZ)
humane Erythrozyten	N.Bock / H. Gähje, Bremen

## 2.4 Inhibitoren: Milchproteine/-peptide und Sialinsäurederivate

Alle (Glyko-)Milchproteine, -peptide, Sialinsäuren und Sialinsäurederivate wurden mit NaOH neutralisiert und i.d.R. in HBS gelöst.

Bezeichnung Sialinsäure /-derivate	Hersteller
BPC-Neu5Ac Mw 524 g / mol (9- <i>N</i> -(biphenyl-4-carbonyl)-amino-9-desoxy-Neu5AcMe	Reinhard Brossmer, Heidelberg
Neu5Ac ( <i>N</i> -Acetylneuraminsäure) Mw 309,3 g / mol	Sigma

Von Milupa (Numico) Research (Friedrichsdorf) wurden verschiedene Präparationen an unverdauten, verdauten und verdauten, säulenchromatographisch fraktionierten Milchproteinen als Lyophilisate bereitgestellt. Die unverdauten Proben enthielten 50-70% Protein, behandelte Proben enthielten ca. 70-90 % Protein. Die Konzentrationsangaben beziehen sich auf die gelöste Gesamtmenge an Substanz.

<b>Bezeichnung der Milchprotein/-peptide</b>	<b>Abkürzung</b>
<u>Proteine aus Milchen:</u>	
human / Muttermilch	H / h
bovin / Kuhmilch	B / b
Kamel- / Kamelmilch	K / k
<hr/>	
unbehandelt / unverdaut	
Caseine	C / Ca
Molkenproteine	M / Mo
Laktoferrin	L / Lf
Laktalbumin	LA
<hr/>	
<u>hydrolysiert / verdaut</u>	- (H)hydrolysate
tryptisch/chymotryptisch	- (P)peptide / P
tryptisch (TPCK) oder tryptisch/chymotryptisch bei Kamel-Caseinen	
tryptisch (TPCK) bei bovinem Laktoferrin	
<hr/>	
<u>hydrolysiert und fraktioniert</u>	
Gelpermeationschromatographie (Fraktion 1)	GPC (-1)
<hr/>	
hydrolysiert, GPC-fraktioniert und subfraktioniert	
<i>Reversed-Phase</i> -Chromatographie (Fraktion 3)	RPC (-3)
<hr/>	
<u>Proteine pflanzlicher Herkunft</u>	
Erbsenprotein-Isolat tryptisch/chymotryptisch verdaut	
Sojaproteinhydrolysat <i>Si Brm 4</i>	

## 2.5 Lösungen

### 2.5.1 Medien

LB-Medium	15 g Trypton
	5 g Hefeextrakt
(mit Ampicillin)	5 g NaCl ad 1 L ddH <sub>2</sub> O, autoklaviert (+ 60 µg/ml Ampicillin)
LB-Agar-Platten (+ Amp)	15 g Agar in 1 L LB-Medium (+ 60 µg/ml Ampicillin)
αMEM-Medium	10,17 g αMEM-Pulvermedium 2,2 g NaHCO <sub>3</sub> ad 1 L ddH <sub>2</sub> O, sterilfiltrieren, 4°C lagern
RPMI-Medium	RPMI-1640 Flüssigmedium (ohne Glutamin)
Supplement complete (SC)	1 % (v/v) (nichtessentielle Aminosäurelösung (MEM)) 1 mM Natriumpyruvat MEM 0,07 % L-Glutamin 0,05 mM 2-Mercaptoethanol 100 U/ml Penicillin 100 U/ml Streptomycin 1-10 % (v/v) FCS, hitzeinaktiviert

## 2.5.2 Mehrfach verwendete physiologische Puffer

<b>HBS</b> (HEPES buffered saline)	10 mM HEPES pH 7,4 / 150mM NaCl
<b>HBS-T</b> (HBS mit Tween )	HBS mit 0,05 % (w/v) Tween
<b>HBA</b> ( HBS mit BSA)	HBS mit 0,5 % (w/v) BSA
<b>PBS</b> (phosphate buffered saline)	137 mM NaCl / 2,7 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> / 1,5 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
<b>PBA</b> (PBS mit BSA)	PBS mit 0,5 % (w/v) BSA
HBS-/PBS-Azid	HBS/ PBS mit 0,02 % (v/v) Natriumazid (2 %ig (w/v))
<b>TBS</b> (Tris buffered saline)	10 mM Tris-HCl pH 7,4 / 150mM NaCl
<b>TBS-T</b> ( TBS mit Tween)	TBS mit 0,15 % (w/v) Tween

## 2.6 Oligonukleotide

Die Mutageneseprimer für CD22<sub>d1-3</sub> wurden von der Firma Eurogentec, alle anderen Oligonukleotide für CD22<sub>d1-3</sub> wurden von der Firma MWG angefertigt.

Name	Sequenz (5'→3')	Beschreibung
OSK 179	<u>GGACTAGT</u> ATGCATCTCCTCGGCCCTGG Spe I	Sense-Primer für Amplifikation von CD22 <sub>d1-3</sub> aus pCDM8 (mit Spe I Schnittstelle)
OSK 180	GA <u>AGATCT</u> ACTTACCTGTGGCATACTGCA Bgl II CTTGCAGGAACAC	Antisense-Primer zur Amplifikation von CD22 <sub>d1-3</sub> aus pCDM8 (mit Bgl II Schnittstelle + <i>splice donor site</i> )
OSK 198	CTGCACACTGAGTATCCACC	Sequenzierungs-Primer für d1-2 von CD22 <sub>d1-3</sub> (ab Pos. 308)
OSK 199	CGGAGCGAGCTCAAGTTCTC	Sequenzierungs-Primer für d2-3 von CD22 <sub>d1-3</sub> (ab Pos. 606)
OSK 200	ACCAGAGTGGGAAGTACTGC	Sequenzierungs-Primer für d3 von CD22 <sub>d1-3</sub> (ab Pos. 910)
OSK 201	GCACTTGCAGGAACACTTCT	Sequenzierungs-Antisense-Primer für d3 von CD22 <sub>d1-3</sub>
OSK 202	ATCTCCA <u>ACTT</u> CGGGGTGTG	Sequenzierungs-Antisense-Primer für d2 von CD22 <sub>d1-3</sub>
OSK 203	GGTCAGAGTGACTTCTGGG	Sequenzierungs-Antisense-Primer für d1-2 von CD22 <sub>d1-3</sub> in pDEF
OSK 204	AGAGTCTTGTC <u>CCAT</u> CAAAC	Sequenzierungs-Antisense-Primer für d1 von CD22 <sub>d1-3</sub> in pDEF

Name	Sequenz (5'→3')	Beschreibung
OSK 103	CTGGGGCTGCATAGCCGGG	Sequenzierungs-Antisense-Primer für d3 von CD22 (aus hinge-Region huIgG)
OSK 192	AGTGGTCAACTGGGGCTGGCCATGGAGTC CAA      G                      AGG	Mutagenese-Primer R120A (Pos.363-365) (Pos. 351-356: PvuII Schnittstelle verschwindet: Pos. 353 C zu T)
OSK 193	TTGGA <del>CT</del> CCATGGCCAGCCCCAGTTGACC ACT                      CCT                      C	Mutagenese-Antisense-Primer R120A
OSK 194	AAGACTGAGAAACAGATGGAACGAATTC ACCTCAA                      TGG                      A	Mutagenese-Primer W128Q (Pos.387-389) (Pos.397-402: EcoRI Schnittstelle entsteht : Pos. 401 A zu T)
OSK 195	TTGAGGTGAATTCGTTCCATCTGTTTCTCA GTCTT      T                                      CCA	Mutagenese- Antisense- Primer W128Q
OSK 196	TCAAGTAAACAGGTTTTTGAGCACCCCGA GACCCT      TGG                                      T A	Mutagenese-Primer W24Q (Pos. 75-78) (Pos. 90-95: Aval Schnitt-stelle entsteht: Pos.92 T zu C, Pos. 95 A zu G)
OSK 197	AGGGTCTCGGGGTGCTCAAAAACCTGTTT ACTTGA    CAG	Mutagenese-Antisense-Primer W24Q

## 2.7 Plasmide

Der Vektor pDEF(Fc-3c) (kurz: pDEF) wurde von Dr. Crocker (Dundee, UK) gestellt. Dieser Expressionsvektor für eukaryotische Zellen besitzt den eukaryotischen Transkriptionsfaktor EF-1 $\alpha$  und das Resistenzgen für die Hygromycin B Phospho-Transferase (HygR) unter Kontrolle des SV40 *Late* Promotors, der eine hohe Zahl an Kopien des Plasmids in transfizierten Zellen ermöglicht. Durch das Resistenzgen können mit pDEF transfizierte eukaryotische Zellen gegen Hygromycin B-Resistenz selektiert und so dauerhaft stabil transfiziert werden.

Des weiteren enthält der Vektor auch einen Replikationsursprung für Bakterien (ori), für die Vervielfältigung in Bakterien, und ein Gen für die Resistenz gegen Ampicillin, was die Selektion positiv transformierter Bakterien erlaubt. Außerdem beinhaltet dieser Vektor den Fc-Teil des humanen IgG<sub>1</sub> inklusive der hinge-Region (hinge -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), wobei diese Region so modifiziert wurde, dass eine proteolytische Spaltstelle für die rhinovirale 3c-Protease enthalten ist : pDEF(Fc-3c).

In diesen Vektor können jetzt die kodierenden Sequenzen für die extrazellulären Adhäsionsmolekül-Domänen (d mit Anzahl x-y) kloniert werden, die dann als Fc-Chimären zur Expression gebracht werden. Die exprimierten Fc-Chimären des Adhäsionsmoleküls können durch die Proteaseschnittstelle nach der erfolgreichen Expression in den Fc-Teil und zwei monomere CD22<sub>d1-3</sub> Teile getrennt werden. Der Vektor enthält Schnittstellen für *Xba*I und *Bam*HI in seiner „multiple cloning site“ .

Die kodierende Sequenz von CD22<sub>d1-3</sub> (Wilson et al., 1991b) liegt in dem Expressionsvektor pCDM8 (Simmons, 1993) zusammen mit der genomischen Sequenz des Fc-Teils des humanen IgG<sub>1</sub> vor.

## 3 METHODEN

### 3.1 Klonierungsstrategie

Die kodierende Sequenz von CD22<sub>d1-3</sub> lag in dem Expressionsvektor pCDM8 vor, der keine proteolytische Spaltstelle für die rhinovirale 3c-Protease und auch keinen Selektionsmarker für stabile Zelllinien besitzt. Daher sollte die kodierende Sequenz von CD22<sub>d1-3</sub> in den Expressionsvektor pDEF umklontiert werden. Die kodierende Sequenz von CD22<sub>d1-3</sub> enthält interne Schnittstellen für *Xba*I und *Bam*HI: Neben der Amplifikation des Fragments mussten daher am 3' und am 5'-Ende Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen erzeugt werden, die die gleichen kohäsiven Enden erzeugen wie die Schnittstellen am Expressionsvektor. Neben der Amplifikation entsteht durch den Sense-Primer am 5'-Ende eine *Spe*I-Schnittstelle und durch den Antisense-Primer am 3'-Ende eine *Bgl*II-Schnittstelle. Das Amplifikationsprodukt wurde mit *Bgl*II und *Spe*I geschnitten. Ersteres erzeugt die gleichen kohäsiven Enden wie *Xba*I und letzteres die gleichen kohäsiven Enden wie *Bam*HI. Das geschnittenen CD22<sub>d1-3</sub>-Fragment konnte in den vorbereiteten pDEF(3c-Fc)-Vektor kloniert werden.

Basierend auf pDEF(Fc-3c)-CD22<sub>d1-3</sub> Wt wurden Aminosäure-Mutationen vorgenommen (⇨3.4), die zu den für diese Arbeit interessanten Varianten, pDEF(Fc-3c)-CD22<sub>d1-3</sub>(R120A), pDEF(Fc-3c)-CD22<sub>d1-3</sub> (W128Q), pDEF(Fc-3c)-CD22<sub>d1-3</sub> (W24Q), pDEF(Fc-3c)-CD22<sub>d1-3</sub> (R120A/W128Q), pDEF(Fc-3c)-CD22<sub>d1-3</sub> (R120A/W24Q), pDEF(Fc-3c)-CD22<sub>d1-3</sub> (W24Q/W128Q) und pDEF(Fc-3c)-CD22<sub>d1-3</sub> (W24Q/ R120A /W128Q) führten.

### 3.2 Amplifikation von DNA durch PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist ein Verfahren, das die enzymatische Vervielfältigung kleinster DNA-Mengen erlaubt (Saiki et al., 1985). Dabei werden kurze, synthetische Oligonukleotide sogenannte „Primer“, die den terminalen Bereichen der zu amplifizierenden Sequenz komplementär sind, eingesetzt. Diese Primer können bei Bedarf auch Mutationen oder weitere 5'-Sequenzen, etwa zusätzliche Restriktionsschnittstellen, enthalten. Durch die Polymerase werden die freien 3'-Enden der Primer (Antisense- und Sense-Primer) zu zwei neuen, komplementären DNA-Strängen verlängert. Jeder Reaktionszyklus führt so zu einer Verdopplung des vorhandenen DNA-Fragments.

Die Herkunft der DNA kann unterschiedlich sein. Es wurde aufgereinigte Plasmid-DNA oder eine ganze Bakterienkolonie als Matrize eingesetzt.

Wenn eine Bakterienkolonie als Matrize verwendet werden soll, wird eine Kolonie mit einem sterilen Zahnstocher von einer Agarplatte abgenommen, in einem PCR-Reaktionsgefäß und anschließend auf einer neuen Agarplatte (Replicaplatte) abgestrichen. Alle Komponenten wurden als „Master-Mix“ vorbereitet und von diesem 50 µL zu jeder entnommenen Bakterienkolonie gegeben.

### 3.2.1 PCR oder Kolonie-PCR mit *Taq*-Polymerase

Der PCR-Ansatz wurde in 0,2 mL-Reagiergefäßen (Biozym) mit der *Taq*-Polymerase (MBI Fermentas) angesetzt.

Komponenten			
1	ng	Matrizen DNA oder eine gepickte Bakterienkolonie	
2	µL	Primer 1 (20 pMol /µL)	40 pMol
2	µL	Primer 2 (für den Gegenstrang) (20 pMol /µL)	40 pMol
5	µL	2 mM dNTP-Mix (je 0,5 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP)	0,2 mM
5	µL	25 mM MgCl <sub>2</sub>	2,5 mM
5	µL	Taq-Reaktionspuffer 10-fach	1-fach
1	µL	<i>Taq</i> -Polymerase (1 Unit /µL)	1 Unit
ad 50 µL mit ddH <sub>2</sub> O			

Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen in einem Thermocycler der Firma Eppendorf durchgeführt.

Anz. Wdh	Dauer	Prozess	Temperatur
1	120 sec	Initiale Denaturierung: Inaktivierung von Nukleasen und vollständige Denaturierung	95°C
25-35	60 sec	Denaturierung der DNA	95°C
	30 sec	Annealing (Primeranlagerung) T <sub>a</sub> (T <sub>m</sub> -a)	42-65°C
	240 sec	Polymerasereaktion (Strangverlängerung / Extension)	72°C
1	300 sec	Finale Extension (Strangverlängerung )	72°C
		Abkühlen auf / Halten bei	4°C

### 3.2.2 PCR mit *Pfu*-Polymerase

Für die Verwendung von DNA für die Ligation (☞3.6.2) wurde die *Pfu*-Polymerase eingesetzt, da ihre zusätzliche 3'-5'-Exonuclease-Aktivität für eine Korrekturaktivität („Proofreading“) sorgt. Um die Ausbeute für die Ligation zu erhöhen, wurden mehrere Ansätze mit derselben DNA-Matrize gefahren.

Komponenten			
1	ng	Matrizen DNA	
2	µL	Primer 1 (20 pMol/µL)	40 pMol
2	µL	Primer 2 (für den Gegenstrang ) (20 pMol/µL)	40 pMol
1	µL	10 mM dNTP-Mix (je 0,5 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP)	0,2 mM
5	µL	MgSO <sub>4</sub> -Reaktionspuffer 10-fach	1-fach
0,5	µL	<i>Pfu</i> -Polymerase (2,5 Unit /µL)	1,25 Unit
ad 50 µL mit ddH <sub>2</sub> O			



Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen in einem Thermocycler der Firma Eppendorf durchgeführt.

Anz. Wdh	Dauer	Prozess	Temperatur
1	120 sec	Initiale Denaturierung: Inaktivierung von Nukleasen und vollständige Denaturierung	95°C
25-35	60 sec	Denaturierung der DNA	95°C
	30 sec	Annealing Ta (T <sub>m</sub> -a)	42-65°C
	240 sec	Polymerasereaktion (Strangverlängerung)	72°C
1	300 sec	Finale Extension	72°C
		Abkühlen auf / Halten bei	4°C

Zur Kontrolle der Reaktion wurden 5 µL des Ansatzes auf einem Agarosegel analysiert (☞ 3.5.1). Das PCR-Produkt wurde anschließend durch präparative Agarosegel-Elektrophorese (☞ 3.5.1) und mittels des *QIAquick* PCR-Extractions Kits der Firma Qiagen oder mittels des *QIAquick* PCR Purification Kits der Firma Qiagen von Primern und Nebenprodukten gereinigt.

### 3.3 Aufreinigung von PCR-Produkten

Die Aufreinigung wurde mit dem *QIAquick*<sup>TM</sup> PCR Purification Kit (Qiagen) durchgeführt. Dazu wurde das 5-fache Volumen des Guanidinhydrochlorid-haltigen Puffers PB zu dem PCR-Ansatz pipettiert und auf die mitgelieferten Silikagel-Zentrifugationssäulen (*QIAquick*<sup>TM</sup>-Säulen) gegeben. Nach der Zentrifugation (1 min, 13000 rpm, RT, Eppendorf MiniSpin) wurde der Durchlauf verworfen und die gebundene DNA mit 750 µL des Ethanolhaltigen Puffers PE durch Zentrifugation gewaschen. Anschließend wurden 50 µL Puffer EB (10 mM Tris-HCL pH 8,5) auf die Säule gegeben und für 1 min inkubiert. Anschließend wird die DNA in ein 1,5 mL-Reagiergefäß durch 1-minütige Zentrifugation eluiert. Zur Kontrolle wurden 2 µL der DNA-Lösung auf einem Agarosegel analysiert.

### 3.4 Ortsgerichtete Mutagenese

Mutationen wurden in dieser Arbeit basierend auf dem Protokoll des *QuickChange*<sup>TM</sup>-Mutagenese-Kits (Stratagene) eingeführt.

Dazu wurden je zwei komplementäre Mutagenese-Primer synthetisiert, die folgende gewünschte Mutationen enthielten: 1) die Mutation zur Änderung einer Aminosäure und 2) die sogenannte „stille“-Mutation(en), durch die Restriktionsschnittstellen hinzugefügt oder entfernt wurden, um nach erfolgter Transformation die erfolgreich veränderten Klone zu identifizieren.

		Komponenten	
50-200	ng	Matrizen DNA	
1,25	$\mu\text{L}$	Primer 1 (100 ng/ $\mu\text{L}$ )	125 ng
1,25	$\mu\text{L}$	Primer 2 (für den Gegenstrang) (100 ng/ $\mu\text{L}$ )	125 ng
1	$\mu\text{L}$	10 mM dNTP-Mix (je 0,5 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP)	0,2 mM
5	$\mu\text{L}$	MgSO <sub>4</sub> -Reaktionspuffer 10fach	1-fach
1	$\mu\text{L}$	<i>Pfu</i> -Polymerase (2,5 Unit / $\mu\text{L}$ ) ad 50 $\mu\text{L}$ mit ddH <sub>2</sub> O	2,5 Unit

Die Mutagenese-Primer wurden mit einem Plasmid, das die Ausgangssequenz enthielt, in einige PCR-Zyklen mit der thermostabilen, fehlerkorrigierenden *Pfu*-Polymerase eingesetzt.

Die PCR für zur Durchführung der Mutagenese wurde unter folgenden Bedingungen in einem Thermocycler der Firma Eppendorf durchgeführt.

Anz. Wdh	Dauer	Prozess	Temperatur
1	30 sec	Initiale Denaturierung: Inaktivierung von Nukleasen und vollständige Denaturierung	95°C
18	30 sec	Denaturierung der DNA	95°C
	60 sec	Annealing Ta (T <sub>m</sub> -a)	58°C
	1200 sec	Polymerasereaktion (Strangverlängerung)	68°C
		Abkühlen auf / Halten bei	4°C

Im weiteren Verlauf der Prozedur macht man sich zunutze, dass die Ausgangsplasmide aufgrund ihrer Präparation aus *dam*<sup>+</sup>-*E. coli*-Stämmen *dam*-methyliert sind, die neu synthetisierten, eine Mutation tragenden Stränge hingegen nicht.

Mit der Restriktionsendonuklease *Dpn* I, deren tetramere Erkennungssequenz GATC (mit A-CH<sub>3</sub>) statistisch alle 256 Nukleotide vorkommt, wurden gezielt die *dam*-methylierten Ausgangsstränge verdaut. Dazu wurde der PCR-Ansatz direkt mit 1  $\mu\text{L}$  *Dpn* I (10 Unit/ $\mu\text{L}$ ) versetzt und 3 h bei 37°C inkubiert. Der Reaktionsansatz sollte anschließend nur noch mutierte (neu synthetisierte und daher nicht-methylierte) Plasmide enthalten.

Da die *Pfu*-Polymerase keine Ligase-Aktivität enthält, weisen die neuen Stränge zwar jeweils einen Einzelstrangbruch 5' des jeweiligen Primers auf, aber aufgrund der Komplementarität der Primersequenzen liegen die Plasmide trotzdem doppelsträngig-zirkulär vor. Die mutierten Plasmide konnten direkt in *E. coli* XL1-Blue transformiert und die transformierten Bakterien auf einer LB/Amp-Platte angezogen werden (☞ 3.7). 5-10 der angezogenen Klone wurden der LB/Amp-Platte entnommen und für eine Kolonie-PCR mit Taq-Polymerase eingesetzt und parallel auf einer Replicaplatte erneut angezogen (☞ 3.2.1). Die PCR-Produkte wurden in der Agarosegel-Elektrophorese (☞ 3.5.1) auf eine erfolgreiche Transformation der DNA überprüft. Anschließend wird die aus der Bakterienkolonie amplifizierte DNA durch Restriktionsverdau (☞ 3.6.1) mit den Restriktionsenzymen, deren Schnittstellen hinzugefügt oder entfernt wurden, verdaut. Die Bruchstücke wurden in der Agarosegel-Elektrophorese

(↻3.5.1) mit denen des Ursprungsplasmid verglichen, um eine erfolgreiche Mutagenese nachzuweisen. Erfolgreich transformierte und mutierte Klone wurden von der Replicaplatte angezogen, die DNA mittels Plasmid-, „Mini“-Präparation aufgereinigt (↻3.8.1) und durch Sequenzierung überprüft (↻3.8.4). Für die stabile Transfektion in CHO-Zellen (↻3.9.3) wurden größere Mengen an DNA mittels Plasmid-Midi-Präparation aufgereinigt (↻3.8.2). Erfolgreich mutierte Plasmide konnten für weitere Mutationen eingesetzt werden, um weitere Aminosäuren auf DNA-Ebene zu verändern.

### 3.5 Auftrennung und Extraktion von DNA

#### 3.5.1 Agarosegel-Elektrophorese von DNA

Bei einer Agarosegel-Elektrophorese können DNA-Bruchstücke der Größe nach aufgetrennt werden.

<u>TBE-Puffer (1 L 10-fach Lösung)</u>	<u>1-%iges Agarosegel</u>
108 g Tris	0,5 g Agarose (Eurogentec)
55 g Borsäure	50 mL TBE-Puffer
40 ml 0,5M EDTA pH 8	aufkochen, etwas abkühlen
ad 1 L ddH <sub>2</sub> O	5 µL Ethidiumbromid (10 mg/mL Lösung)

Das Ethidiumbromid interkaliert mit der DNA und fluoresziert unter UV-Licht, so dass die DNA-Banden nach der Elektrophorese mit UV-Licht sichtbar werden. Je nach Verwendung wurde ein präparativer Kamm (Auftragstaschen bis 120 µL Volumen) oder ein analytischer Kamm (Auftragstaschen bis 12 µL Volumen) eingesetzt. Danach wurden je 100 µL oder 10 µL der zu trennenden Proben mit 15 µl oder 1,5 µl Auftragspuffer (250 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 87% (v/v) Glycerol, 0,5 mg/ml (w/v) Bromphenolblau) versetzt und zusammen mit dem Molekulargewichtsstandard in die Taschen des ausgehärteten Gels pipettiert. Die Elektrophorese wurde für 30 bis 60 Minuten bei 100 V durchgeführt. Anschließend erfolgte die Sichtbarmachung der DNA-Banden auf einem UV-Tisch bei 405 nm und unter Verwendung eines Herolab-Geldokumentationssystems.

#### 3.5.2 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Die entsprechenden DNA-Banden wurden auf dem UV-Tisch mit einem Skalpell möglichst knapp aus dem Agarosegel ausgeschnitten und in vorgewogene 1,5 mL-Reagiergefäße überführt. Das Gewicht des Gel-Stücks (100 mg ≈ 100 µL) wurde bestimmt (max. 400 mg) und das dreifache Volumen des Guanidinthiocyanat-haltigen Puffers QG hinzugefügt. Während der 10-minütigen Inkubation bei 50°C wurde 2-3 Mal gut gemischt bis sich das Gel aufgelöst hatte. Die weiteren Schritte erfolgten analog zum *QIAquick*<sup>TM</sup> PCR Purification Kit durch Aufreinigung über Silikasäulchen (↻3.3).

### 3.6 Enzymatische Modifikation von DNA

#### 3.6.1 Restriktionsverdau von DNA

Mittels geeigneter Restriktionsendonukleasen können Plasmide in definierte DNA-Fragmente geschnitten werden. Diese Restriktionsendonukleasen benötigen bestimmte Puffer, die von den entsprechenden Firmen in 10-fach konzentrierter Form angeboten werden. Bei einem Verdau mit zwei Restriktionsendonukleasen sollte der Puffer für beide Enzyme geeignet sein. Der sogenannter MED-Restriktionspuffer (10-fach Puffer: 2,92 % (w/v) NaCl / 1,21 % (w/v) Tris-HCL pH 7,5 / 2,03 % (w/v) MgCl<sub>2</sub> +1 mg/ml (w/v) BSA) kann mit den meisten DNA-modifizierenden Enzymen eingesetzt werden.

Jeder Verdauansatz (10-50 µL ) enthält folgende Komponenten.

1µg DANN  
2-10 Units jedes Enzyms  
1/10 µL des Ansatzvolumen des entsprechenden 10-fach Puffers  
ad 10-50 µL ddH<sub>2</sub>O

Der Verdauansatz wird 2 h bei 37°C inkubiert. Zur Inaktivierung wurde der Ansatz zunächst bei -20°C einmal durchgefroren und anschließend für 10 min auf 70°C erhitzt. Die verdauten Plasmide können bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt werden.

#### 3.6.2 Ligation von DNA-Fragmenten

Jeder Ligationsansatz (50 µL ) enthält folgende Komponenten.

20 ng Vektor-DANN  
3-5-fachen molaren Überschuss an zu insertierender DNA  
2 Units T<sub>4</sub>-DNA-Ligase  
1/5 µL des Ansatzvolumen an 5-fach Puffers  
ad 50 µL ddH<sub>2</sub>O  
(oder ad 50 µL MED-Restriktionspuffer)

Der Verdauansatz wurde 16 h bei 18°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Ligationsansatz in chemisch kompetente *E. coli* transformiert.

### 3.7 Herstellung kompetenter Bakterien und Transformation von DNA in Bakterien

Unter einer Transformation versteht man das Einbringen fremder DNA in Bakterien. Dafür müssen die Bakterien vorbehandelt, „kompetent“ gemacht werden, damit sie die freie DNA aufnehmen können. Eine Methode um Bakterien chemisch kompetent zu machen ist die Rubidiumchlorid-Methode.

100 mL vorgewärmtes LB-Medium werden mit 2 mL einer 1 M Mg<sup>2+</sup>-Lösung (500 mM MgCl<sub>2</sub> / 500 mM MgSO<sub>4</sub>) versetzt und mit 1 mL einer Übernachtskultur eines *E. coli* Stamms angeimpft. Die Kultur wurde bei 37 °C und 240 rpm im Schüttelinkubator inkubiert. In

regelmäßigen Abständen wurde die optische Dichte der Kultur bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen, bis sie einen Wert von 0,5 erreicht hatte. Die Bakterien befanden sich dann in der logarithmischen Wachstumsphase. Die Kultur wurde in 50 mL Röhren 10 min bei 4000 rpm 4°C (Eppendorf Tischzentrifuge *5810 R*) zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert. Die Gefäße mit dem Zellpellet wurden auf Eis gestellt und das Pellet in 25 mL TMF-Puffer (100 mM CaCl<sub>2</sub> x2H<sub>2</sub>O / 40 mM MnCl<sub>2</sub> x4H<sub>2</sub>O / 50 mM RbCl ad ddH<sub>2</sub>O) resuspendiert und für eine Stunde auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut zentrifugiert und in 5 mL frischem TMF-Puffer resuspendiert und mit 1 mL Glycerol gemischt. Es wurden sofort 200 µL-Aliquots in vorgefrorenen 1,5 mL-Reagiergefäße auf Trockeneis durchgefroren, bevor sie bei -80°C gelagert wurden.

Bei der Transformation werden chemisch kompetente Zellen zusammen mit cDNA einem Hitzeschock (42°C) ausgesetzt.

Für die Transformation wurde ein Aliquot mit 200 µL chemisch kompetenten Zellen aufgetaut und 10 µL Mutageneseansatz oder 25 µL eines 50 µL Ligationsansatzes dazugegeben. Der Reaktionsansatz wurde einmal vorsichtig geschüttelt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien für 2 min in ein 42°C warmes Wasserbad gestellt (Hitzeschock), kurz auf Eis gekühlt und sofort 700 µL LB-Medium hinzugegeben und 45 min bei 37°C und 240 rpm im Schüttelinkubator inkubiert. Die Bakteriensuspensionen wurden 1 min bei 1000 rpm (Eppendorf *MiniSpin*) zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde in 100 µL Überstand resuspendiert, dieser auf einer LB/Amp-Agarplatte ausgestrichen und ü.N. bei 37°C inkubiert. Nur die stabil transformierten Bakterien mit der Resistenz gegen Ampicillin konnten auf der Platte wachsen. Die Bakterienkolonien wurden anschließend in einer Kolonie-PCR eingesetzt (↪ 3.2.1).

### **3.8 Präparation und Konzentrationsbestimmung von Plasmid-DNA**

Je nach Anwendung wurden verschiedene Verfahren zur Plasmidpräparation eingesetzt, die DNA verschiedener Menge und Reinheit ergaben.

#### **3.8.1 Plasmid-, „Mini“-Präparation von DNA**

Für die Präparation kleiner Mengen Plasmid-DNA wurde der *QIAprep*<sup>TM</sup> Miniprep Kit (Qiagen) verwendet. Dazu wurde der entsprechende Klon in 2 mL LB/Amp-Medium ü.N. bei 37°C und 240 rpm im Schüttelinkubator angezogen. 1,5 mL der Über-Nacht-Kultur wurden für 1 min in einer Eppendorf *MinSpin* zentrifugiert. Die sedimentierten Bakterien wurden in 250 µL Resuspensionspuffer P1 (50 mM Tris-HCl pH 8,0 / 10 mM EDTA) resuspendiert, mit 250 µL Lysepuffer P2 (200 mM NaOH / 1% SDS) versetzt, durch mehrmaliges Invertieren gemischt und maximal 5 min bei RT inkubiert. Das Zelllysate wurde mit 350 µL Neutralisierungspuffer P3 (3 M Kaliumacetat pH 5,5) neutralisiert. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei RT (13000 rpm, Eppendorf *MiniSpin*) wurde der Überstand auf die

mitgelieferten Silikagel-Säulen gegeben und für 1 min bei RT zentrifugiert (13000 rpm, Eppendorf *MiniSpin*). Das Eluat wurde verworfen und die gebundene Plasmid-DNA mit 750  $\mu\text{L}$  des Ethanol-haltigen Puffers PE gewaschen. Anschließend wurde die DNA mit 50  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O eluiert. Zur Kontrolle wurden 2  $\mu\text{L}$  der DNA-Lösung auf einem Agarosegel analysiert (☞3.5.1).

### 3.8.2 Plasmid-„Midi“-Präparation von DNA

Zur Präparation größerer Plasmidmengen (einige hundert  $\mu\text{g}$ ) wurde mit dem *HiSpeed*<sup>TM</sup> MidiPrep Kit (Qiagen) eine 200 mL-Übernachtskultur transformierter *E. coli* aufgearbeitet. Gemäß Herstellerprotokoll wurde nach alkalischer Lyse die DNA über die mitgelieferten Ionenaustauschersäulen aufgereinigt. Die Puffer P1-P3 entsprechen denen des *QIAprep*<sup>TM</sup> Miniprep Kit (☞3.8.1). Die Übernachtskultur wurde in 50 mL-Plastikröhrchen verteilt und 10 min bei 4°C und 4000 rpm (Eppendorf Tischzentrifuge *5810R*) zentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstandes wurde das Pellet in insgesamt 6 mL P1 resuspendiert, mit 6 mL Lysepuffer P2 versetzt, durch mehrmaliges Invertieren gemischt und maximal 5 min bei RT inkubiert. Das Zellysate wurde mit 6 mL P3 durch mehrmaliges Invertieren neutralisiert. Das Lysat wurde auf eine mitgelieferte Filterkartusche gegeben, in denen sich das Zellmaterial während einer 10-minütigen Inkubation absetzen konnte. Anschließend wurde das Lysat durch den Filter direkt auf die mitgelieferten, mit 4 mL Äquilibrierungspuffer QBT (750 mM NaCl / 50 mM MOPS pH 7,0 / 15 % (v/v) Isopropanol / 0,15 % (v/v) Triton X-100 ) äquilibrierten Silikagel-Säule gedrückt. Die Säule wurde mit 20 mL Waschpuffer QC ( 1 M NaCl / 50 mM MOPS pH 7,0 / 15 % (v/v) Isopropanol) gewaschen und die DNA mit 5 mL Elutionspuffer QF (1,15 M NaCl / 50 mM Tris-HCl pH 8,5 / 15 % (v/v) Isopropanol) von der Säule eluiert. Anschließend wurde die DNA mit 3,5 mL Isopropanol 5 min bei Raumtemperatur präzipitiert und durch den *QIAprecipitator*<sup>TM</sup>-Filter gedrückt. Die DNA wurde mit 1 mL TE-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 8,0 / 1 mM EDTA) von dem Filter eluiert.

### 3.8.3 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentration und Reinheit einer DNA-haltigen Probe kann photometrisch bestimmt werden. Das durchschnittliche Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren liegt bei einer Wellenlänge von 260 nm und das durchschnittliche Absorptionsmaximum von Proteinen bei einer Wellenlänge von 280 nm. Aus dem Quotient von E260/E280, der über 1,7 liegen sollte, kann auf den Reinheitsgrad der DNA geschlossen werden. Die Extinktion bei 260 nm gibt Auskunft über die Konzentration der DNA einer Probe. Eine Extinktion von 1,0 entspricht 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  doppelsträngiger DNA.

Für die Messung wurden 1  $\mu\text{L}$  der Probe 1:100 mit TE-Puffer verdünnt. Nach dem Abgleich der Quarzküvette mit 100  $\mu\text{L}$  TE-Puffer als Leerwert wurde die Extinktion der DNA-Lösung bei 260 nm und 280 nm gemessen.

### 3.8.4 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von Plasmiden wurde von der Firma GATC durchgeführt. Dafür wurden insgesamt acht Sequenzierungs-Primer verwendet, vier Sense- und vier Antisense-Primer (☞2.6). Die Reichweite der Sequenzierungs-Primer sollte  $\geq 200$  bis 300 bp betragen, damit die verwendeten Primer bei der Sequenzierung das gesamte CD22<sub>d1-3</sub>-Fragment abdecken konnten.

## 3.9 Herstellung stabiler Zelllinien

### 3.9.1 Anzucht eukaryotischer adhärenter Zellen

Die CHO-K1-Zellen wurden in H<sub>2</sub>O gesättigter Atmosphäre bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Begasungs-Wärmeschrank in  $\alpha$ MEM-Medium mit 10 % (v/v) hitzeinaktiviertem FCS kultiviert. Wenn die Zellen 90 % des Zellkulturschalenbodens bedeckten (zu 90 % konfluent sind), wurden sie auf mehrere Zellkulturschalen verteilt. Dazu wurden die Zellkulturschalen mit PBS gewaschen und 1 mL Trypsin-EDTA-Lösung (pro 100 mm Platte) auf die Zellen gegeben. Der Überstand wurde sofort wieder abgesaugt und die Zellkulturschalen für 2-5 min im Wärmeschrank inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in 10 mL Kulturmedium resuspendiert und gleichmäßig auf die mit Medium vorbereiteten Zellkulturschalen verteilt.

Zur Aufbewahrung von eukaryotischen Zellen wurden DMSO-Gefrierkulturen angelegt. Dafür wurden 90 % konfluent gewachsene Zellen trypsinisiert, in 2 mL Gefriermedium bestehend aus dem Zellkulturmedium, 20 % FCS und 10 % (v/v) DMSO resuspendiert. Je 1 mL dieser Zellsuspension wurde in 1,5 mL-Einfrierröhrchen überführt und erst 30 min bei 4°C, dann mindestens 12 h bei -80°C und letztendlich in flüssigen Stickstoff eingefroren.

### 3.9.2 Immunglobulin-Depletion

Um zu vermeiden, dass die Immunglobulin aus dem FCS (im Medium) mit den Fc-Chimären aufgereinigt wurden und das produzierte Protein verunreinigen, erfolgte eine zweifache Immunglobulin-Depletion. Das Kulturmedium mit 20 % FCS wurde dazu ü.N. mit Protein A-Sepharose inkubiert und außerdem über eine Protein A-Sepharose-Säule depletiert. Protein A ist ein aus *Staphylococcus aureus* isoliertes Protein, welches spezifisch und mit starker Affinität an den Fc-Teil von Antikörpern bindet (Bebbington, 1991).

### 3.9.3 Stabile Transfektion

Bei der stabilen Transfektion wird die cDNA eines Plasmids stabil in das Genom der transfizierten Zellen integriert und kann von diesen Zellen dauerhaft exprimiert werden. CHO-Zellen sind einfach zu transfizieren, wachsen sowohl in Suspension als auch adhären auf Plastikoberflächen und es gibt eine Reihe etablierter Expressionssysteme mit Selektionsmarkern, die zur Markierung der Vektoramplifikation dienen (Bebbington, 1991).

Die stabil zu transfizierende cDNA enthielt neben den für CD22<sub>d1-3</sub>-(3c)-Fc kodierenden Sequenzen ein Resistenzgen als Insertionsmarker. Bei dem Resistenzgen handelte es sich um die Hygromycin B Phospho-Transferase (HygR). Nur stabil transfizierte CHO-Zellen konnten aufgrund ihrer endogenen Hygromycin B Phospho-Transferase (HygR)-Aktivität bei Zugabe des Antibiotikums Hygromycin überleben. Die stabil zu transfizierten Zellen wurden in  $\alpha$ MEM mit 10 % FCS kultiviert, bis sie zu 70-80 % konfluent waren. Vor Zugabe des Transfektionsmix wurde das Medium entfernt und die Zellkulturschalen einmal mit PBS gewaschen.

Die Transfektion wurde mit dem kationischen Polymer *ExGen500* (MBI Fermentas) durchgeführt. Dieses Reagenz bildet mit der DNA Komplexe, die sich durch die Schwerkraft auf den Zellen absetzen und durch Endozytose von der Zelle absorbiert werden. Für konfluente Zellen auf einer 150 mm Zellkulturschale wurden 58  $\mu$ g DNA-Lösung auf ein Volumen von 2,9 mL mit sterilem 150 mM NaCl aufgefüllt, vorsichtig gemischt und zentrifugiert (Herstellerangaben). Anschließend wurden 192  $\mu$ L *ExGen500* zugefügt, 10 sec gemischt und für 10 min inkubiert. Der Transfektionsansatz wurde mit 29 mL serumfreien  $\alpha$ MEM aufgefüllt und auf die zu transfizierenden Zellen gegeben. Nach 3-4 h wurde der Transfektionsansatz abgenommen und durch 30 mL Kulturmedium mit 1-fach konzentriertem Penicillin/Streptomycin ersetzt. Letzteres diente dazu, Kontaminationen durch die unsterile DNA vorzubeugen.

#### **3.9.4 Selektion und Anzucht stabil transfizierter Zellen**

Am folgenden Tag wurden die Zellen trypsinisiert und in 5 mL Medium resuspendiert. Zur Bestimmung der Zelldichte wurde die Zellsuspension in eine Neubauer-Zählkammer unter das Deckgläschen pipettiert. Mehrere Großquadrate wurden im Phasenkontrastmikroskop ausgezählt. Die Zahl der Zellen pro mL ergibt sich durch Multiplikation des Mittelwertes der Großquadrate mit  $10^4$ . Die Zellen wurden auf eine Dichte von 500.000 Zellen/mL mit dem Kulturmedium mit 1-fach Pen/Strep eingestellt.

Zum Selektionieren der erfolgreich transfizierten Zellen wurde Hygromycin mit einer Endkonzentration von 350  $\mu$ g/mL dazugegeben. Anschließend wurden die Zellen mit 100  $\mu$ L pro Well auf eine sterile 96-Well-Zellkulturplatte gegeben, wobei die äußeren Reihen mit Kupfersulfat-Lösung als Kontaminationsschutz befüllt wurden. Nach 3-5 Tagen wurde kontrolliert, ob in nennenswertem Umfang Zelltod eingetreten war. Wöchentlich wurden 50  $\mu$ L Medium pro Well entnommen und 100  $\mu$ L frisches Kulturmedium hinzugefügt. Dabei wurde die Hygromycin-Endkonzentration von 350  $\mu$ g/mL schrittweise auf 600  $\mu$ g/mL erhöht.

Nach 2-3 Wochen wurden die Platten nach Hygromycin-resistenten Zellpopulationen durchgemustert. Die stabil transfizierten konfluenten Zellen mit der größten Hygromycinresistenz wurden trypsinisiert und zunächst auf 6-Well-Zellkulturplatten angezogen, bis sie auf Zellkulturplatten (100mm) kultiviert werden konnten. Die



Hygromycinkonzentration wurde dabei auf 200 µg/mL gesenkt. Zur Aufbewahrung der stabil transfizierten Zelllinien wurden DMSO-Gefrierkulturen angelegt (☞3.9.1).

### **3.10 Expression, Aufreinigung und Nachweis von CD22-Fc-Chimären**

#### **3.10.1 Expression von rekombinanten Fc-Chimären auf Zellkulturschalen**

Die stabil transfizierten Zellen wurden auf die gewünschte Plattenanzahl angezogen bis sie zu 70 % konfluent waren. Für die Expression der Fc-Chimären wurden die Zellen zunächst gut mit PBS gewaschen, um IgG-haltiges FCS zu entfernen, und danach in IgG-depletiertem FCS-haltigem Kulturmedium 2-3 Tage kultiviert. Die Menge an FCS wurde auf 1-2 % gesenkt, um ein Überwachsen der Zellen zu verhindern. Nach 2-3 Tagen wurde der Überstand abgenommen und frisches Medium hinzugefügt. Die Prozedur wurde ein weiteres Mal wiederholt. Die entnommenen Zellsuspensionen wurden mit 1 M HEPES auf eine Endkonzentration von 20 mM HEPES pH 7,4 eingestellt, 10 min bei 900 rpm (Eppendorf Tischzentrifuge 5810R) zentrifugiert und der Überstand über ein Sterilfilter (0,2 µM) gegeben, um alle Zellen und Kontaminanten zu entfernen. Die Überstände werden gegebenenfalls bei -20°C bis zur Aufreinigung gelagert. Die erfolgreiche Expression der CD22-Fc-Chimären wurde mittels Sandwich-ELISA (☞3.10.3), Festphasentest (☞3.10.4) oder Immunoblot (☞3.15.4) nachgewiesen.

#### **3.10.2 Expression von rekombinanten Fc-Chimären in Fermentern**

Zur Steigerung der Expression der CD22-Fc-Chimären wurden diese in *Cellline CL350* oder *CL1000*-Fermentern (Integra) kultiviert. Diese bestehen aus einem Nährstoffversorgungsraum mit 350 mL oder 1000 mL Volumen, welches mit Kompletmedium ohne Serum (αMEM / 1-fach Pen/Strep / 200 µg/mL Hygromycin) beschickt wurde und einer Kultivierungskammer, in der die Zellen in Suspension in serumhaltigen Kompletmedium (αMEM / 5 % IgG-depletiertes FCS / 1-fach Pen/Strep / 200 µg/mL Hygromycin ) kultiviert wurden. Beide Kammern sind durch eine Membran voneinander getrennt, durch die der Nährstoffaustausch erfolgen kann.

Zur Inokulation sollten nur Zellen mit maximaler Vitalität verwendet werden und die Zell-Mindestkonzentration  $1,5 \times 10^6$  Zellen betragen, was vier konfluenten 150 mm bzw. acht konfluenten 100 mm Zellkulturschalen entspricht. Die Inokulation wurde nach Angabe des Herstellers durchgeführt und die Zellen 7 Tage zur Anzucht kultiviert. Anschließend wurde in der Regel alle drei Tage 2,5 mL (*CL350*) oder 7,5 mL (*CL1000*) Zellsuspension entnommen und durch das gleiche Volumen an serumhaltigen Kompletmedium ersetzt. Das Nährmedium des Nährstoffversorgungsraums wurde alle 14 Tage vollständig erneuert. Zur Expressionskontrolle wurde regelmäßig ein Sandwich-ELISA durchgeführt.

Die entnommenen Zellsuspensionen wurden mit 1 M HEPES pH 7,4 auf eine Endkonzentration von 20 mM HEPES pH 7,4 eingestellt. Sie wurden 10 min bei 900 rpm

zentrifugiert (Eppendorf Tischzentrifuge *5810R*) und der Überstand über ein Sterilfilter (0,2  $\mu\text{M}$ ) gegeben, um nicht-adhärenente Zellen und andere Bestandteile zu entfernen, die die Protein A-Sepharose-Säule verstopfen könnten. Die Überstände wurden bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert und bis zur Aufreinigung gesammelt.

### 3.10.3 Quantitativer Sandwich-ELISA zum Nachweis produzierter Fc-Chimären

Aufgereinigte Proteine oder Zellkulturüberstände von CD22-Fc-Chimären wurden in einem Sandwich-ELISA mit Antikörpern gegen den humanen Fc-Teil nachgewiesen.

Die Angaben beziehen sich immer auf ein Well einer Mikrotiterplatte. Nach jedem Inkubationsschritt wurde der Überstand verworfen und dreimal mit HBA gewaschen. Zunächst wurde die Platte ü.N. bei  $4^{\circ}\text{C}$  oder 2 h bei RT mit 50  $\mu\text{L}$  einer Anti-huIgG-Lösung (1. Antikörper  $\varphi$  2.1.3) beschichtet. Die verbleibenden Bindungsstellen wurden mit 100  $\mu\text{L}$  einer 5-%igen Magermilchpulverlösung in HBS für 1 h bei  $37^{\circ}\text{C}$  blockiert. Es wurden 50  $\mu\text{L}$  CD22-Fc-Lösung in einer 1:2 Verdünnungsreihe ausgehend von 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in HBA als Eichreihe eingesetzt. Als Negativkontrolle diente 50  $\mu\text{L}$  HBA. Die Zellkulturüberstände stabiler Zelllinien wurden mindestens 1:10 vorverdünnt, bevor eine 1:2 Verdünnungsreihe gemacht wurde. Für jede Verdünnung/Konzentration der Fc-Chimäre wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt. Die Fc-Chimären sollten während der einstündigen Inkubation bei  $37^{\circ}\text{C}$  über den Fc-Teil gerichtet an die immobilisierten Antikörper binden. Ungebundene Fc-Chimären wurden durch Waschen entfernt und 50  $\mu\text{L}$  einer Anti-huIgG-AP-Lösung (2. konjugierter Antikörper  $\varphi$  2.1.3) für 1 h bei  $37^{\circ}\text{C}$  hinzugegeben und anschließend gewaschen. Die verbleibende, gebundene Menge des Anti-huIgG-AP ist der Menge der Fc-Chimären direkt proportional und kann durch Zugabe eines Enzymsubstrats bestimmt werden. Dazu wurden 100  $\mu\text{L}$  NPP-Lösung (0,8 mg/mL 4-Nitrophenol-Phosphat Dinatriumsalz in 0,1 M Glycin pH 10,4 / 1 mM  $\text{MgCl}_2$ ) eingesetzt und 30 min bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert.

NPP wird von der alkalischen Phosphatase dephosphoryliert und zu dem gelb gefärbten Produkt Nitrophenol umgesetzt. Die Intensität der Färbung wurde bei 405 nm im Mikrotiterplatten-Photometer *Multiscan Ascent* (Thermo LifeSciences) gemessen und die Konzentration der Proben anhand der erstellten Eichgeraden bestimmt.

### 3.10.4 Festphasenbindungstest mit Erythrozyten zum Siglec-Fc Nachweis

Die Sialinsäure-spezifische Bindung der CD22-Fc-Chimären wurde durch einen Festphasenbindungstest mit humanen Erythrozyten als Zielzellen überprüft, deren Zelloberflächenglykane  $\alpha$ 2,3- und  $\alpha$ 2,6-verknüfte Sialinsäuren tragen. Dazu wurde einer Mitarbeiterin Blut mit einer Serummonovette entnommen, die Citrat als Gerinnungshemmer enthielt. Das Blut-Citratgemisch wurde für 10 min bei 2000 rpm in einer Eppendorf Tischzentrifuge *5810R* zentrifugiert. Das Plasma und die Leukozytenschicht wurden abgesaugt, das Erythrozytenpellet dreimal mit HBS gewaschen und zur Lagerung bei  $4^{\circ}\text{C}$  in AoAB (Aelsevier's Medium ohne Antibiotika: 7,94 g Natriumcitrat / 4,5 g NaCl / 20,56 g

Glukose pH 6,1 ad 1 L ddH<sub>2</sub>O) resuspendiert, welches täglich gewechselt werden musste.

Als Kontrolle für eine unspezifische, nicht Sialinsäure-abhängigen Bindung wurden Erythrozyten eingesetzt, deren Sialinsäuren mit dem Enzym Sialidase aus *Vibrio cholerae* (VCS) entfernt wurden. Für die VCS-Behandlung wurden 190 µL gepackte (vorher zentrifugierte) humane Erythrozyten dreimal mit HBA mit 2 mM CaCl<sub>2</sub> gewaschen und anschließend in 310 µL HBA-Calcium (HBA/2mM CaCl<sub>2</sub>) mit 40 mU/ml (40 µL) VCS aufgenommen und für 3 h bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen dreimal im 5-fachen Volumen HBA gewaschen und zur Lagerung in AoAB resuspendiert.

Der Festphasentest wurde identisch zu dem Protokoll des Sandwich-ELISA durchgeführt (☞3.10.3). Statt des sekundären Antikörpers wurde nach der Inkubation der CD22-Fc-Chimären 50 µL einer 0,5-%igen Erythrozytensuspension in HBA hinzugegeben (pro Antigen und Konzentration zwei Wells). Als Negativkontrolle dienten VCS-behandelte Erythrozyten (pro Antigen und Konzentration ein Well). Es wurde 1 h bei RT inkubiert. Ungebundene Erythrozyten wurden durch vorsichtiges Schütteln der Platte resuspendiert und mit dem Überstand abgesaugt. Die gebundenen Erythrozyten wurden durch Zugabe von 100 µL 0,25-%igen Glutardialdehydlösung in HBS unter leichtem Schütteln der Platte fixiert. Nach der Fixierung wurden die Wells zweimal mit HBA gewaschen und die Platte unter dem Mikroskop betrachtet.

Bei guter Bindung werden die Erythrozyten „Pflasterstein-artig“ von dem immobilisierten CD22-Fc gebunden. Bei den VCS-behandelten Erythrozyten sollten keine Zellen gebunden haben, da es sich um eine Sialinsäure-abhängige Bindung handelt.

### **3.10.5 Aufreinigung von rekombinanten Fc-Chimären**

Bei CD22-Fc wird der Transmembrananker nicht mehr exprimiert. Ohne den Membrananker wird das Protein von den Zellen in den Zellkulturüberstand abgegeben und kann aus diesem isoliert werden. Der Fc-Teil bindet mit hoher Affinität an Protein A und kann selektiv und quantitativ aus dem Zellkulturüberstand entfernt werden.

Der Zellkulturüberstand wurde aufgetaut und zum Schutz vor Kontaminationen mit 0,02 % (v/v) Azid versetzt. Der Zellkulturüberstand wurde dann bei 4°C mit einer Flussrate von 200 mL pro Stunde über eine mit Protein A-Sepharose gepackte Säulenkartusche mit 1 mL Säulenvolumen gegeben, die vorher mit PBS äquilibriert worden war. Anschließend wurde die Säule mit 100 mL PBS gewaschen, um Reste an Medium zu entfernen. Durch 0,1 M Glycin pH 3 wurde das Protein in zwanzig 500 µL-Fraktionen (10-fache des Säulenvolumens) mittels pH-Schock eluiert. Um Konformationsänderungen des Proteins durch den pH-Schock zu verhindern, wurden je 30-50 µL 1 M Tris-HCl pH 8,0 in den Fraktionsgefäßen vorgelegt, so dass die Lösung sofort abgepuffert wurde. Durch Messung der OD bei 280 nm wurde kontrolliert, in welche Fraktionen das Protein eluiert wurde. Die proteinenthaltene Fraktionen wurden vereinigt, mit 0,02 % (v/v) Azid versetzt und anschließend dialysiert.

### 3.11 Dialyse und Bestimmung der Proteinkonzentration mit dem BCA-Test

Für die Dialyse wurde 10 cm Dialyseschlauch in dreimal je 500 mL des entsprechenden Puffers in drei Schritten, 30 min, 2 h und ü.N., bei 4°C unter Rühren dialysiert, um das Konzentrationsgefälle zu erhalten. Die Proteine wurden nach der Dialyse steril entnommen und bei 4°C gelagert.

Mit Hilfe des BCA-Proteintest auf der Basis von Bichinchoninsäure wird die Proteinmenge einer Proteinlösung anhand einer BSA-Eichreihe mit Konzentrationen von 0,025 bis 2,0 mg/mL bestimmt. Dazu wurden 5 µL Proteinlösung als Doppelbestimmungen in die Wells einer Mikrotiterplatte pipettiert. Es wurden 100 µL des Reaktionsgemisch aus dem BCA-Kit hinzugegeben, der Ansatz kurz auf einem Mikrotiterplattenschüttler durchmischt und bedeckt 30 min Stunde bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Extinktion bei 562 nm im Photometer Multiscan Ascent (Thermo LifeSciences) gemessen und mittels der BSA-Eichreihe die Proteinkonzentration der Proben bestimmt.

### 3.12 Desialylierung von Glykoproteinen

Um Sialinsäuren von Glykoproteinen/-peptiden zu entfernen, wurden die Sialinsäuren entweder enzymatisch durch die *Vibrio cholerae* Sialidase (VCS) oder in Anwesenheit von HCL hydrolytisch (saure Hydrolyse, sH) von den sialylierten Glykoproteinen/-peptiden abgespalten.

Für die saure Hydrolyse wurden die Proben mit 5 M HCL auf 0,1 M HCL eingestellt und 1 h bei 80°C hydrolysiert. Anschließend wurden die Proben mit 5 M NaOH neutralisiert. Eine Hitzekontrolle wurde analog dazu aber ohne HCL-Zugabe durchgeführt.

Für die enzymatische Behandlung wurde eine matrixgebundene *Vibrio cholerae* Sialidase *GlycoCleave*® (GALAB) eingesetzt, um das Enzym nach dem Verdau von den Glykoproteinen/-peptiden trennen zu können. Die Glykoproteine/-peptide wurden in VCS-Puffer (50 mM Natriumacetat pH 5,5 / 9 mM CaCl<sub>2</sub> / 154 mM NaCl) aufgenommen und auf 37°C erwärmt. 50-100 µL *GlycoCleave*®VCS wurden in einem 1,5 mL-Reagiergefäß dreimal mit warmen VCS-Puffer gewaschen und anschließend mit der Glykoprotein/-peptid-Probe versetzt. Der Verdau wurde 1-4 h bei 37°C unter Rühren durchgeführt. Alternativ konnte der Verdau auch in HBS mit 2-9 mM CaCl<sub>2</sub> durchgeführt werden. Die *GlycoCleave*®VCS wurde durch Zentrifugation (2000 rpm Eppendorf *MiniSpin*) von den Glykoproteinen/-peptiden getrennt. Die Probe wurde abgenommen. Die *GlycoCleave*®VCS wurde durch mehrmaliges Waschen mit VCS-Puffer regeneriert und in diesem bei 4°C mit 0,02 % Azid gelagert.

Um die freien Sialinsäuren zu entfernen und die Probe in einem anderen Puffer aufzunehmen, wurde anschließend eine Aceton-Präzipitation der Probe durchgeführt.

### 3.13 Proteinkonzentration durch Aceton-Präzipitation

Für die Aceton-Fällung wurden max. 250 µL Probe mit dem 4-fachen Volumen an eiskaltem (-20°C) Aceton versetzt und 1-24 h bei -20°C gefällt. Anschließend wurde 15 min bei 0°C und 14000 rpm (Eppendorf Tischzentrifuge 5810R ) zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde das Aceton zügig mit einer ausgezogenen Pasteurpipette abgezogen und das Pellet sofort mit einem Puffer resolubilisiert.

### 3.14 Auftrennung von Proteinen

#### 3.14.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Die SDS-PAGE wurde in Minigelapparaturen mit dem Puffersystem (Tris-Glycin-HCl) nach Laemmli (Laemmli, 1970) unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt.

Die Volumina des folgenden Pipettierungsschemas beziehen sich auf zwei 1 mm Mini-Gele.

10 mL Trenngellösung 8-15-%ig (v/v)	4 mL Sammelgellösung 4-%ig
2,5 mL 4-fachTrenngelpuffer (1,5 M Tris-HCl pH 8,7 mit 0,4 % SDS)	1 mL 4-fach Sammelgelpuffer (0,5 M Tris-HCl pH 6,8 mit 0,4 % SDS)
8-15% Acryl-/Bisacrylamid (aus 30-%igem Acryl-/Bisacrylamid 37,5:1)	533 µL (aus 30-%igem Acryl-/Bisacrylamid
ad 10 mL ddH <sub>2</sub> O	2,46 mL ddH <sub>2</sub> O
Die Polymerisationskatalysatoren wurden kurz vor dem Gebrauch hinzugefügt.	
5 µL TEMED	4,2 µL TEMED
50 µL 10-%ige (w/v) APS-Lösung	21µL 10-%ige (w/v) APS-Lösung

Die vorbereiteten Proben enthielten je nach Anwendung 1-10 µg Protein in einem Volumen bis zu 10 µL. Sie wurden mit dem gleichen Volumen an 2-fach reduzierendem Probenpuffer (125 mM Tris-HCl pH 6,8 / 20% (w/v) Glycerol / 0,05 % (w/v) Bromphenolblau / 4% (w/v) SDS / 10mM DTT) versetzt und für etwa 5 min bei 95°C erhitzt. Die Minigele wurden mit den denaturierten Proteinen und einem Molekulargewichtsstandard beladen. Die SDS-PAGE wurde in einer Elektrophoresekammer mit Elektrophorese-Laufpuffer (25 mM Tris / 192 mM Glycin / 0,1 % (v/v) einer 10-%igen (w/v) SDS-Lösung) mit 15 mA pro Mini-Gel für 1-1,5 h durchgeführt. Für die SDS-PAGE nach einer IEF oder vor dem Westernblotting wurden vorgefärbte (*prestained*) Proteinstandards benutzt. Nach der erfolgten Auftrennung der Proteine wurde das Trenngel abhängig von der Detektionsmethode in einer entsprechenden Lösung in einer Plastikschaale äquilibriert.

#### 3.14.2 Zweidimensionale SDS-PAGE (2D-PAGE)

Die Kombination der isoelektrischen Fokussierung (IEF) mit der SDS-PAGE ermöglicht es, komplexe Mischungen von Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt (pI) effektiv zu trennen. Die IEF wurden mit auf Folie-polymerisierten Flachgelen mit einem immobilisierten pH-Gradienten, den IPG (pre-cast immobilized pH gradient gel)–Streifen, in der *PROTEAN*®

IEF-Anlage (BIO-RAD) durchgeführt. Anschließend wurden die Proteine auf den IPG-Streifen nach ihrem Molekulargewicht mittels SDS-PAGE aufgetrennt.

### 1. Dimension – horizontale IEF mit immobilisierten pH-Gradienten

Die zweidimensionale Elektrophorese mit immobilisierten pH-Gradienten wurde nach Görg et al. (Görg, 1988) durchgeführt. Für eine IEF mit anschließender SDS-PAGE mit Minigelen wurden 7 cm IPG-Streifen mit einem pH-Bereich von 3-10 verwendet. Die Probe mit 30-200 µg Protein durfte aufgrund der verwendeten Lösungen ein Maximalvolumen von 2,5 µL haben oder musste Aceton-präzipitiert sein. Letzteres hatte den Vorteil, dass keine Salze aus dem Puffer in der IEF stören konnten. Die Temperatur aller Lösungen durfte nicht mehr als 29°C betragen, da sonst Proteinschädigungen durch Carbamylierungen des Harnstoffs auftreten konnten.

Die Probe wurde in einem Endvolumen von 125 µL IEF-Rehydrierungs-Probenpuffer gelöst.

#### Stammlösung IEF-Rehydrierungs-Probenpuffer (für vier Proben)

8,5 % (w/v) Harnstoff

4,255 % (w/v) CHAPS

470 µL Aliquots, ausreichend für vier Proben, wurden bei -20°C gelagert.

Vor der Benutzung wurden folgende Komponenten hinzugefügt.

10 µL DTT (2,5 M Lösung, -20°C)

5 µL Trägerampholyt-Lösung pH 3-10 (100-fach Bio-Lyte® BIO/RAD)

5 µL Bromphenolblau-Lösung (0,02-%ige (w/v) Lösung)

122,5 µL

122,5 µL des fertigen Puffers wurde mit 2,5 µL Probe gemischt oder mit ddH<sub>2</sub>O auf 125 µL aufgefüllt und damit das Proteinpellet einer Aceton-Präzipitation resolubilisiert.

Die Probe wurde in die Mitte der Fokussierungskammer-Vertiefungen pipettiert und der IPG-Streifen mit der Gelseite zur Probe „U“-förmig abgelegt und 1 h inkubiert, anschließend mit Mineralöl bedeckt und das Programm für die IEF gestartet.

#### Lineare Spannungssteigerung und 20°C

S0	Aktive Rehydrierung	50 µA für 12 h
S1	Konditionierungsschritt	250 Volt für 15 min
S2	Spannungssteigerung	250 Volt auf 4000 Volt in 2 h
S3	Finale Fokussierung	bei 4000 Volt 20000 Volt-Stunden (5 h)
S4	Halten	bei 500 Volt

Nach der erfolgten IEF wurden die Streifen direkt für die 2. Dimension vorbereitet oder in einem Inkubationsschlitten der *PROTEAN*® IEF-Anlage (BIO-RAD) bei -20°C gelagert.

### 2. Dimension : vertikale SDS-PAGE

Für die 2. Dimension der 2D-PAGE wurden ausschließlich 1 mm dicke Minigele verwendet, die am Tag zuvor gegossen worden waren. Die 8-15-%igen Trenngele wurden bis 0,8-1 cm unter den Rand der kleinen Glasplatte gegossen, ein Sammelgel wurde nicht verwendet. Für

zwei 1 mm Minigele wurden 12 mL Trenngellösung benötigt (☞ 3.14.1). Für eine höhere Reproduzierbarkeit wurden die Minigele in einer Mehrfach-Gießkammer nach Angaben des Herstellers gegossen. Die 100 mL Trenngellösung für 10 Minigele wurde ohne Aktivatoren 15 min unter Vakuum entgast. Anschließend wurden die Gele mit Wasser-gesättigtem Butanol überschichtet, um eine glatte Oberfläche zu erhalten.

Um die fokussierten Proteine zu solubilisieren und das Beladen von SDS für die 2. Dimension zu ermöglichen, wurden die IPG-Streifen in einem SDS-haltigen Puffer äquilibriert. Dieser Schritt erfolgt analog zu dem Aufkochen von Proteinproben mit Probenpuffer bei der 1D-SDS-PAGE.

#### Äquilibrierungspuffer Stammlösung (AP)

6 M Harnstoff

2 % (v/v) SDS (einer 10-%igen (w/v) Lösung)

0,05 M Tris-HCl pH 8.7

20% (v/v) Glycerol

Aliquots zu 10ml wurden bei -20°C gelagert.

Äquilibrierungspuffer 1 (AP 1)

0,2 g DTT zu 10 mL AP

Äquilibrierungspuffer 2 (AP 2)

0,25 g Iodacetamid zu 10 mL AP

Jeder IPG Streifen wurde im Inkubationsschlitten zuerst 10 min mit 2,5 mL AP1, dann 10 min mit 2,5 mL AP2 inkubiert. Nach der Äquilibrierung wurde der Plastiküberhang bei pH 3 des Streifens vorsichtig verkürzt und mit der Plastikseite zur größeren Glasplatte luftblasenfrei auf dem Trenngel positioniert. Der Proteinstandard wurde auf ein Stück Filterpapier aufgetragen, neben pH 10 des IPG-Streifens positioniert und beides mit einer 0,5-%igen (w/v) Agaroselösung in SDS-Laufpuffer mit 0,005 % (v/v) Bromphenolblau auf dem Trenngel fixiert. Die Elektrophorese wurde bei 15 mA pro Gel für ca. 1 bis 1,5 h durchgeführt, bis die Bromphenolblau-Lauffront das untere Ende des Gels erreicht hatte.

Nach der Detektion der Proteine oder Glykoproteine stellen sich die aufgetrennten Proteine als sogenannte Spots da. Ihre Position im 2D-Polyacrylamidgel ergibt über die Angabe des Molekulargewichts (Mw) und des isoelektrischen Punkts (pI) bzw. bei Heterogenitäten über Mw- oder pI-Bereiche des Proteins.

### **3.15 Detektion von Proteinen**

#### **3.15.1 Färbung mit Coomassie-Brilliantblau**

Die Proteine im Trenngel können mit Coomassie *Brilliant Blue G250* (SERVA-Blue R; SERVA Heidelberg) einem Triphenylmethan-Farbstoff gefärbt werden. Dieser bindet unspezifisch an kationische und unpolare hydrophobe Seitenketten der verschiedenen Aminosäuren der Proteine.

Coomassie-Brilliantblau-Lösung	Coomassie-Entfärbelösung
0,5 % (w/v) SERVA blue R	
40 % (v/v) Methanol	40 % (v/v) Methanol
10 % (v/v) Essigsäure	10 % (v/v) Essigsäure
Lösung über einem Faltenfilter gefiltert.	Lösung durch Aktivkohlefilter regenerierbar.

Zuerst wird das Trenngel in ddH<sub>2</sub>O gewaschen, um SDS zu entfernen, dann für 5-30 min in Coomassie-Brilliantblau-Lösung inkubiert, überschüssiges Coomassie entfernt, das Trenngel kurz in ddH<sub>2</sub>O gewaschen, bevor es mit der Entfärbelösung schrittweise entfärbt wurde. Dabei wurde zum Teil der letzte Entfärbeschritt in ddH<sub>2</sub>O durchgeführt, um eine maximal möglichen Reduktion der unspezifischen Hintergrundfärbung zu erhalten.

In späteren Versuchen wurde auf die Coomassie-basierende Proteinfärbelösung PageBlue™ von MBI Fermentas umgestellt, deren Sensitivität höher war und die kein Methanol enthielt. Entfärbt wurde mit ddH<sub>2</sub>O.

Nach der Coomassie-Färbung wurde bei geringen Intensitäten und ohne nachfolgender massenspektrometrischer Analyse eine Silberfärbung durchgeführt.

### 3.15.2 Silberfärbung von SDS-Gelen

Die Silberfärbung von Proteinen basiert auf einer chemischen Reduktion von Silberionen auf einer Proteinbande. Die Silberfärbung wurde mit Glutardialdehyd nach Heukeshoven und Dernick (Heukeshoven et al., 1988) durchgeführt.

Die Volumina beziehen sich auf die Färbung von zwei Minigelen.

Fixierlösung (entfällt bei Coomassie-Färbung)	30 % (v/v) Ethanol 10 % (v/v) Essigsäure
50 mL Natriumthiosulfat-Lösung für 30 min inkubieren	0,2 % (w/v) Natriumthiosulfat x 5H <sub>2</sub> O 0,5 M Natriumacetat x 3H <sub>2</sub> O 30 % (v/v) Ethanol 0,5 % (v/v) Glutardialdehyd (25-%ige (w/v) Lösung)
dreimal 20 min in ddH <sub>2</sub> O wässern.	
50 mL Silbernitrat-Lösung für 30 min inkubieren	0,1 % (w/v) Silbernitrat 0,02 % (v/v) Formaldehyd (37-%ige (w/v) Lösung)
Die Gele dreimal zügig mit ddH <sub>2</sub> O waschen.	
50 mL Entwicklerlösung	2,5 % (w/v) Natriumcarbonat pH 11,3 0,01 % (v/v) Formaldehyd (37-%ige (w/v) Lösung)
Braun gefärbte Lösung wurde gegen frische Entwicklerlösung ausgetauscht.	
50 mL Stopplösung für 15 min inkubiert, dann gewässert	0,05 M EDTA pH 8,0



### 3.15.3 Western-Blotting

Der Transfer von Proteinen aus Elektrophorese-Gelen auf eine immobilisierende Membran wird Protein- oder Western-Blotting genannt (Towbin et al., 1979). Hier erfolgte der Transfer unter Anlegen eines elektrischen Feldes (Kyhse-Andersen, 1984) mit einer Blotting-Kammer (Mini *Trans-Blot*® Electrophoretic Transfer Cell, BIO-RAD) auf eine Polyvinylidendifluorid-Membran (PVDF-Membran). Die PVDF-Membran wurde zunächst in 100-%igem Methanol, dann in ddH<sub>2</sub>O angefeuchtet, bevor sie zusammen mit dem Tenngel und allen anderen Komponenten der Gelkassette in Blotting-Puffer (25 mM Tris / 192 mM Glycin / 20 % (v/v) Methanol) äquilibriert wurde. Nach Herstellerangaben wurden die Komponenten der Gelkassette luftblasenfrei zusammengesetzt und in die Blottingkammer eingesetzt. Der Transfer erfolgte in der mit Blottingpuffer gefüllten Kammer mit einer konstanten Spannung von 100 Volt für eine Stunde bei 4 °C.

Nach erfolgreichem Transfer war der vorgefärbte (*prestained*) Proteinstandard auf der Membran sichtbar, die Gelseite der PVDF-Membran wurde markiert und die Membran 10 min in TBS-T gewaschen. Anschließend konnte sowohl eine Immunodetektion oder eine Detektion mit Lektinen erfolgen.

### 3.15.4 Immundetektion von Proteinen

Nach dem Blotting wurde die Membran in TBS-T gewaschen. Die für die Immundetektion vorgesehene Membran wurde ü.N. bei 4 °C in Blockierungsreagenz (5 % Magermilch in TBS-T) inkubiert. Nach jedem Inkubationsschritt wurde die Membran fünfmal 5 min in TBS-T gewaschen. Beim Einsatz kleinen Volumina (1 mL pro Membran) wie beim primären Antikörper (☞2.1.2) wurden die Lösungen auf ein 10 cm x 10 cm Stück Parafilm pipettiert. Die Membran wurde mit der Proteinseite luftblasenfrei auf die Flüssigkeit gelegt, zum Schutz vor Austrocknung mit einem Stück Parafilm überschichtet und 1-1,5 h bei RT inkubiert. Der sekundären Peroxidase (POD)-konjugierte, gegen den Ursprung des ersten gerichteten Antikörper (☞2.1.2) wurde in 20 mL mit der Membran 1 h bei RT leicht geschüttelt. Die Detektion erfolgte über die Peroxidase mit einem chemilumineszenten Substrat, dem ECL- (Enhanced Chemoluminescence) Reagenz. Es wurde nach Herstellerangaben angesetzt und 1 mL mit der Membran auf Parafilm für 5 min inkubiert. Die Membran wurde ohne überschüssige Lösung in Folie geschweißt und fluoreszierende Aufkleber als Positionsmarker angebracht. Es wurde 0,5–10 min mit einem Röntgenfilm exponiert und der exponierte Film in einer Agfa *Curix60* Filmentwicklermaschine nach Angaben des Herstellers entwickelt. Der Film wurde durch die Marker mit der Membran abgeglichen, der Molekulargewichtsmarker übertragen und der Film eingescannt.

### 3.15.5 Lektindetektion von Glykoproteinen

Um die Glykosylierung von Proteinen zu detektieren, wurden die geblotteten Glykoproteine durch biotinylierte Lektine nachgewiesen. Zum Nachweis von *N*- und *O*-Glykanen mit einer

$\alpha$ 2,6-verknüft Sialinsäure wurde SNA eingesetzt. Es erkennt spezifisch die Sequenz Sia $\alpha$ 2,6Gal/GalNAc (Shibuya et al., 1987). Zum Nachweis der nicht-sialylierten Sequenz auf O-Glykanen, Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\beta$ 1-Ser/Thr, wurde PNA eingesetzt. Die biotinylierten Lektine wurden mit einem Peroxidase-markierten Biotin-Avidin-Komplex (*Vectastain*<sup>®</sup> ABC Kit) detektiert. Die für die Lektindetektion vorgesehene Membran wurde ü.N. bei 4 °C in Glykoprotein-freiem 2-%igem BSA in TBS-T blockiert. Die Membran wurde gewaschen und mit 1 mL der Lektin-Lösung auf Parafilm 1-1,5 h inkubiert (↷3.15.4). Während des Waschens wurden die POD-Biotin-Avidin-Komplexe angesetzt. Dazu wurden 10  $\mu$ L Reagenz A (Avidin DH) und 10 $\mu$ L Reagenz B (biotinylierte Meerrettich-Peroxidase H) des *Vectastain*<sup>®</sup> ABC Kits in 1000  $\mu$ L TBS-T gemischt und 30 min inkubiert. Anschließend wurde 100  $\mu$ L 2-%iges (w/v) BSA in TBS-T hinzugefügt und mit der Membran für 30-60 min auf Parafilm inkubiert. Die Detektion der gebundenen Peroxidase erfolgte analog zum Immunoblot. Die Expositionszeit wurde auf 0,5-2 min verkürzt (↷3.15.4).

### 3.15.6 *Stripping* von Westernblot-Membranen

Um die Detektionsreagenzien (Antikörper, Lektine) von einer PVDF-Membran zu entfernen (*Stripping*), wurde diese einmal in TBS-T gewaschen und dann 30 min in 0,1 M Glycin pH 3 geschüttelt. Anschließend wurde die Membran durch Waschen mit TBS-T neutralisiert, bevor sie für die zweite Immuno- oder Lektindetektion in der Blockierungslösung inkubiert wurde.

### 3.16 Aufreinigung von CD22-Liganden mittels Affinitätschromatographie

Für die Affinitätschromatographie wurde zunächst eine CD22-Affinitätsmatrix hergestellt. Wie bei der Aufreinigung der exprimierten CD22-Fc-Chimären wurde CD22-Fc über den Fc-Teil an Protein A-Sepharose gebunden und mit der potentiellen Ligandenlösung inkubiert. Potentielle Liganden wurden durch Inkubation mit dem Sialinsäurederivat und hochspezifischen CD22-Liganden BPC-Neu5Ac eluiert. Die im Eluat enthaltenen Proteine wurden mit Aceton gefällt und mittels 1D- und 2D-PAGE zur Analyse aufgetrennt.

Für die Herstellung des CD22-Fc-Trägers wurde die Protein A-Sepharosesuspension 1 min bei 1000 rpm zentrifugiert, der Pufferüberstand abgenommen und durch HBS ersetzt. Die Sepharose wurde dreimal mit HBS gewaschen und anschließend bei RT unter langsamen Rotieren mit der CD22-Fc-Lösung inkubiert. Es wurde das 5-20-fache an CD22-Fc (w/w) zu der gepackten (abzentrifugierten) Protein A-Sepharose eingesetzt. Ungebundene CD22-Fc-Chimären wurde durch viermaliges Waschen entfernt und die CD22-Fc-Protein A-Sepharose wurde ü.N. bei 4°C mit der Ligandenlösung in HBS-Azid unter langsamen Rotieren inkubiert.

Die Ligandenlösung wurde 1,5-15-fach (w/w) in HBS-Azid gegenüber dem gekoppelten CD22-Fc eingesetzt. Ungebundene Moleküle wurden durch viermaliges Waschen bei 4°C entfernt und die Liganden durch Elution mit dem 1-2-fachen des Säulenvolumens (Totvolumen) an 1-3 mM BPC-Neu5Ac in HBS eluiert. Das Eluat wurde ü.N. bei -20°C mit Aceton gefällt und anschließend in dem entsprechenden Probenpuffer aufgenommen.

Außerdem wurde CD22-Fc kovalent durch die Firma GALAB (Geesthacht) an die Säulenmatrix *AffiSep*® gekoppelt (☞ 2.2.3). *AffiSep*®CD22-Fc konnte in Suspension oder als gepackte Säule für die Affinitätschromatographie genutzt werden. Bei den verwendeten MiniSpin-Säulen wurden die Lösungen mittels Zentrifugation (Eppendorf *MiniSpin*), bei den 0,5 mL-Säulen mittels einer Spritze oder aufgrund der Schwerkraft über die Matrix gegeben. Die 30-minütige Inkubation zur Elution mit BPC-Neu5Ac entfiel. Das BPC-Neu5Ac wurde bei den MiniSpin-Säulen mittels Zentrifugation mit der Matrix in Kontakt gebracht, 10 min inkubiert und das Eluat dann durchzentrifugiert. Bei den 0,5 mL-Säulen wurden die Liganden während des langsamen Durchlaufens durch den Träger eluiert. *AffiSep*®CD22-Fc wurde nach der Elution mit HBS gewaschen, verbliebene Moleküle durch 0,1 M Glycin pH 3 eluiert und der Träger damit regeneriert. Die *AffiSep*®CD22-Fc wurde mit HBS-Azid gewaschen und darin bei 4°C gelagert.

### 3.17 Peptidmassen-“Fingerabdruck” mittels MALDI-MS

Für die Analyse von Proteinen mit der Peptidmassen-“Fingerabdruck“-Methode mittels MALDI-MS mussten die Proteine zuvor vollständig durch 1D- oder 2D-PAGE getrennt, mit Coomassie-Färbelösung angefärbt und anschließend der Hintergrund gut entfärbt worden sein.

Allen Lösungen und Materialien wurden entweder sterilfiltriert oder äußerst gut gereinigt. Es wurde an einem sauberen Arbeitsplatz mit Handschuhen gearbeitet, um Proteinverunreinigungen zu vermeiden. Es wurden ausschließlich Pipettenspitzen mit Filtern und 1,5 mL-Reagiergefäße von der Firma Eppendorf benutzt, die vor dem Gebrauch 10 min mit Methanol und 10 min mit Acetonitril äquilibriert wurden.

#### 3.17.1 Vorbereitung der Proteine für den „in-Gel“-Verdau mit Trypsin (nach Bosserhoff)

Zunächst wurden mögliche Kandidatenproteine visuell ausgewählt und die sogenannten Proteinspots (bei der 2D-PAGE) oder die Proteinbanden (bei der 1D-PAGE) mit einem sauberen Skalpell aus dem Trenngel ausgeschnitten und in ein vorbereitetes Reagiergefäß überführt, um die Gelstücke für den Trypsinverdau vorzubereiten (Bosserhoff et al., 1989).

Anschließend wurde durch wiederholte Inkubationsschritte ein mehrmaliges Quellen und Schrumpfen der Gelstücke erreicht, was zu einer erhöhten Zugänglichkeit der Proteine bei dem späteren Trypsinverdau führte. Es wurde dreimal mit 100 µL ddH<sub>2</sub>O und dreimal mit 100 µL Acetonitril / ddH<sub>2</sub>O (1:1) gewaschen, bevor die Gelstücke mit 100 µL reinem Acetonitril dehydratisiert wurden. Die Inkubationen wurden 20 min unter Schütteln bei RT durchgeführt, mit einem kurzen Zentrifugationsschritt bei 13000 rpm (Eppendorf *MiniSpin*) beendet und der Überstand abgenommen. Nach dem Entfernen des Acetonitrils wurden die Gelstücke 5 min bei geöffnetem Deckel getrocknet. Für die Trypsinisierung wurden die Gelstücke mit 25 ng/µL der Protease Trypsin verdaut. Dazu wurden 20 µL 50 mM NaHCO<sub>3</sub> pH 7,8 und 1 µL

Trypsin (525 ng/ $\mu$ L in 50 mM Essigsäure) hinzugefügt und 45 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Trypsin-Puffer-Gemisch entfernt, durch 20  $\mu$ L 50 mM NaHCO<sub>3</sub> pH 7,8 ersetzt und 15 h bei 37 °C inkubiert.

### 3.17.2 Extraktion der Peptide und Aufkonzentrierung

Nach der 15-stündigen Inkubation wurde der Verdauansatz zentrifugiert und der Peptid-haltige Überstand in ein vorbereitetes Reagiergefäß übertragen. Die Gelstücke wurden analog zu den durchgeführten Inkubationsschritten (☞3.17.1) dreimal 20 min bei RT mit 20  $\mu$ L 50 % (v/v) Acetonitril / 0,1 % (v/v) TFA extrahiert. Die Peptid-haltigen Extrakte wurden mit dem ersten Überstand vereinigt. Das Volumen der Extrakte wurde in einem Eppendorf Konzentrator unter Vakuum bei 14000 rpm und 30°C auf  $\leq$  5  $\mu$ L reduziert.

### 3.17.3 Vorbereitung der tryptischen Peptidextrakte für die MALDI-MS

Die konzentrierten Peptidextrakte wurden anschließend für Auftrag auf dem hydrophob beschichteten 2-fach 96-well Probenräger vorbereitet.

Dazu musste die konzentrierte Probe zunächst mit der Matrix gemischt werden. Als Matrix wurde  $\alpha$ -cyan-4-hydroxy-Zimtsäure (CHCA) verwendet, die als gesättigte 10 mg/mL Lösung in 50% (v/v) Acetonitril / 0,3% (v/v) TFA angesetzt wurde. Die CHCA-Lösung wurde 2-5 min gevortext und 5 min bei 8000 rpm (Eppendorf *MiniSpin*) zentrifugiert und anschließend der Überstand verwendet.

Die Peptidextrakte wurden in der Regel mit der sogenannte „Dried Droplet Application“ auf den Probenräger aufgebracht. Dabei wurden die Peptidextrakte mit der Matrix gemeinsam auf die Probenplatte pipettiert und bei RT kokristallisiert. Dazu wurden 0,6  $\mu$ L Probe und 0,6  $\mu$ L CHCA nacheinander auf die Platte pipettiert. Peptide, die auf  $<$  1 $\mu$ L eingeeengt wurden, wurden direkt in der Matrix gelöst und 1,2  $\mu$ L von der Lösung auf die Platte aufgetragen.

Als interner Standard konnte ein Protein eingesetzt werden, welches in bekannter Konzentration zur der aufzutrennenden Probe gemischt und dessen Proteinbande oder -Spot ebenfalls aufbereitet wurde.

Als externer Standard, zur Kalibrierung der aufgetragenen Peptide, diente eine Peptidmischung mit bekannten Peptiden und bekannter Konzentration. Diese *Calibration Mixture 2* oder *Calmix2* (Applied Biosystems) wurde versetzt unterhalb jeder Probe auf den Probenräger aufgetragen und ließ eine Kalibrierung im Molekulargewichtsbereich von 1296 Da bis 3657 Da (bzw. 5731 Da) zu. Der *Calmix2* wurde nach Angaben des Herstellers in der entsprechenden CHCA-Lösungen rekonstituiert, aliquotiert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Bei Gebrauch wurde der rekonstituierte *Calmix2* 1:25 mit 30 % (v/v) Acetonitril / 0,01 % (v/v) TFA verdünnt. Er wurde dann 1:1 mit der, für die Peptidextrakte vorbereiteten, CHCA-Matrix gemischt. Von der Mischung wurden 1  $\mu$ L auf den Probenräger aufgetragen.

Die Peptidmassen-, „Fingerabdruck“ MALDI-MS Analyse und die Identifizierung der Proteine

über ihre Peptidmassen-Spektren durch Datenbankrecherche erfolgte durch Herrn Marko Mank mit einem *Voyager*<sup>TM</sup> MALDI-TOF (matrix-assisted ionization time-of-flight) Massenspektrometrie-System (Applied Biosystems) bei Milupa Research in Friedrichsdorf.

### **3.18 Bindungstest auf Mikrotiterplatten mit immobilisierten sialylierten Zielproteinen für Siglec Fc-Chimären**

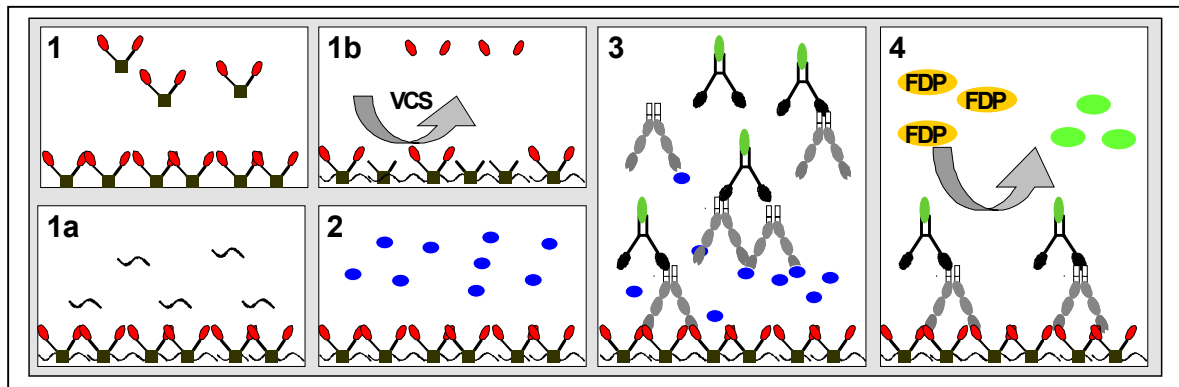
#### **3.18.1 IgM-Mikrotiterplatten-Bindungstest für CD22-Fc**

Für Bindungsstudien mit Glykoproteinen/-peptiden sowie Sialinsäurederivaten und CD22-Fc wurde ein Festphasenbindungstest im Mikrotiterplattenformat mit bovinem IgM als sialyliertes Zielprotein für CD22 etabliert (☞ **Abbildung 5**). Humanes und bovines IgM sind hoch glykosylierte und sialylierte, kommerziell verfügbare Proteine, die wegen ihrer hauptsächlich  $\alpha$ 2,6-verknüpften Sialinsäuren geeignete Bindungspartner für humanes CD22 darstellen. IgM lässt sich in NaHCO<sub>3</sub>-Puffer pH 9,6 verdünnt an die Plastikoberfläche von Mikrotiterplatten immobilisieren. Eine Alternative zu IgM stellt das Serum-Glykoprotein Fetuin da, welches sich aufgrund seiner  $\alpha$ 2,3-verknüpften Sialinsäuren auch für andere Siglecs, wie MAG, eignet.

Da die Bindungsstellen bei Protein-Kohlenhydrat-Interaktionen nur schwache Affinitäten zeigen, versucht man durch multivalente Präsentation von CD22-Fc die Avidität der Bindung zu erhöhen. CD22-Fc wird deshalb über den Fc-Teil mit einem humanen Anti-huIgG zu größeren Komplexen vernetzt. Der Antikörper ist mit dem Enzym alkalische Phosphatase (AP) markiert, welches über eine Substrat-Enzym-Reaktion eine quantitative Bestimmung der gebundenen CD22-Fc/Anti-huIgG-AP-Komplexe ermöglicht. Statt des chromogenen Substrats para-Nitrophenol-Phosphat wurde FDP als Substrat für die alkalische Phosphatase eingesetzt, da das fluoreszierende Produkt Fluoreszein wesentlich genauer und mit höherer Sensitivität nachgewiesen werden konnte. Um die Sensitivität der Messung zu erhöhen und vor allem um den zuverlässig quantitativ erfassbaren Bereich zu erweitern, wurde eine kinetische Messung eingeführt, bei der die Menge gebundenen Enzyms, und damit die der gebundenen CD22-Fc-Chimären, durch Bestimmung der Anfangsgeschwindigkeit ermittelt wurde. Dazu wurden anhand der relativen Fluoreszenzen des Produkts (Emission 520 nm) in Abhängigkeit von der Zeit eine Zeit-Umsatz-Kurve gebildet. Aus dieser Kurve wurde die maximale Steigungsrate ( $\Delta_{\text{max. rel. Fluoreszenz (520 nm)}/\text{min}$ ) ermittelt, die die Anfangsgeschwindigkeit der Enzymreaktion sicher wiedergab.

Durch Titrationen wurden die optimalen Konzentrationen für bovinen IgM, CD22-Fc und den Anti-huIgG-AP ermittelt. Dabei sollten die Komplexe gut in Lösung bleiben und mit hoher Affinität an das Zielprotein und nur schwach an die Puffer-Kontrolle auf der Platte binden (☞ 4.3). Für den IgM-Bindungstest (☞ **Abbildung 5**) wurden schwarze 384-Well- oder 96-Well-Mikrotiterplatten verwendet. Nach jedem Schritt wurde dreimal mit Puffer gewaschen, um ungebundene Moleküle zu entfernen. Das Waschen der Platten sowie die Verdünnung der

Komplexe erfolgte zur Senkung unspezifischer Bindungen mit HBS mit 0,05% des Detergenz Tween. Aufgrund der labilen Kohlenhydrat-Protein-Interaktionen wurde möglichst zügig und mit kaltem Puffer gewaschen. Bis auf die Inhibitoren wurden alle Lösungen mit Mehrkanal-Pipetten oder Multipipetten pipettiert. Die Menge an potentiellen Inhibitoren war der limitierende Faktor. Um dauerhaft an Lösungen zu sparen, wurden die Volumina den kleineren Wells der 384-Well-Platten angepasst (Protokoll A/B : große/ kleine Volumina).



**Abbildung 5** Graphische Darstellung und Durchführung des IgM-Mikrotiterplatten-Bindungstests

Protokoll A: große Volumina; Protokoll B: kleinere, an die Wells der 384-Well-Platten angepasste Volumina.

**1** Immobilisieren von bovinem IgM: Inkubation mit 50  $\mu\text{L}$  (A) oder 20  $\mu\text{L}$  (B) einer 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  IgM-Lösung in 50 mM  $\text{NaHCO}_3$  pH 9,6 ü.N. bei 4°C oder 2 h bei RT. Als Kontrolle für die unspezifische Bindung von CD22-Fc diente Bicarbonatpuffer ohne IgM.

**1a** Blockierung mit BSA (optional): 60  $\mu\text{L}$  3-%ige (w/v) BSA-Lösung in HBS-T für 1 h bei RT.

**1b** VCS-Behandlung des IgMs als Kontrolle (optional): Inkubation mit 40  $\mu\text{L}$  VCS-Puffer (50 mM Natriumacetat pH 5,5 / 9 mM  $\text{CaCl}_2$  / 154 mM NaCl) und 10  $\mu\text{L}$  *Vibrio cholerae* Sialidase (VCS) für 1 h bei 37°C (die restlichen Wells wurden mit IgM weiter inkubiert)

**2** Zugabe der Inhibitoren oder der HBS-Kontrolle: 10  $\mu\text{L}$  (A) oder 5  $\mu\text{L}$  (B) Inhibitorlösung oder HBS wurden grundsätzlich als Dreifachbestimmungen auf die Platte pipettiert. Es wurde auf Eis gearbeitet und die Platte anschließend bei 4°C und 2000 rpm 2 min mit einem Mikrotiterplattenrotor zentrifugiert.

**3** Zugabe der CD22-Fc/Anti-huIgG-AP-Lösung: (A) 20  $\mu\text{L}$  0,1-0,4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  CD22-Fc mit 1:2000 Anti-huIgG-AP in HBS-T oder (B) 5  $\mu\text{L}$  1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  CD22-Fc mit 1:1000 Anti-huIgG-AP in HBS-T wurden hinzugefügt. Die Platte wurde dann zweimal 1 min geschüttelt und danach zentrifugiert und (A) ü.N. bei 4°C oder (B) 4 h bei 4°C inkubiert.

**4** Detektion durch Zugabe von FDP in Tris-MgCl<sub>2</sub>-Puffer (50 mM Tris-HCl pH 8,5 / 10 mM MgCl<sub>2</sub> / 37°C): (A) 25  $\mu\text{L}$  30  $\mu\text{M}$  FDP-Lösung wurden auf die vorgewärmte Platte mit 25  $\mu\text{L}$  Tris-MgCl<sub>2</sub>-Puffer gegeben oder (B) 25  $\mu\text{L}$  15  $\mu\text{M}$  FDP-Lösung wurden direkt auf die Platte pipettiert.

Direkt nach der Substratzugabe wurde die Platte in das Mikrotiterplatten-Fluorimeter *Fluorocan Ascent CL* (Thermo LifeSciences) eingelegt. Die Platte wurde 10 sec geschüttelt und das von der gebundenen alkalischen Phosphatase umgesetzte Fluoreszein bei einer Exitation von 485 nm und einer Emission von 520 nm kinetisch gemessen. Die Messintervalle richteten sich nach der Zahl der zu messenden Wells und der Integrationszeit, die auf 200 msec festgelegt wurde. Bei einer 384-Well-Platte wurde alle 2,5 min über 30 min (B) bis 60 min (A) gemessen. Die maximale Steigungsrates ( $\Delta_{\text{max}}$  rel. Fluoreszenz (520 nm)/min) wurde mittels der *Fluorocan Ascent-Software* ermittelt und diente als Maß für die Bindung von CD22-Fc an IgM. Abweichungen/Variationen von den Standardprotokollen A und B wurden im Ergebnissteil entsprechend angeführt.

Bei Protokoll B reduzierte sich das Volumen der Komplexe von 20  $\mu\text{L}$  auf 5  $\mu\text{L}$ , das der Inhibitoren von 10  $\mu\text{L}$  auf 5  $\mu\text{L}$ . Dadurch wurden die Konzentrationen der Inhibitoren durch den Ansatz nur noch halbiert. Die Inkubationszeit wurde außerdem auf 4 h verkürzt. Die FDP-Lösung wurde auf 25  $\mu\text{L}$  Gesamtvolumen reduziert. Das geringere Volumen ließ eine schnellere Befüllung aller Wells zu. Die Platte musste daher nicht mit Puffer vorinkubiert werden, sondern konnte direkt auf einem Heizblock mit der FDP-Lösung befüllt werden. Die Messzeit wurde auf 30 min verkürzt, da diese Zeit ausreichte, um durch die maximale Steigungsrate ein geeignetes Maß für die Bindung zu erhalten ( $\varphi$  **Abbildung 5**).

### 3.18.2 Einsatz der CD22-Fc Mutanten im Mikrotiterplatten-Bindungstest

Um die exprimierten CD22-Fc Mutanten auf ihre Sialinsäure-Bindung zu testen, wurden sie im IgM-Bindungstest eingesetzt. Für jede eingesetzte Konzentration der CD22-Fc/AntihuIgG-AP-Komplexe wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt. Die Bindung des CD22-Fc Wt und der Mutanten an bovines IgM ergab sich aus der Differenz der gemittelten, detektierten max. Steigungsraten nach Inkubation mit IgM und nach Inkubation ohne IgM (Pufferkontrolle) ( $\varphi$  **Tabelle 2**). Die Werte der Bindung der CD22-Fc Mutanten wurden zu denen des Wildtyps ins Verhältnis gesetzt.

### 3.18.3 Einsatz der Inhibitoren im Mikrotiterplatten-Bindungstest

Bei ausreichend verfügbaren Mengen der „potentiellen Inhibitoren“, z.B. Milchproteine/peptide, Oligosaccharide, Sialinsäurederivate, wurden aus einer Stammlösung 1:2 Verdünnungsreihen hergestellt und die Verdünnungen als Dreifachbestimmungen im IgM-Mikrotiterplatten-Bindungstest eingesetzt. Dieser Versuchsansatz wurde dreimal wiederholt.

Sialinsäuren sind saure Zucker. Die Inhibitoren müssen daher i.d.R. beim Solubilisieren mit 1M NaOH neutralisiert werden, bevor 10% des Endvolumens an zehnfach-konzentriertem PBS oder HBS hinzugefügt wurden, damit die Substanz letztendlich in PBS oder HBS gelöst vorlag.

### 3.18.4 Darstellung der Bindungs-und Inhibitionsparameter

Mit Hilfe der ermittelten maximalen Steigungsraten ( $\Delta_{\text{max}}$ , rel. Fluoreszenz (520 nm)/min) wurden die allgemeinen Bindungsparameter für den Mikrotiterplatten-Bindungstest mit Siglec Fc-Chimären, am Beispiel von CD22-Fc mit IgM als sialyliertes Zielmolekül, ermittelt

**Tabelle 2** Darstellung und Berechnung der Bindungsparameter von CD22-Fc an IgM.

	Abkürzungen / Berechnung
<b>Mittelwerte der Steigungsraten bei CD22-Fc (-AK)</b>	
mit HBS an IgM	$\varnothing$ HBS-IgM
mit Inhibitoren an IgM	$\varnothing$ Inh.-IgM
mit HBS an Bicarbonat (ohne IgM) / unspezifische Bindung von CD22 (Pufferkontrolle)	$\varnothing$ HBS-ohne IgM

<b>Abkürzungen / Berechnung</b>	
<b>spezifische Bindung von CD22-Fc</b>	
an IgM in Anwesenheit von HBS	$\emptyset \text{ HBS-IgM} - \emptyset \text{ HBS-ohne IgM}$
an IgM in Anwesenheit von Inhibitoren	$\emptyset \text{ Inh.-IgM} - \emptyset \text{ HBS-ohne IgM}$
<b>spezifische prozentuale Bindung (in %)</b>	
von CD22-Fc an IgM mit HBS (100% Wert)	$\frac{\emptyset \text{ HBS-IgM} - \emptyset \text{ HBS-ohne IgM}}{\emptyset \text{ HBS-IgM} - \emptyset \text{ HBS-ohne IgM}} * 100$
<b>spezifische prozentuale Bindung (in %)</b>	
von CD22-Fc an IgM mit Inhibitoren (0-100%)	$\frac{\emptyset \text{ Inh.-IgM} - \emptyset \text{ HBS-ohne IgM}}{\emptyset \text{ HBS-IgM} - \emptyset \text{ HBS-ohne IgM}} * 100$
von CD22-Fc ohne IgM (0% Wert)	$\frac{\emptyset \text{ HBS-ohne IgM}}{\emptyset \text{ HBS-IgM} - \emptyset \text{ HBS-ohne IgM}} * 100$
<b>spezifische prozentuale Inhibition (in %)</b>	
	100% - spezifische Bindung (%)

Wurde der Inhibitor als 1:2 Verdünnungsreihe eingesetzt, konnte die Konzentration des Inhibitors ermittelt werden, die zu einer 50-%igen Inhibition der Bindung von CD22-Fc führte ( $IC_{50}$ ) (☞ **Tabelle 3**). Unterschiede zwischen den Bindungstests können aufgrund verschiedener Eigenschaften der CD22-Fc/Anti-huIgG-AP-Komplexe zu abweichenden  $IC_{50}$  führen. Um solche versuchsabhängigen Unterschiede der  $IC_{50}$  einer Substanz zu relativieren und die Ergebnisse unterschiedlicher Versuche miteinander vergleichen zu können, wurde das relative Inhibitionspotential (rIP) berechnet.

**Tabelle 3** Tabellarische Auflistung der Inhibitionsparameter,  $IC_{50}$  und rIP, und ihre Berechnung Konzentration des Inhibitors, die zu einer 50-%igen Inhibition der Bindung von CD22-Fc führte ( $IC_{50}$ ). Bei den Konzentrationen der  $IC_{50}$ -Werte handelt es sich generell um die Endkonzentrationen der Inhibitoren im Versuchsansatz. Die Inhibitoren wurden aufgrund des Pipettierschemas im Test 1:3 (Protokoll A) bzw. später 1:2 (Protokoll B) verdünnt. rIP = relatives Inhibitionspotential eines Inhibitors.

<b><math>IC_{50}</math></b>	<b>Konzentration an Inhibitor bei 50%-iger Inhibition der Bindung</b>
<b>rIP (in %)</b>	<b><math>\frac{IC_{50} \text{ einer Referenzsubstanz} (*100)}{IC_{50} \text{ des Inhibitors}}</math></b>
rIP >1 / >100%	Substanz inhibierte besser als die Referenzsubstanz
rIP <1 / <100%	Substanz inhibierte schlechter als die Referenzsubstanz
<b>Theoretische <math>IC_{50}</math> bzw. rIP, wenn keine 50-%ige Inhibition erreicht wurde:</b>	
> Konz (in %)	max. erhaltene Inhibition von 25–50% bei der höchsten Konzentration
>> Konz. (in %)	max. erhaltene Inhibition < 25% bei der höchsten Konzentration
Konz (in %)	bei fehlender Titrationskurve (Konzentration und erhaltene Inhibition)
n.i.	nicht inhibiert (0% Inhibition)
< rIP (in %)	bei maximal erhaltener Inhibition von 25-50 %
<< rIP (in %)	bei maximal erhaltener Inhibition < 25 %



### 3.19 Bindungstest für Siglec Fc-Chimären auf *GlycoWell*<sup>TM</sup>-Platten

Für den Bindungstest mit Siglec Fc-Chimären wurden alternativ derivatisierte Mikrotiterplatten, deren Oberfläche mit Neu5Ac immobilisiert waren (*GlycoWell*<sup>TM</sup>-Streifen/-Platten) eingesetzt.

Die verwendeten *GlycoWell*<sup>TM</sup>-Streifen wurden zunächst mit HBS-T befüllt und für 5-10 min rehydriert. Der Puffer wurde entfernt und die Streifen in die Plattenhalterung eingesetzt. Es wurden 10 µL Glykokonjugat-Lösung in HBS oder HBS pur in die Wells der Neu5Ac-*GlycoWell*<sup>TM</sup>-Streifen pipettiert. Anschließend wurden 20 µL Komplexe mit 0,4 µg/mL Siglec Fc-Chimären und 1:2000 verdünntem Anti-huIgG-AP in HBS-T dazupipettiert. Als Kontrolle für eine unspezifische Bindung wurden die Komplexe mit HBS als Dreifachbestimmung in die Wells eines *N*-Acetyl-(Blank)-*GlycoWell*<sup>TM</sup>-Streifens gegeben. Nachdem der Inhalt der Platte gründlich geschüttelt und abzentrifugiert wurde, wurde die Platte abgedeckt und ü.N. bei 4°C inkubiert. Die ungebundenen Komplexe wurden durch viermaliges Waschen mit kaltem Puffer entfernt. Anschließend wurden zunächst 50 µL Tris-MgCl<sub>2</sub>-Puffer (50 mM Tris-HCl pH 8,5 / 10 mM MgCl<sub>2</sub> / 37°C) auf die Platte pipettiert und die Platte für 5 min bei 37°C inkubiert. Es wurde 50 µL 30 µM FDP in Tris-MgCl<sub>2</sub>-Puffer hinzugegeben, die Platte sofort im *Fluorescan Ascent CL* 10 sec geschüttelt und dann jede Minute mit einer Gesamtmesszeit von 30 min kinetisch gemessen. Die Messparameter, die Bestimmung der maximalen Steigungsrate und die Bestimmung der spezifischen Bindung erfolgte wie in Kapitel 3.18 beschrieben. Als Kontrolle für die Sialinsäure-unabhängige Bindung wurde die maximale Steigungsrate der Komplexe bei den *N*-Acetyl-*GlycoWell*<sup>TM</sup>-Streifen herangezogen.

### 3.20 Bindungsstudien mit dem *IAsys*

Der optische Biosensor *IAsys*<sup>TM</sup> *Auto plus* (Affinity Sensors, ThermoLifeSciences) ermöglicht es, die Interaktionen von Molekülen in Echtzeit zu analysieren. Er beinhaltet ein Doppel-Mikroküvetten-system (je 4 mm<sup>2</sup>), bei dem je nach Art der Küvettenoberfläche bestimmte Moleküle immobilisiert werden können, die dann mit Molekülen aus der umgebenden Lösung interagieren können. Als Sensoroptik enthält die Küvette einen Prismenblock, der in der Regel das polarisierte Licht des Laserstrahls totalreflektiert. Ein geringer Teil dieses Lichts gelangt in eine hochbrechende Schicht oberhalb des Prismenblocks, dem evaneszenten Feld. Das Licht interagiert dabei nicht mit dem Inhalt der Küvette, sondern vielmehr mit dessen Oberfläche. Die Dichte- und Massenverhältnisse der interagierenden Moleküle an der Oberflächen verursachen eine messbare Veränderung des Brechungswinkels des Laserstrahls. So ist es möglich Bindungen und Dissoziationen verschiedenster Bindungspartner zu messen. Das Signal wird als Winkelsekunde (arc sec) angegeben, wobei eine Änderung des Brechungswinkels um 600 arc sec auf einer planaren Sensormatrix und um 200 arc sec bei einer CMD-Hydrogelmatrix einer Änderung der Proteinkonzentration um 1ng/mm<sup>2</sup> entspricht.

Es wurde eine Küvette mit einer Carboxylatoberfläche verwendet. Um verbesserte Signale bei schwachen Bindungsereignissen zu erzielen, wurde eine Carboxymethyl-Dextran-Oberfläche eingesetzt. Die eingesetzten Moleküle sowie verwendete Lösungen wurden vor Gebrauch gründlich gemischt, zentrifugiert und mit Parafilm bedeckt in 1,5 ml-Reagiergefäßen im Gerät bereitgestellt. Das Sterilfiltrieren des Laufpuffers HBS und der Parafilm diente dazu, das System vor optisch störenden Verunreinigungen in den Lösungen zu schützen. Die Temperatur im Gerät betrug 25°C und die Rührer-Geschwindigkeit 85 rpm. Vor der Datenaufnahme wurde die Küvette mit dem Laufpuffer äquilibriert, bis sich eine stabile Grundlinie gebildet hatte.

Um eine gerichtete und multivalente Präsentation der CD22-Bindungsdomäne auf der Oberfläche zu gewährleisten, wurde ein anti-huIgG-Antikörper kovalent an die Oberfläche gekoppelt, an den CD22-Fc über den Fc-Teil gebunden wurde. Die Carboxylgruppen auf der Küvettenoberfläche wurden nach Angaben des Herstellers durch ein EDC/NHS-Gemisch für 10 min aktiviert. Nach dem Waschen mit Laufpuffer wurde auf den Immobilisierungspuffer 10 mM HEPES pH 7,4 umgestellt. Es wurden 10-20 µg Anti-huIgG in 50 µL 10 mM HEPES zur Immobilisierung in beiden Zellen eingesetzt. Die Immobilisierung wurde 15-30 min bis zum Sättigungspunkt der Bindungskurve durchgeführt. Ungebundener Anti-huIgG wurde daraufhin durch Waschen mit Immobilisierungspuffer entfernt. Um ungebundene, nicht-aktivierte Bindungsstellen auf der Oberfläche zu blockieren, wurde für 5 min mit 50 µL 1 M Ethanolamin pH 8,5 inkubiert. Durch Waschen mit Immobilisierungspuffer wurde überschüssiges Ethanolamin entfernt. Alle nicht-gebundenen Moleküle auf der Oberfläche wurden durch zwei Regenerationsschritte mit 1 mM HCl für jeweils 1 min und anschließendem Waschen mit Immobilisierungspuffer entfernt. Die Menge an angebindenem Anti-huIgG konnte aufgrund der Differenz der Signalthöhe vor der Anbindung und nach dem letzten Waschschrift ermittelt werden.

Anschließend wurde wieder auf Laufpuffer umgestellt. An den immobilisierten Anti-huIgG wurden nun Fc-Chimären des CD22 (Wildtyp und Mutanten) gebunden, die zuvor in 50 µL Laufpuffer verdünnt eingesetzt wurden. Die Anbindung war beendet, sobald die Bindungskurve einen linearen Verlauf annahm. Anschließend wurden die ungebundenen Fc-Chimären durch Waschen mit Laufpuffer entfernt. Die Menge an gebundenem CD22-Fc wurde durch die Signaldifferenz vor der Anbindung und nach dem Waschen ermittelt.

Als Zielprotein für eine Sialinsäure-abhängige Bindung wurde bovines IgM oder Milchglykoproteine/-peptide eingesetzt. Das bovine IgM wurde in Laufpuffer verdünnt in die Küvettenzelle gegeben. Die Anbindung war beendet, sobald die Bindungskurve einen linearen Verlauf annahm. Die Dissoziation der Glykoproteine/-peptide vom CD22-Fc durch Puffer bzw. die Menge an gebundenen Glykoproteinen/-peptiden wurde durch die Signaldifferenz vor der Anbindung und nach dem Waschen ermittelt. Durch die Zugabe von BPC-Neu5Ac wurde eine Sialinsäure-abhängige Verdrängung der an CD22-Fc gebundenen Glykoproteine/-

peptide untersucht. Die Sialinsäure-abhängige Dissoziation der Glykoproteine/-peptide wurde durch a) direkte Zugabe von BPC-Neu5Ac in die Glykoprotein-/Glykopeptid-Lösung oder b) Zugabe von BPC-Neu5Ac nach dem Entfernen ungebundener Glykoprotein-/Glykopeptid-Moleküle bestimmt.

### 3.21 Bial-Test zum Nachweis freier und gebundener Sialinsäuren

In Anwesenheit von Salzsäure werden Pentosen und Hexosen zu Furfuralderivaten dehydriert, die mit Orcinol und Eisenchlorid zu einem grün-blau gefärbten oder braun gefärbten Produkt reagieren. Sialinsäuren reagieren mit diesem Bial-Reagenz (81,4 mL HCL (37-%ig) / 0,2g (w/v) Orcinol / 2,0 mL 1-%iges (w/v) FeCl<sub>3</sub>) zu einem violett gefärbten Produkt. Das gefärbte Produkt wird aus dem Bial-Gemisch durch 1-Pentanol extrahiert und kann bei 562 nm bestimmt und die Konzentration anhand einer Neu5Ac-Eichreihe bestimmt.

Dazu wurden 20 µL (40 µL) Probe mit dem gleichen Volumen an Bial-Reagenz in einem 1,5 mL-Reaktionsgefäß versetzt, gemischt, zentrifugiert und 15 min bei 95°C erhitzt und anschließend 5 min auf Eis abgekühlt. Das Gemisch wurde mit 150 µL (300 µL) 1-Pentanol versetzt und unter Schütteln 5 min bei RT inkubiert, 5 min auf Eis gestellt und 10 min bei 13000 rpm (Eppendorf *MiniSpin*) zentrifugiert. Für die Eichreihe wurden 1, 2, 5, 10, 15, und 20 µL einer 1mM Neu5Ac-Lösung in HBS auf 20 µL (40 µL) mit HBS aufgefüllt und analog zu den Proben verfahren (1-20 nmol Neu5Ac/ Ansatz). 100µL der gefärbten Pentanol-Phase wurde in eine Mikrotiterplatte übertragen. Diese wurde bei 562 nm in einem Mikrotiterplatten-Photometer (*Multiscan Ascent*) gemessen und mittels einer Neu5Ac-Eichreihe der Gehalt an Sialinsäuren bestimmt. Die Volumina der Probe von 1-40 µL richtet sich nach dem geschätzten Gehalt an Sialinsäuren in den Proben.

### 3.22 Analyse der BZR-abhängigen Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung mittels Durchfluscytometrie

Die Kreuzvernetzung des B-Zell-Rezeptors löst verschiedene nachfolgende Signalwege aus, von denen einige, Sekunden nach der Stimulierung, zur Ausschüttung von Ca<sup>2+</sup>-Ionen als sekundären Botenstoff führen. Dabei werden zunächst die intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Speicher im Endoplasmatischen Reticulum geleert, bis durch Ca<sup>2+</sup>-Kanäle in der Zellmembran extrazelluläres Ca<sup>2+</sup> einströmt. Dieser Ca<sup>2+</sup>-Einfluß gibt Aufschluss über die BZR induzierte Signalstärke in der B-Zelle und kann mittels Durchfluscytometrie gemessen werden. Die Durchfluscytometrie erlaubt mittels Laseroptik die Messung von verschiedenen Fluoreszenzsignalen an einzelnen Zellen neben ihrer relativen Größe und Granularität, die als FSC und SSC bestimmt werden. Letztere sind u.a. wichtig, um Zellpopulationen einzugrenzen. Die Konzentration an freiem Ca<sup>2+</sup> in der Zelle kann mit fluoreszierenden Chelatoren wie Indo-1 gemessen werden, das die Eigenschaft besitzt, freies Ca<sup>2+</sup> zu binden und dabei seine Emissionswellenlänge zu ändern. Dazu werden die Zellen zunächst mit Indo-1 beladen (☞3.22.1). Das Durchfluscytometer muss neben den zwei Argonlasern für den

SSC und FSC einen UV-Laser beinhalten, der die Voraussetzung für die Messung der kurzwelligeren Strahlung ist, die benötigt wird um die Ionophoren des  $\text{Ca}^{2+}$ -gebundenen Indo-1 anzuregen. Mit den Fluoreszenzkanälen FL4 und FL5 des *FACS-Vantage*<sup>TM</sup> (Becton Dickinson) können die Fluoreszenzen von  $\text{Ca}^{2+}$ -gebundenem Indo-1 (Excitation 424 nm, Emission 444 nm) und ungebundenem Indo-1 (Excitation 530 nm, Emission 530 nm) erfasst werden. In B-Zellen kann das mIgM im BZR-Komplex mit einem anti-IgM-Antikörper stimuliert werden. Der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausstrom kann als Verhältnis der Fluoreszenz des  $\text{Ca}^{2+}$ -Indo-1-Komplexes bei FL5 gegen die Fluoreszenz von Indo-1, ohne gebundenes  $\text{Ca}^{2+}$ , bei FL4 gemessen werden.

Die Software *Cell Quest* des *FACS-Vantage*<sup>TM</sup> stellt dieses Verhältnis der Fluoreszenzen bei FL4/FL5 innerhalb der abgebildeten Zelle in Abhängigkeit von der Zeit dar. Als Zellsystem wurden humane lymphoblastoide B-Zellen (Daudi-Zellen) eingesetzt, die CD22 exprimieren und durch einen anti-IgM-Antikörper aktiviert werden konnten. Die Zellen wurden mit verschiedenen Milchproteinen/-peptiden sowie BPC-Neu5Ac vorinkubiert, um ihren Einfluss auf die (CD22-abhängige) B-Zell-Rezeptor vermittelte  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung zu bestimmen.

### 3.22.1 Kultivierung und Indo-1 -Beladung der Daudi-Zellen

Daudi-Zellen (humane lymphoblastoide B-Zellen) wachsen in Einzelzellsuspension und wurden in Zellkulturflaschen in  $\text{H}_2\text{O}$  gesättigter Atmosphäre bei 37°C und 5%  $\text{CO}_2$  im Begasungs-Wärmeschrank kultiviert. Die Daudi-Zellen wurden zur Aufzucht in RPMI + SC (mit 10% FCS) kultiviert. Die Zellen wurden alle 2-3 Tage mit einer Pipette resuspendiert und auf neue Zellkulturflaschen mit Kompletmedium verteilt.

Zur Beladung der Daudi-Zellen mit dem Farbstoff Indo-1 wurden die Zellen gut resuspendiert, ein Aliquot 1:1 (v/v) mit Tryphanblau gemischt, die Zelldichte mit einer Neubauerzählkammer bestimmt und die Zellsuspension mit einer Dichte von  $5 \times 10^6$  Zellen/mL in Kompletmedium aufgenommen.

50  $\mu\text{g}$  Indo-1 wurde in 25  $\mu\text{L}$  DMSO resuspendiert, 25  $\mu\text{L}$  pluronisches F-127 durch Pipettieren hinzugemischt, für 5 min bei RT inkubiert und schließlich 113  $\mu\text{L}$  FCS unter Pipettieren hinzugefügt und der Indo-1-Mix für 5 min bei RT inkubiert.

15  $\mu\text{L}$  Indo-1-Mix wurden mit  $5 \times 10^6$  Zellen unter Schwenken gemischt, 45 min im Dunkeln im 37°C-Wasserbad inkubiert und währenddessen mehrmals geschwenkt. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit Kompletmedium gewaschen und in einer Dichte von  $1 \times 10^7$ /mL Zellen aufgenommen. Die Zellen wurden bis und während der Messung im Dunkeln auf Eis aufbewahrt.

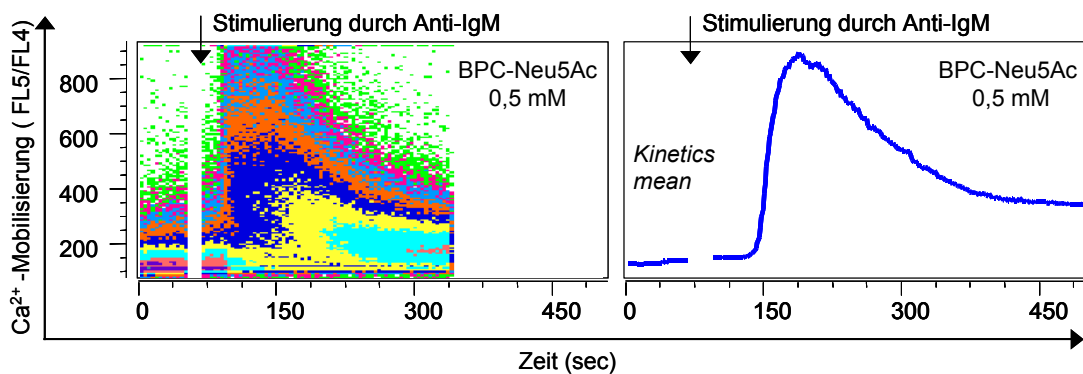
### 3.22.2 Messung der $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung in Daudi-Zellen

Bei der Messung wurden zwischen  $0,8$ - $1,5 \times 10^6$  Indo-1 beladenen Daudi-Zellen mit Kompletmedium auf 1 mL verdünnt, so dass die Flussrate um 1000 Zellen/sec lag. Nach

Messung der Basislinie für 70 sec wurden die Daudi-Zellen durch Zugabe von 10-20  $\mu\text{L}$  Anti-IgM aktiviert und über eine Gesamtmessdauer von 512 sec gemessen.

Die Milchproteine/-peptide sowie BPC-Neu5Ac wurde mit einem maximalen Volumen von 300  $\mu\text{L}$  zu den Zellen gegeben, um das Medium nicht zu stark zu verdünnen. Die Milchproteinproben wurden in einer Mindestausgangskonzentration von 10 mg Probe/mL HBS eingesetzt. Als Kontrolle für eine basale  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung dienten Zellen, die vor der Messung 8 min bei RT im Dunkeln mit 50 oder 300  $\mu\text{L}$  Puffer (in Abhängigkeit von den eingesetzten Volumina der Proben) vorinkubiert wurden. Als Kontrolle für eine erhöhte  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung wurden die Zellen mit BPC-Neu5Ac in einer Endkonzentration von 0,5 mM vorinkubiert.

Die Messungen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung wurden zunächst in einem Intensitäts-Häufigkeitsdiagramm mittels der Geräte-Software Cell Quest (Becton Dickinson für Macintosh) dargestellt. Die erfassten Daten einer Messung wurden anschließend mit der auf Auswertungssoftware FlowJo (Tree Star, für Macintosh) bearbeitet. Für die Analysen wurden nur die lebenden Zellen erfasst, d.h. es wurde ein sogenanntes „Lifegate“ erstellt. Die Fluoreszenzen der erfassten Zellen wurden gemittelt (Mittelwertberechnung, *mean*) und als Funktion gegen die Zeit aufgetragen. Die so kalkulierten Kurven mehrerer Messungen konnten – ebenfalls mit der Auswertungssoftware FlowJo – gemeinsam, vergleichend dargestellt werden.



**Intensität-Häufigkeitsdiagramm (Cell Quest):**

Die Menge an freigesetztem  $\text{Ca}^{2+}$  kann durch das Verhältnis der Fluoreszenzen von Indo1- $\text{Ca}^{2+}$ -Komplexen (FL5) zu ungebundenem Indo-1 (FL4) für jede Zelle dargestellt werden in Abhängigkeit von der Zeit

**Kurvendiagramm (Flow Jo / Kinetics):**

Die Mittelwerte der FL5/FL4-Fluoreszenzen aller einbezogenen, lebenden Zellen (Lifegate) wurden mittels der Cell Quest-Daten ermittelt und als Funktion der Zeit dargestellt.

Eine gemeinsame Darstellungen mehrerer Messungen ist auf diese Weise möglich.

**Abbildung 6** Vergleich eines Intensitäts-Häufigkeitsdiagramms und eines Kurvendiagramms bei der Darstellung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung (FL5/FL4) in Abhängigkeit von der Zeit.

Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung wurde in mit 0,5 mM BPC-Neu5Ac inkubierten Daudi-Zellen nach Stimulierung mit einem anti-IgM-Antikörper gemessen.



## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Als Modellsystem für Untersuchungen zu immunstimulierenden und -modulierenden Eigenschaften von Milchproteinen/-peptiden wurde ein akzessorisches Molekül des BZR, CD22, gewählt, da es neben der Eigenschaft die BZR-vermittelte Immunantwort zu dämpfen auch die eines Sialinsäure-bindenden Lektins hat (Nitschke et al., 1997; Kelm et al., 1994a). Es wird vermutet, dass die extrazelluläre Bindung von Liganden an CD22 einen Einfluss auf seine intrazelluläre Funktion bei der Rekrutierung negativer Regulatoren der B-Zell-Antwort hat (Kelm et al., 2002; Jin et al., 2002). Für die Analyse der Sialinsäure-abhängigen Bindung von CD22-Fc mit Glykoproteinen/-peptiden und Sialinsäurederivaten wurde ein Mikrotiterplatten-Bindungstest mit IgM als sialyliertes Zielmolekül für CD22-Fc entwickelt (⇨4.3.2). Bindungsstudien mit dem CD22-affinen Sialinsäurederivat BPC-Neu5Ac konnten zu dem Verständnis des Bindungsverhaltens von CD22 beitragen (⇨4.4). In ortsgerichteten Mutagenesestudien an verschiedenen Siglecs konnte gezeigt werden, dass die Veränderung bestimmter Aminosäuren in der Bindungstasche zum Verlust der Sialinsäure-Bindung führt (Jin et al., 2002; van der Merwe et al., 1996; Vinson et al., 1996). Die Herstellung und Charakterisierung von CD22-Fc Mutanten (⇨4.2) mit defekter Bindungstasche konnte daher zu dem Verständnis der Sialinsäure-Bindung beitragen und als Kontrolle für eine unspezifische, Sialinsäure-unabhängige Bindung dienen (⇨4.4.2).

Von Inhaltsstoffen der Muttermilch ist bekannt, dass sie im Vergleich zu boviner Milch stärker glykosyliert und sialyliert sind (Speer et al., 1993). Der Einfluss verschiedener Glykanstrukturen sowie der Sialinsäure auf die Inhibition von Bakterien ist bekannt (Hanisch et al., 1993; Coppa et al., 1993). In einer Vielzahl von Bindungsversuchen (Diplomarbeit Bock, 2000) konnte gezeigt werden, dass CD22-Fc spezifisch mit verschiedenen Milchglykokonjugaten reagiert. In verschiedenen Bindungsversuchen mit CD22-Fc (⇨4.5) wurden unverdaute und enzymatisch verdaute Milchproteine, die resultierenden nicht-fraktionierten, sowie die säulenchromatographisch fraktionierten Peptide aus Milchen verschiedener Spezies eingesetzt (⇨4.5.1). Aktive, an CD22-bindende Peptide wurden in B-Zell-Aktivierungstests auf ihre Eigenschaft, die BZR-abhängige Immunantwort zu regulieren, untersucht (⇨4.6). Caseine und Molkenproteine unterschiedlicher Herkunft wurden auf ihre Zusammensetzung und Sialylierung mittels elektrophoretischer Verfahren und PNA- und SNA-Nachweis getestet (⇨4.7). Durch CD22-Fc-Affinitätschromatographie mit Milchproteinen konnten CD22-spezifische Liganden aufgereinigt werden (⇨4.8), die über ihren Peptidmassen-, „Fingerabdruck“ massenspektrometrisch analysiert wurden (⇨4.9).

## 4.2 Expression von CD22-Fc Wildtyp und den Mutanten

Für den Einsatz in der Affinitätschromatographie und in den Bindungsstudien wurden größere Mengen CD22-Fc benötigt. Daher wurde die kodierende Sequenz von CD22<sub>d1-3</sub> in den Expressionsvektor pDEF(Fc-3c) umkloniert, der einen Selektionsmarker für die Herstellung von Zelllinien besitzt (☞3.1). Das Plasmid pDEF(Fc-3c)-CD22<sub>d1-3</sub> Wt diente als Ausgangssequenz für die ortsgerichtete Mutagenese der drei Aminosäuren W24, R120 und W128 in dem Insert von CD22<sub>d1-3</sub> (☞3.4). CHO-Zellen wurden mit den Plasmiden transfiziert (☞3.9.3) und stabile Zelllinien selektioniert (☞3.9.4). Die aus den Kulturüberständen dieser Zellen isolierten Fc-Chimären wurden mittels Sandwich-ELISA (☞3.10.3), in der SDS-PAGE (☞3.14.1) und durch Immunoblot-Nachweis mit Anti-CD22 und Anti-huIgG (☞3.15.4) quantifiziert und charakterisiert. Die dabei erhaltenen Ergebnisse mit den erzeugten CD22-Fc-Chimären und ihren Abkürzungen wurden in **Tabelle 4** zusammengefasst.

Die Konzentration der Fc-Chimären im Zellkulturüberstand aus den *Cellline* Fermentern war aufgrund der Dichte der Zellen deutlich höher als bei Kultivierung in Zellkulturschalen. Sie lag für CD22-Fc Wt bei 40 µg/mL, für CD22-Fc R120A bei 23 µg/mL und für CD22-Fc Triple bei 24 µg/mL. Etwa 6-8 Wochen nach der Inokulation ließ die Produktion der Fc-Chimären in den Fermentern nach. Bei Konzentrationen unter 10 µg Fc-Chimären /mL Zellkulturüberstand wurde die Produktion eingestellt.

**Tabelle 4** Die erzeugten CD22-Fc-Chimären, ihre jeweils erzielten Expressionsraten und ihre immunologische Reaktivität.

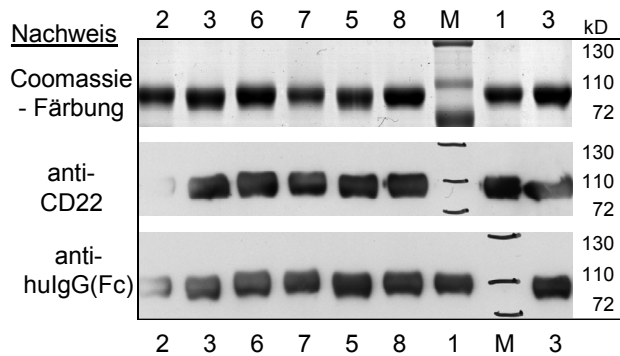
Dargestellt werden die erzeugten CD22-Fc-Chimären, die verwendeten Abkürzungen, ihre immunologische Reaktivität im Immunoblot und die jeweils erzielten Expressionsraten, die im Sandwich-ELISA als µg Fc-Chimäre pro mL Zellkulturüberstand (von auf Zellkulturschalen kultivierten Zellen) ermittelt wurden.

Nr.	mutierte Aminosäure in CD22 <sub>[d1-3-(3c)]</sub> -Fc	Abkürzungen	Anti-CD22 Anti-huIgG	Expression (µg/mL)
1	Wildtyp	CD22 <sub>d1-3</sub> -Fc Wildtyp	ja	3,60
2	Arg120 zu Ala	CD22 <sub>d1-3</sub> -Fc R120A	ja	2,40
3	Trp128 zu Gln	CD22 <sub>d1-3</sub> -Fc W128Q	ja	1,80
4	Trp24 zu Gln	CD22 <sub>d1-3</sub> -Fc W24Q	ja	0,53
5	Arg120 zu Ala, Trp128 zu Gln	CD22 <sub>d1-3</sub> -Fc R120A / W128Q	ja	0,49
6	Arg120 zu Ala, Trp24 zu Gln	CD22 <sub>d1-3</sub> -Fc R120A / W24Q	ja	1,40
7	Trp128 zu Gln, Trp24 zu Gln	CD22 <sub>d1-3</sub> -Fc W128Q / W24Q	ja	0,62
8	Arg120 zu Ala, Trp128 zu Gln und Trp24 zu Gln	CD22 <sub>d1-3</sub> -Fc Triple	ja	2,40

In der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wandern die gereinigten CD22-Fc-Chimären mit einer Hauptbande bei einer apparenten Molekularmasse von etwa 90 kDa. Sowohl der Antikörper gegen CD22 als auch der Anti-huIgG, der gegen den Fc-Teil gerichtet ist, bindet an das Protein mit etwa 90 kDa (☞ **Abbildung 7**). Dies gilt für CD22-Fc Wildtyp als auch für alle Mutanten. Aufgrund der Aminosäuresequenz werden 61,5 kDa für eine Untereinheit nach



Reduktion erwartet. Dieses langsamere Laufverhalten kann auf Glykane an den potentiellen *N*-Glykosylierungsstellen des Proteins zurückgeführt werden.



**Abbildung 7** Elektrophoretische Auftrennung und immunologischer Nachweis der aufgereinigten Fc-Chimären des CD22.

Jeweils 2 µg CD22-Fc-Chimären wurden mittels SDS-PAGE in einem 8-%igen Polyacrylamidgel unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Der Nachweis von CD22-Fc erfolgte durch Anfärbung mit Coomassie oder nach Western-Blotting durch die Detektion mit einem anti-CD22-

oder einem Fc-spezifischen anti-huIgG-Antikörper (☞ 2.1.2). Die Nummern der aufgetragenen Fc-Chimären entsprechen der Nummerierung in Tabelle 4. (mangelndes Blotten der Fc-Chimäre Nr. 2 auf die Membran)

Neben der Hauptbande (90 kDa) wurden mit beiden Antikörpern Nebenprodukte von CD22-Fc detektiert. Es wurde vor allem bei CD22-Fc Wt ein Produkt mit einem apparenten Molekulargewicht von 60 kDa nachgewiesen, welches dem Molekulargewicht von deglykosyliertem CD22-Fc entspricht und auch bei PNGase-verdautem CD22-Fc nachgewiesen werden konnte (Daten nicht gezeigt). Bei unvollständiger Reduktion bzw. Zurückbildung der Disulfidbrücken konnte nicht-reduziertes CD22-Fc (>150 kDa) sowie Komplexe von CD22-Fc im hochmolekularen Bereich >200 kDa mittels SDS-PAGE nachgewiesen werden (☞ Abbildung 31). Abhängig von der Lagerungsdauer wurde bei den Fc-Chimären eine zunehmende Tendenz zur Bildung von Aggregaten beobachtet.

### 4.3 Entwicklung eines IgM-Mikrotiterplatten-Bindungstests für CD22-Fc

#### 4.3.1 GlycoWell- Mikrotiterplatten-Bindungstest

Für die Analyse der Sialinsäure-Bindung von verschiedenen Siglecs mit Sialinsäurederivaten wurde bisher ein Hapten-Inhibitionstest eingesetzt, der auf Sialinsäure-tragenden Zielzellen in Lösung basierte und bei dem die gebundenen Siglecs über <sup>125</sup>I radioaktiv markierte anti-huIgG-Antikörper oder Fc-Chimären der Siglecs bestimmt wurden (Crocker et al., 1996; Diplomarbeit Bock, 2000). Die Komplexierung der Siglec Fc-Chimären mit einem Fc-spezifischen Antikörper war erforderlich, um eine multivalente Präsentation und damit eine erhöhte Avidität der Bindung zu erreichen, da die einzelnen Bindungsstellen bei Protein-Kohlenhydrat-Interaktionen in der Regel nur eine niedrige Affinität haben.

Der Hapten-Inhibitionstest war für Monosaccharide geeignet. Die Ergebnisse dieser Inhibitionsstudien trugen wesentlich zu dem Verständnis der Sialinsäure-Bindung der Siglecs bei (Kelm et al., 1998; Strenge et al., 1998; Diplomarbeit Bock, 2000). Für Untersuchungen mit Milchproteinen erwies sich diese Methode jedoch als ungeeignet (Diplomarbeit Bock, 2000).

In einer Weiterentwicklung dieses Verfahrens (M. Rusch und S. Kelm, persönliche Mitteilung) wurden die Zielzellen durch *GlycoWell*<sup>TM</sup>-Mikrotiterplattenstreifen der Firma Lundonia Biotech (Lund, Schweden) ersetzt, deren Oberfläche mit immobilisiertem Neu5Ac derivatisiert ist (⇨3.19). Als Kontrolle für eine unspezifische Bindung dienten Wells, die statt Neu5Ac nur eine Acetyl-Gruppe enthielten. Um den Einsatz radioaktiver Isotope zu umgehen, wurde ein mit alkalischer Phosphatase gekoppelter anti-huIgG-Antikörper zur quantitativen Bestimmung der gebundenen Komplexe eingesetzt. Dabei wurde neben dem chromogenen Substrat para-Nitrophenol-Phosphat auch FDP eingesetzt, da das bei der Umsetzung entstehende Fluoreszein mit wesentlich höherer Sensitivität und Genauigkeit nachgewiesen werden kann.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die optimalen Inkubationsbedingungen für verschiedene Fc-Chimären ermittelt. Um die Sensitivität der Messung zu erhöhen und vor allem um den zuverlässig quantitativ erfassbaren Bereich zu erweitern, wurde eine kinetische Messung eingeführt (⇨3.18), bei der die Menge gebundenen Enzyms, und damit die der gebundenen Siglec Fc-Chimären, durch Bestimmung der Anfangsgeschwindigkeit der enzymatischen Reaktion ermittelt wurde.

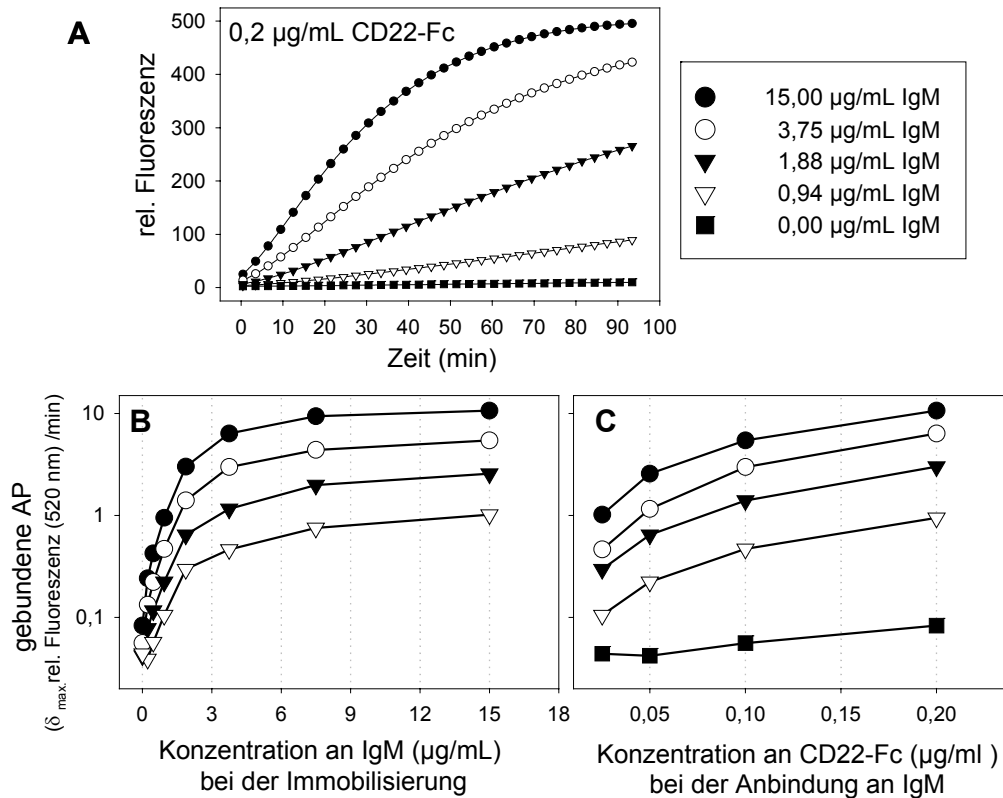
Neben dem bereits mit den *GlycoWell*<sup>TM</sup>-Mikrotiterplattenstreifen getesteten MAG-Fc wurden auch Fc-Chimären von Sialoadhäsine und CD22 mit diesen Platten eingesetzt. Nach mehreren Titrationsexperimenten wurde deutlich, dass sich diese Methode sehr gut für MAG-Fc eignet, aber nicht für Sialoadhäsine-Fc oder für CD22-Fc geeignet war. Beide Fc-Chimären binden nur geringfügig / nicht besser an die Neu5Ac-Oberfläche als an die Acetyl-Kontrolle. Bei Sialoadhäsine waren alle Werte relativ niedrig, während bei CD22 außerdem eine leicht erhöhte unspezifische Bindung an die acetylierten Oberflächen beobachtet wurde.

#### **4.3.2 Entwicklung eines Mikrotiterplatten-Bindungstests für CD22-Fc**

Da für Bindungsstudien mit CD22 die Neu5Ac-Oberfläche der *GlycoWell*<sup>TM</sup>-Mikrotiterplatten nicht geeignet war, wurde IgM als Zielmolekül für eine Sialinsäure-abhängige Bindung eingesetzt. Powell et al. (1995) konnten zeigen, dass CD22-Fc an eine Vielzahl  $\alpha$ 2,6-sialylierter Serum-Glykoproteine bindet. Immunglobuline lassen sich dabei wesentlich besser an Plastikflächen immobilisieren, als z.B. das  $\alpha$ <sup>1</sup>-Glykoprotein (Powell et al., 1994). Humanes und bovines IgM sind hoch glykosylierte und  $\alpha$ 2,6-sialylierte, kommerziell verfügbare Proteine, wobei letzteres eine preisgünstigere Alternative darstellt und zudem nicht von dem zur Komplexierung der Fc-Chimären eingesetzten anti-huIgG-Antikörper gebunden wird.

Zunächst wurden die mit den *GlycoWell*<sup>TM</sup>-Platten eingesetzten Versuchsbedingungen, wie Volumina, die Konzentrationen der Fc-Chimären und des Anti-huIgG-AP, die Waschschriffe und die Nachweisreaktion, übernommen. Dazu wurde eine hochbindende schwarze 96-Well-Platte eingesetzt. In Anlehnung an den Sandwich-ELISA wurde zur Immobilisierung das IgM

ausgehend von 15  $\mu\text{g/mL}$  als 1:2 Verdünnungsreihe eingesetzt. Noch verfügbare Bindungsstellen auf der Platte wurden mit einem Glykoprotein-freien Reagenz, z.B. reines BSA, blockiert (⇨3.18.2, Abbildung 5). In **Abbildung 8** wurden die Ergebnisse der ersten Titrationsversuche von CD22-Fc-AK-Komplexen und IgM zusammengefasst.



**Abbildung 8** IgM-Mikrotiterplatten-Bindungstest: Titration von IgM und CD22-Fc.

IgM wurde in den angegebenen Konzentrationen in einer Mikrotiterplatte immobilisiert. Nach Blockierung mit BSA wurden Komplexe aus Anti-huIgG-AP und CD22-Fc zugegeben, über Nacht bei 4°C inkubiert und anschließend gewaschen. Nach Zugabe des Substrats FDP wurde in Intervallen von 27 sec die Fluoreszenz gemessen. Das Mischungsverhältnis der Komplexe war in allen Ansätzen gleich (Anti-huIgG-AP 1:1000 bei 0,2  $\mu\text{g}$  CD22-Fc/mL). Angegeben ist jeweils die Konzentration der Fc-Chimären.

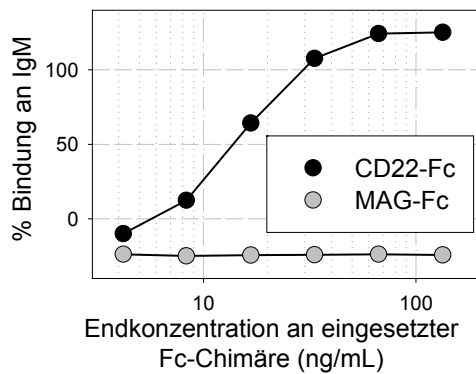
(A) Verlauf der enzymatischen Substratumsetzung, dargestellt als Anstieg des Fluoreszenzsignals in Abhängigkeit der Zeit (Zeit-Umsatz-Kurve) durch die gebundene Menge AP, die aus der Bindung der CD22-Fc/Anti-huIgG-AP-Komplexe (bei der angegebenen Konzentration) an die verschiedenen, bei der Immobilisierung eingesetzten Konzentrationen an IgM resultierte. Zur besseren Übersichtlichkeit wurde nur jeder vierte Messpunkt dargestellt.

(B) Dargestellt ist die Menge gebundener Komplexe (gebundene AP) in Abhängigkeit von der zur Immobilisierung eingesetzten IgM-Konzentration. Die Kurven stellen die Anbindung von CD22-Fc in den angegebenen Konzentrationen da.

(C) Dargestellt ist die Menge gebundener Komplexe in Abhängigkeit von den eingesetzten Konzentrationen an CD22-Fc. Die Kurven stellen die Anbindung von CD22-Fc bei den angegebenen IgM-Konzentrationen, die zur Immobilisierung eingesetzt wurden, da.

Aus den Zeit-Umsatz-Kurven in **Abbildung 8 A** ist ersichtlich, dass selbst bei niedrigen Konzentrationen des IgMs ( $0,75 \mu\text{g/mL}$ ) bei der Immobilisierung die Menge gebundener CD22-Fc/Anti-huIgG-AP-Komplexe (gebundene AP) so hoch war, dass eine Substratumsetzung detektiert werden konnte. Bei dieser niedrigen IgM-Beladung konnte die AP-Bindung nur zuverlässig detektiert werden, wenn mind. 60 Minuten gemessen wurde. Dagegen erfolgte bei einer Beladung mit  $3,75 \mu\text{g/mL}$  IgM eine derart schnelle Substratdepletion, dass nach wenigen Minuten die Reaktionsgeschwindigkeit nachließ, sichtbar in einem Abflachen der Zeit-Umsatz-Kurve ( $\curvearrowright$  **Abbildung 8 A**). Um zuverlässig die Menge gebundenen Enzyms und damit die der gebundenen Siglec Fc-Chimären zu ermitteln, wurde die Anfangsgeschwindigkeit der enzymatischen Reaktion anhand der maximalen Steigungsrate der Zeit-Umsatz-Kurve bestimmt. Die Titrations in **Abbildung 8 B/C** zeigen deutlich, dass die Menge an gebundenem Anti-huIgG-AP mit der eingesetzten Konzentration an CD22-Fc und IgM bis zu dem Eintreten einer Sättigung korreliert. Die Konzentration an CD22-Fc/Anti-huIgG-AP-Komplexen ist eine kritische Größe für die Enzymaktivität.

Aufbauend auf den Ergebnissen dieser Titrations wurden zunächst verschiedene Platten getestet. Berücksichtigt wurde dabei neben einem guten Signal/Hintergrund-Verhältnis auch der Preis pro Platte sowie die Verfügbarkeit von 384-Well-Platten. Als optimal erwiesen sich die Cliniplate-Platten mit U-förmigen Vertiefungen, in denen mit kleineren Volumina gearbeitet werden kann. Daher wurden die weiteren Bindungstest hauptsächlich mit diesen Platten durchgeführt. Aus den Vorversuchen wurden die folgenden Bedingungen abgeleitet:  $3 \mu\text{g/mL}$  IgM in  $50 \mu\text{L/Well}$  für die Immobilisierung,  $60 \mu\text{L}$  3-%iges BSA und  $20 \mu\text{L}$  Komplexe mit zunächst  $0,05 \mu\text{g/mL}$  und 1:2000 verdünntem Anti-huIgG-AP. Wie aus den Kurven in **Abbildung 8 A** ersichtlich, war die AP-Reaktion in den ersten Minuten etwas geringer als die maximale Reaktionsgeschwindigkeit. Dieser Effekt wurde auf eine unzureichende Temperierung der Platten vor Zugabe des Substrats zurückgeführt. Daher wurden die Platten nach dem Waschen erst mit angewärmten Tris-Puffer ( $25 \mu\text{L}$ ) inkubiert, bevor  $25 \mu\text{L}$  der eigentlichen, ebenfalls angewärmten Substratlösung hinzugegeben wurde. Bei den 96-Well-Platten wurden entsprechend jeweils  $50 \mu\text{L}$  eingesetzt. Die gesamte Messzeit wurde auf 60 Minuten verkürzt und die Intervalle zur Messung der 384-Well-Platten auf 2,5 min erhöht. Bei fortschreitender Lagerung der Fc-Chimären ergaben sich Verschiebungen der idealen Konzentrationen. Diese wurden vor Versuchsreihen immer wieder durch Titration ermittelt. Die idealen Endkonzentrationen lagen zwischen  $0,05$ - $0,2 \mu\text{g/mL}$  CD22-Fc und einer Antikörper-Verdünnung von 1:2000. In **Abbildung 9** wurde beispielhaft die konzentrationsabhängige Bindung von CD22-Fc in einer solchen Titration im Vergleich zu MAG-Fc an IgM dargestellt.



**Abbildung 9** Konzentrationsabhängige Bindung von CD22-Fc an IgM im Vergleich zu der Bindung von MAG-Fc an IgM.

Eine mit IgM beschichtete 384-Well-Platte (☞ Protokoll A, 3.18.2) wurde nach der Blockierung mit 20  $\mu$ L Fc-Chimären in den angegebenen Konzentrationen, mit 1:2000 verdünntem Anti-huIgG-AP versetzt und ü.N. inkubiert. Die Bindung der Fc-Chimären an IgM wurde auf die Bindung von 50 ng CD22-Fc /mL an IgM (100%) bezogen.

Die Fc-Chimäre von Siglec-4 (MAG) zeigt keine Bindung an IgM, die gemessenen Fluoreszenzen entsprachen denen, die bei der unspezifischen Bindung des Antikörpers an das IgM gemessen wurden. Diese Ergebnisse weisen auf eine hohe Spezifität des CD22 für die Glykane des IgMs hin.

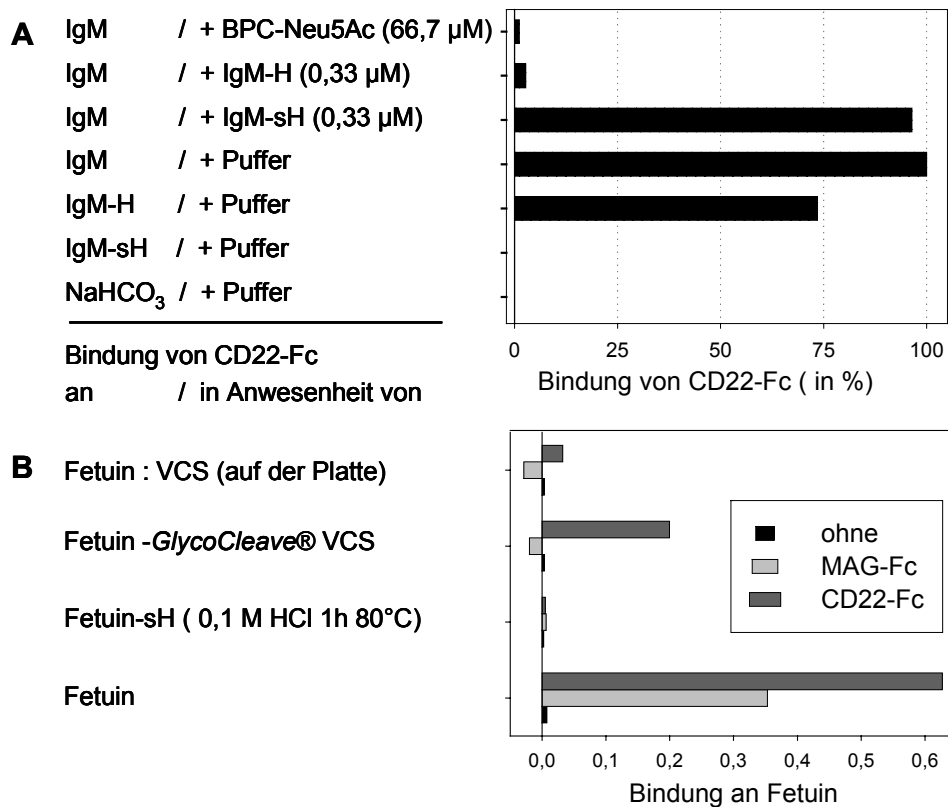
Die zentrale Frage der Experimente war, ob die Bindung von CD22-Fc an IgM Sialinsäure-abhängig ist. Dazu wurden zunächst die Sialinsäuren vom IgM enzymatisch durch VCS-Behandlung abgespalten. Da die Sialidase-Behandlung nicht ausreicht, um die Bindung von CD22-Fc an IgM vollständig zu reduzieren, wurde eine saure Hydrolyse (☞ 3.12) durchgeführt (☞ **Abbildung 10 A**). Da diese wiederum unter denaturierenden Bedingungen (80°C) erfolgte, musste festgestellt werden, ob die Hitzedenaturierung alleine zu einem Abfall der Bindung führt. Der Gehalt gebundener Sialinsäuren von nativem und hydrolysiertem IgM wurden mittels Bial-Test bestimmt (☞ 3.21) und in **Tabelle 5** dargestellt. Wie erwartet, konnte keine Bindung von CD22-Fc an IgM-sH beobachtet werden. Die Bindung wurde wie bei CD22-Fc an die Platte ohne IgM (Pufferkontrolle) vollständig reduziert. Allerdings wurde die Bindung an hitzebehandeltes IgM ebenfalls reduziert. Die reduzierte Bindung korrelierte mit dem geringeren Gehalt an gebundener Sialinsäure. In einem weiteren Ansatz zur Kontrolle der unspezifischen Bindung von CD22 an IgM wurde die Sialinsäure-Bindungsstelle von CD22-Fc durch den Inhibitor BPC-Neu5Ac blockiert. Bei den eingesetzten Konzentrationen konnte eine fast vollständige Inhibition der Bindung erreicht werden (☞ **Abbildung 10 A**).

Neben IgM wurde Fetuin als potentielles Zielglykoprotein getestet. Das Serumprotein Fetuin enthält  $\alpha$ 2,3- und  $\alpha$ 2,6-sialylierte N- und O-Glykane. Auch hier wurde zur Kontrolle der unspezifischen Bindung Fetuin mit Sialidase behandelt sowie durch HCl-Behandlung desialyliert. Außerdem wurde MAG-Fc zum Nachweis von  $\alpha$ 2,3-sialylierten Glykanen eingesetzt. Die gebundenen Sialinsäuren von nativem und desialyliertem Fetuin wurden mittels Bial-Test bestimmt und ebenfalls in **Tabelle 5** dargestellt.

**Tabelle 5** Sialinsäurebestimmung von nativem und desialyliertem IgM und Fetuin.

Zur Kontrolle der Sialinsäure-abhängigen Bindung wurden IgM 1 h bei 80°C mit 0,1 M HCl (IgM-sH) und IgM zur Hitzekontrolle mit ddH<sub>2</sub>O (IgM-H) behandelt. Freie Sialinsäuren wurden durch Aceton-Präzipitation entfernt (↗ 3.13). Eine Sialinsäurebestimmung der Proteine wurde mittels Bial-Test durchgeführt (↗ 3.21). Vergleichend wurde die Sialinsäurebestimmung von nativem und desialyliertem Fetuin aufgeführt.

Probe	Sialinsäure / Protein	Sialinsäuren / Protein
natives Fetuin	0,11 g / g Fetuin	16,5 mol / mol Fetuin
natives IgM	0,035 g / g IgM	113 mol / mol IgM
IgM-H	0,030 g / g IgM-H	97 mol / mol IgM-H
Fetuin-sH / IgM-sH	(nicht nachweisbar)	(nicht nachweisbar)

**Abbildung 10** Sialinsäure-abhängige Bindung von CD22-Fc an IgM sowie CD22-Fc und MAG-Fc an Fetuin.

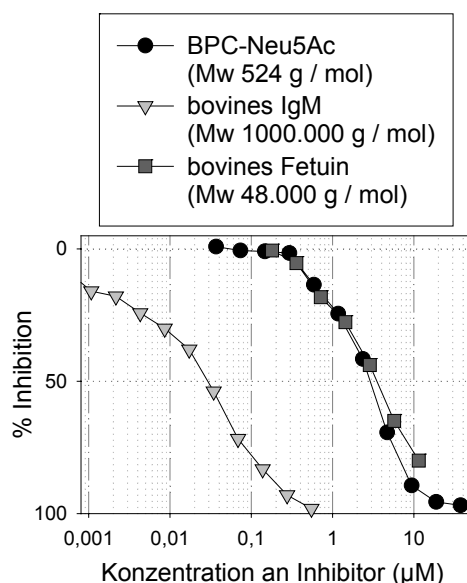
**A)** Eine Mikrotiterplatte wurde nach Protokoll A mit IgM, IgM-H und IgM-sH beschichtet. Es wurden 10 µL 1 µg/mL CD22-Fc, 10 µL 1:1000 verdünnter Anti-huIgG-AP und 10 µL Puffer, IgM-H, IgM-sH oder BPC-Neu5Ac in den angegebenen Konzentrationen eingesetzt und 4 h inkubiert. Die Bindung von CD22-Fc an das Zielmolekül und in Anwesenheit potentieller Inhibitoren wurde auf die Bindung von CD22-Fc an IgM (100%) bezogen.

**(B)** 100 µg Fetuin wurden mit 100µl *GlycoCleave*®VCS für 3 h inkubiert oder mit HCl hydrolysiert. Eine Mikrotiterplatte wurde mit 5 µg/mL nativen oder behandeltem Fetuin beschichtet und anschließend mit BSA blockiert. Immobilisiertes Fetuin wurde zur weiteren Kontrolle mit 10 mU VCS/Well für 60 min bei 37°C behandelt. Es wurden 20 µL 1:1000 verdünnter Anti-huIgG-AP ohne/ mit 0,5 µg/ml Fc-Chimären hinzugefügt und ü.N. inkubiert.

Wie in **Abbildung 10 B** dargestellt, binden CD22-Fc und auch MAG-Fc, das im Gegensatz zu CD22  $\alpha$ 2,3-verknüpfte Sialinsäuren bevorzugt, an Fetuin. Die Bindung an durch Hydrolyse mit HCl desialyliertes Fetuin ist bei beiden Fc-Chimären und die Bindung an VCS-behandeltes Fetuin bei MAG-Fc vollständig reduziert. Die Reduktion bei dem VCS-Fetuin ist bei CD22-Fc geringer, möglicherweise aufgrund der höheren Affinität der *Vibrio cholerae* Sialidase für  $\alpha$ 2,3-verknüpfte Sialinsäuren.

Sowohl durch die saure Hydrolyse der Zielproteine als auch durch Blockierung der Sialinsäure-Bindungsstelle von CD22-Fc durch BPC-Neu5Ac konnte die Bindung von CD22 auf das Niveau der Pufferkontrolle gesenkt werden. Eine Denaturierung der Proteine durch die Hydrolyse und eine unvollständige Immobilisierung an die Plastikoberfläche aufgrund veränderter Oberflächenladung konnte aber nicht ausgeschlossen werden. Die Pufferkontrolle wurde als allgemeine Kontrolle für die unspezifische Bindung eingesetzt (☞ 3.18.4).

In einem weiteren Versuch wurde die Potenz von IgM-H und IgM-sH im Vergleich zu BPC-Neu5Ac überprüft, die Bindung von CD22-Fc an IgM zu inhibieren (☞ **Abbildung 10 A**). Es konnte keine messbare Inhibition der Sialinsäure-abhängigen Bindung von CD22-Fc durch desialyliertes IgM-sH erzielt werden, während sialyliertes IgM-H und BPC-Neu5Ac eine Inhibition von über 95 % bei den angegebenen Konzentrationen erzielte. In Titrationsexperimenten wurden die  $IC_{50}$ -Werte von Fetuin ( $4 \mu\text{M}$ ), IgM ( $0,03 \mu\text{M}$ ) und BPC-Neu5Ac ( $3 \mu\text{M}$ ) bestimmt (☞ **Abbildung 11**). Danach inhibiert IgM 100-fach besser als Fetuin und BPC-Neu5Ac. Bezieht man die  $IC_{50}$ -Werte allerdings auf die Konzentrationen an proteingebundener Sialinsäuren (☞ **Tabelle 5**), erhält man mit  $3,4 \mu\text{M}$  Sialinsäuren für IgM und  $3 \mu\text{M}$  Sialinsäuren für BPC-Neu5Ac ähnliche  $IC_{50}$ -Werte, während das Inhibitionspotential der Sialinsäure von Fetuin mit einem  $IC_{50}$ -Wert von  $54 \mu\text{M}$  Sialinsäuren etwa 10-fach schwächer ist.



**Abbildung 11** Sialinsäure-abhängige Inhibition der Bindung von CD22-Fc an IgM durch BPC-Neu5Ac und Glykoproteine wie IgM und Fetuin.

Eine 384-Well-Platte wurde nach Protokoll B mit IgM beschichtet und die Bindung von komplexiertem CD22-Fc in Anwesenheit von IgM, Fetuin oder BPC-Neu5Ac in den angegebenen Konzentrationen nach 4 h bestimmt.

Durch kompetitive Inhibition konnte die Bindung von CD22-Fc an IgM konzentrationsabhängig sowohl durch sialylierte Glykoproteine als auch durch das Sialinsäurederivat BPC-Neu5Ac reduziert werden.

In weiteren Experimenten wurden die Reaktionsvolumina und Inkubationszeiten weiter reduziert und damit den 384-Well-Platten angepasst (↪ 3.18.2 Protokoll B).

Der IgM-Mikrotiterplatten-Bindungstest wurde als Standardtest für Inhibitions- und Bindungsstudien mit Sialinsäurederivaten, Milchproteinen und -peptiden sowie mit den CD22-Fc Mutanten eingesetzt.

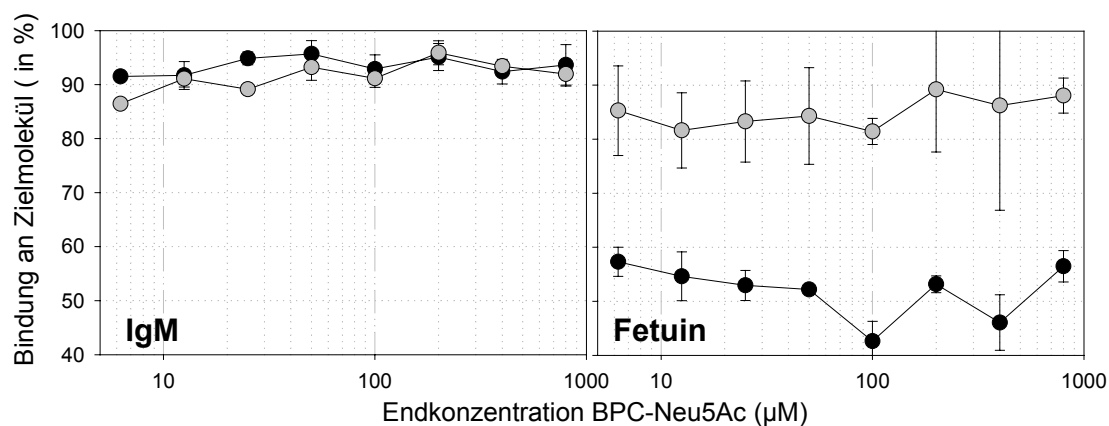
#### 4.4 Charakterisierung der Sialinsäure-abhängigen Bindung von CD22

##### 4.4.1 Analyse der Bindung von CD22-Fc Wildtyp

Verschiedene Glykoproteine/-peptide sowie Sialinsäurederivate wie BPC-Neu5Ac sollten als Inhibitoren der Sialinsäure-abhängigen Bindung von CD22 untersucht werden. Dabei ist grundsätzlich zwischen folgenden zwei Vorgängen zu unterscheiden:

- 1.) **Hemmung** der CD22-Bindung an ein sialyliertes Zielmolekül als kompetitiver Inhibitor, d.h. kann der Inhibitor in einer Coinkubation mit CD22-Fc dessen Anbindung verhindern.
- 2.) **Verdrängung** des bereits gebundenen CD22-Fc, d.h. kann der Inhibitor eine etablierte und möglicherweise durch Vernetzung der CD22-Fc/Anti-huIgG-Komplexe weiter stabilisierte Bindung von CD22 an ein sialyliertes Zielmolekül aufheben.

Mittels Mikrotiterplatten-Bindungstest und Bindungsanalysen mit dem *IA<sub>sys</sub>*<sup>TM</sup> wurde BPC-Neu5Ac auf seine Fähigkeit getestet, CD22 aus der Sialinsäure-abhängigen Bindung mit Fetuin und IgM zu verdrängen. Wie aus **Abbildung 12** ersichtlich, konnte weder durch 1-stündige Inkubation noch durch Konzentrationen von 0,8 mM BPC-Neu5Ac CD22-Fc aus der Bindung mit IgM verdrängt werden.



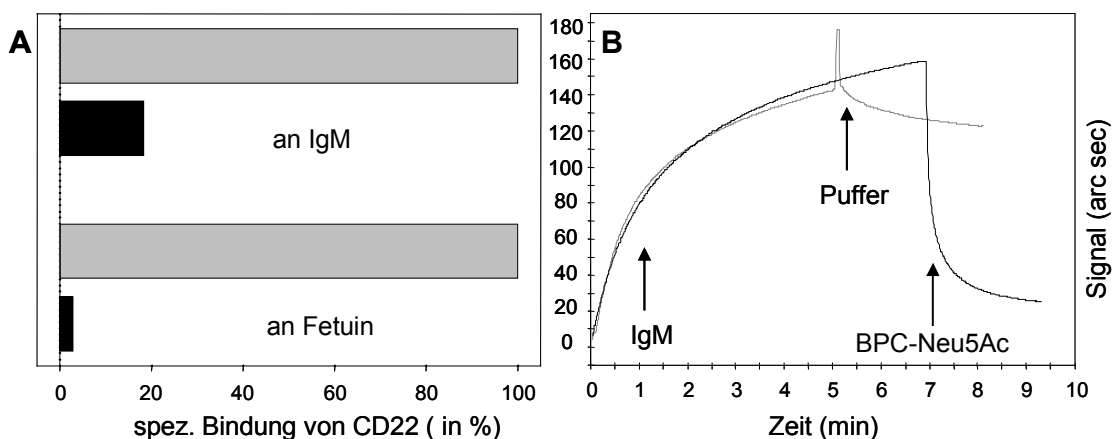
**Abbildung 12** Verdrängung von CD22-Fc aus der Sialinsäure-abhängigen Bindung an IgM und Fetuin durch BPC-Neu5Ac.

Eine 384-Well-Platte wurde nach Protokoll A mit IgM (links) oder Fetuin (rechts) beschichtet. Komplexiertes CD22-Fc (0,4 µg/mL) wurde ü.N. inkubiert und ungebundene Komplexe durch Waschen entfernt. Die Wells wurden 60 min mit BPC-Neu5Ac (schwarz) oder zunächst 55 min mit Puffer und dann mit BPC-Neu5Ac (grau) in den angegebenen Konzentrationen inkubiert. Angegeben ist die Bindung als % der Bindung, die in dem Parallelansatz ohne BPC-Neu5Ac ermittelt wurde.



Dagegen ist es möglich, bei gleichem Versuchsansatz CD22-Fc aus der bestehenden Bindung an Fetuin durch BPC-Neu5Ac zu verdrängen. Eine Verlängerung der Inkubationsdauer mit BPC-Neu5Ac von 5 Minuten auf 60 Minuten führte zu einer stärkeren Dissoziation von CD22-Fc/Anti-huIgG-AP-Komplexen. Es wurde keine Konzentrationsabhängigkeit bei der Verdrängung im Bereich der im Test eingesetzten BPC-Neu5Ac-Konzentrationen beobachtet werden. Der Befund, dass Fetuin leichter aus der Bindung an CD22-Fc verdrängt werden kann als IgM, ist in Einklang mit den Ergebnissen der Bindungs- und Inhibitionsexperimente, die in Kapitel 4.3.2 beschrieben wurden. Es wurde vermutet, dass durch Vernetzung der CD22-Fc/Anti-huIgG-Komplexe eine weitere Stabilisierung der Bindung von CD22-Fc an das sialylierte Zielmolekül erfolgte.

In weiteren Experimenten, in denen die Bindung von Siglec-Fc/Anti-huIgG-AP-Komplexen in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer an sialylierten Zielmolekülen getestet wurden, konnte gezeigt werden, dass nach 2 Stunden eine über 80-%ige und nach 4 Stunden eine vollständige Anbindung erfolgt war (Daten nicht gezeigt). Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die Inkubationsdauer der CD22-Fc/Anti-huIgG-AP-Komplexe von 16 Stunden auf 4 Stunden reduziert. Die Möglichkeit, CD22-Fc aus der nach 2 Stunden bereits erfolgten Bindung an IgM oder Fetuin zu verdrängen, wurde durch Zugabe von BPC-Neu5Ac oder Puffer zu den Komplexen nach 120 Minuten ermittelt (**Abbildung 13 A**). Unter diesen Bedingungen wurden durch 150  $\mu\text{M}$  BPC-Neu5Ac 80 % der CD22-Fc/Anti-huIgG-AP-Komplexe vom IgM und 95% vom Fetuin verdrängt.



**Abbildung 13** Verdrängung von CD22-Fc aus der Bindung an sialylierte Zielmoleküle durch BPC-Neu5Ac und Nachweis der Dissoziation von IgM durch Bindungsstudien im *IAsys*.

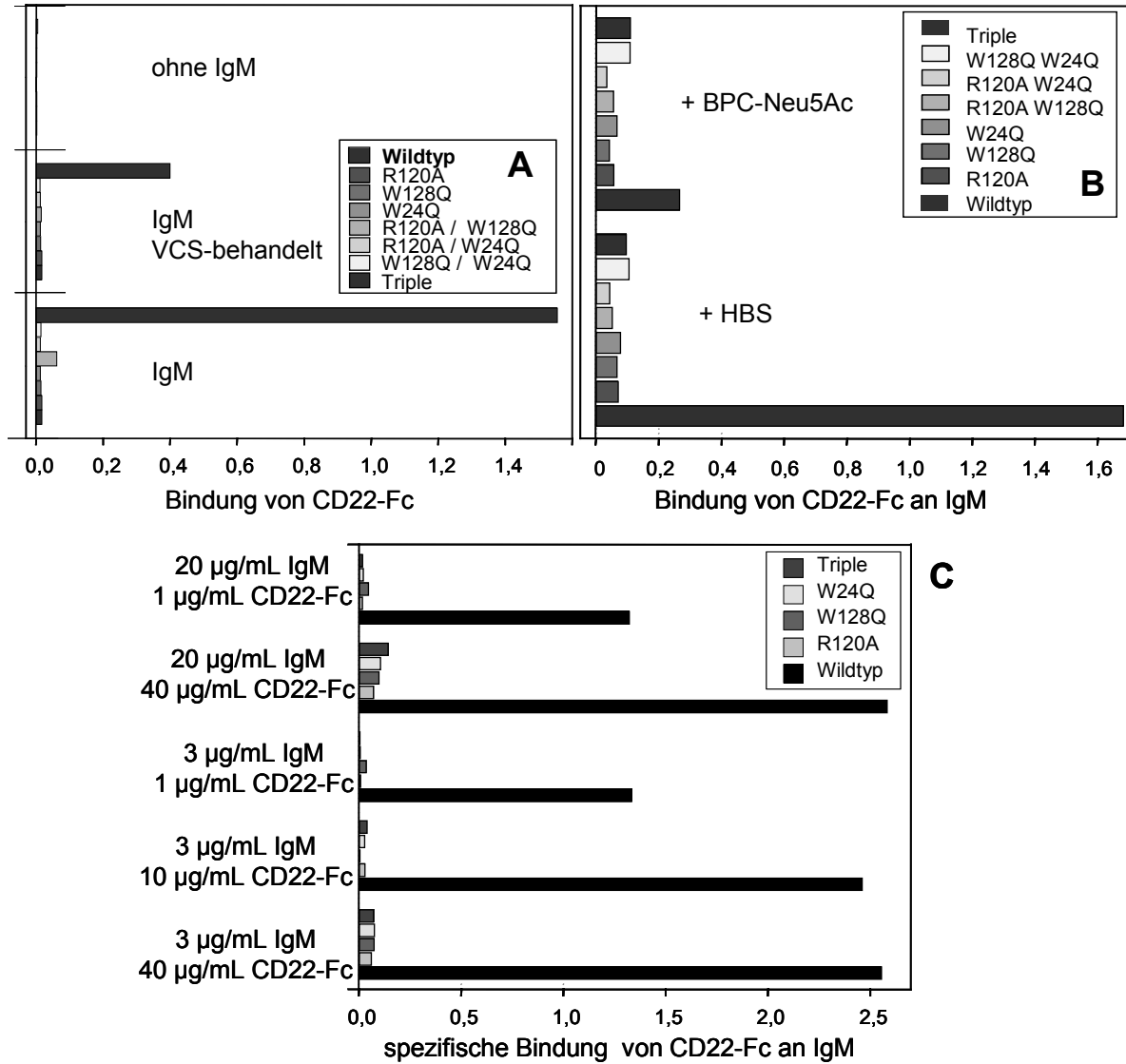
**(A)** CD22-Fc/Anti-huIgG-AP-Komplexe wurden nach Protokoll B in IgM- bzw. Fetuin-beschichteten Wells einer Mikrotiterplatte inkubiert. Nach 120 min wurde zu einem Teil der Ansätze (schwarz) BPC-Neu5Ac (Endkonzentration 150  $\mu\text{M}$ ) zugegeben. Nach weiteren 120 Minuten wurde die Menge gebundener Fc-Chimären bestimmt. Angegeben ist die Bindung als % der Bindung, die in dem Parallelansatz ohne BPC-Neu5Ac (grau) ermittelt wurde.

**(B)** Bindungsanalysen im *IAsys*<sup>TM</sup> mit einem immobilisierten Anti-huIgG mit gebundenem CD22-Fc (0,7 ng). Die Abbildung zeigt den zeitlichen Verlauf der Bindung von IgM an CD22-Fc in Gegenwart von 10  $\mu\text{M}$  IgM. Die Dissoziation des gebundenen IgMs wurde durch Waschen mit HBS-Puffer (grau) beziehungsweise die Zugabe von BPC-Neu5Ac (Endkonzentration 9  $\mu\text{M}$ , schwarz) eingeleitet ( $\approx 3.20$ ).

Während in den zuvor beschriebenen Experimenten versucht wurde, gebundene Komplexe aus CD22-Fc und anti-Fc-Antikörpern aus der Bindung an immobilisierte Glykoproteine zu verdrängen, konnte im *IAsys* untersucht werden (☞3.20), ob BPC-Neu5Ac in der Lage ist, gebundenes IgM aus der Bindung an Antikörper-gekoppelte CD22-Fc-Chimären zu verdrängen (☞**Abbildung 13 B**). Außerdem konnte in diesen Experimenten der zeitliche Verlauf der Assoziation und Dissoziation des IgMs verfolgt werden. Nach 5 Minuten hatten etwa 0,83 ng IgM gebunden (entsprechend 125 arc sec). Dies entspricht 0,17 % des eingesetzten IgMs. Durch Zugabe von 9  $\mu$ M BPC-Neu5Ac konnten 80 % des gebundenen IgMs vom CD22-Fc innerhalb von 2 Minuten verdrängt werden.

#### **4.4.2 Bedeutung der Mutationen in der Bindungsdomäne des CD22 für die Sialinsäure-Bindung**

Um den Einfluss der durchgeführten Mutationen des CD22 zu analysieren, wurden die entsprechenden Fc-Chimären als isolierte Proteine im IgM-Mikrotiterplatten-Bindungstest eingesetzt (☞**Abbildung 14 A**). Die Mutanten zeigten weder eine Bindung an unbehandeltes noch an *Vibrio cholerae* Sialidase-behandeltes IgM. Die nicht-nachweisbare Bindung der Mutanten könnte an einer zu niedrigen Belegungsdichte der Oberfläche mit den Zielmolekülen (IgM) oder an einer zu niedrigen Konzentration der CD22-Fc/Anti-huIgG-AP-Komplexe liegen. Daher wurden Versuche mit höheren Konzentrationen von CD22-Fc sowie des IgMs durchgeführt. Durch Erhöhung der Konzentration an CD22-Fc Wt konnte eine Erhöhung der spezifischen Bindung erzielt werden, nicht dagegen durch eine erhöhte IgM-Konzentration. Letzteres ist durch die begrenzte Bindungskapazität des Plastiks zu erklären. Auch die Bindung der Mutanten konnte bei sehr hohen Konzentrationen (40 $\mu$ g/mL), wenn auch nur sehr gering, erhöht werden (☞**Abbildung 14 C**). Während die Bindung von CD22-Fc Wt an IgM durch BPC-Neu5Ac inhibiert wurde, also Sialinsäure-abhängig ist, konnten keine Unterschiede in der Bindung der Mutanten in Anwesenheit von BPC-Neu5Ac detektiert werden (☞**Abbildung 14 B**).



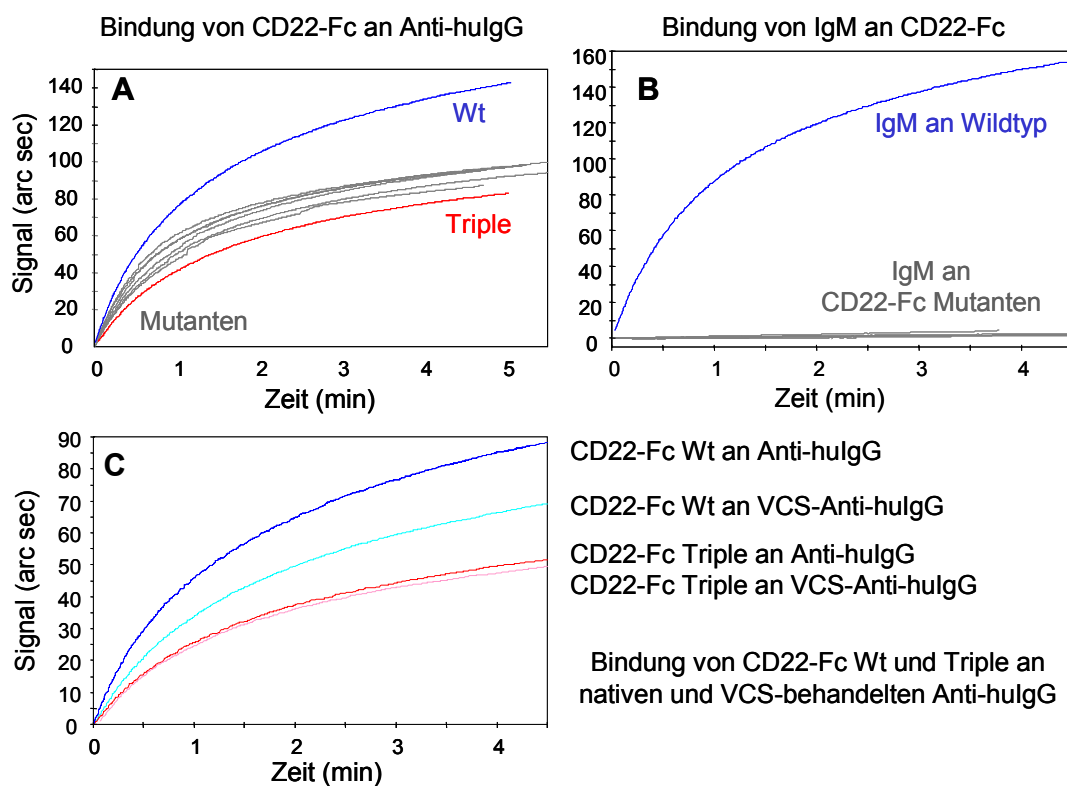
**Abbildung 14** Analyse der Sialinsäure-abhängigen Bindung von CD22-Fc Mutanten.

**A** Eine 384-well-Platte wurde nach Protokoll B mit IgM beschichtet, VCS-behandelt und die Komplexe von CD22-Fc Wt und Mutanten hinzugefügt und 4 h inkubiert. Die Bindung wurde für immobilisiertes IgM, VCS-behandeltes IgM sowie für die Kontrolle ohne IgM nachgewiesen.

**B** Eine 384-well-Platte wurde nach Protokoll B beschichtet. Es wurden 40 µg/mL CD22-Fc Wildtyp und Mutanten (komplexiert mit 1:25 verdünntem Anti-huIgG-AP in 5 µL) hinzugefügt und 4 h in An- und Abwesenheit von 5 µL 1 mM BPC-Neu5Ac inkubiert. Dargestellt wird die Bindung von CD22-Fc Wildtyp und den Bindungsmutanten.

**C** Eine 384-well-Platte wurde nach Protokoll B mit den angegebenen Konzentrationen an IgM beschichtet. Es wurden Komplexe in verschiedenen Konzentrationen hinzugefügt und 4 h inkubiert (1µg/mL CD22-Fc mit 1:1000 Anti-huIgG-AP, 10µg/mL CD22-Fc mit 1:100 Anti-huIgG-AP, 40µg/mL CD22-Fc mit 1:25 Anti-huIgG-AP in je 5µL ).

In Bindungsstudien im *IAsys* konnten ebenfalls keine Hinweise auf eine Sialinsäure-abhängige Bindung der CD22-Fc Mutanten an IgM nachgewiesen werden (⇨ **Abbildung 15**). Bei diesen Versuchen wurde beobachtet, dass die Bindung von CD22-Fc Wt und Mutanten an den immobilisierten Anti-huIgG trotz gleicher Konzentrationen der Fc-Chimären unterschiedlich hoch war (⇨ **Abbildung 15 A**). Nach dem Entfernen ungebundener Fc-Chimären durch Waschen (nicht gezeigt) konnte eine Anbindung von ca. 120 Winkelsekunden beim Wt und ca. 70 Winkelsekunden bei den Mutanten detektiert werden, was 0,8 ng (6,5 fmol) gebundenem CD22-Fc Wt und ca. 0,47 ng (3,9 fmol) gebundener CD22-Fc Mutanten entspricht. Auch mit höheren Konzentrationen an Fc-Chimären konnte keine höhere Bindung der CD22-Fc Mutanten erzielt werden (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 15** Bindungsstudien im *IAsys* mit IgM und CD22-Fc Wt und Mutanten.

An eine Carboxylatoberfläche einer *IAsys*<sup>TM</sup>-Küvette wurden 9,9 ng Anti-huIgG (68,5 fmol) immobilisiert.

(A) Zugabe von 500 ng CD22-Fc Wt und Mutanten : Signal nach Entfernen ungebundener Fc-Chimären (nicht gezeigt): 120 arc sec (0,8 ng) beim WT und ca. 70 arc sec (0,47 ng) bei den Mutanten.

(B) Zugabe von 500 ng IgM zu den gebundenen CD22-Fc-Chimären (nach dem Waschschrift 120 arc sec: 0,8 ng CD22-Fc Wt)

(C) Nach Regeneration des Anti-huIgG mit Glycin pH 3 wurde in einer Zelle der Anti-huIgG mit 10mU VCS in 50  $\mu$ L VCS-Puffer für 1 h bei 37°C behandelt. Anschließend wurde bei beiden Zellen 500 ng CD22-Fc Wt (Signal nach dem Waschen: 80 arc sec und 60 arc sec) und nach einem Regenerationsschritt 500 ng CD22-Fc Triple eingesetzt (Signal 40 arc sec).

Zur Kontrolle wurde der Anti-huIgG in einer Küvettenzelle mit *Vibrio cholerae* Sialidase behandelt. Bei erneuter Zugabe der CD22-Fc-Chimären zeigte sich, dass die Bindung von CD22-Fc Wt an den VCS-behandelte Anti-huIgG niedriger war (☞ **Abbildung 15 C**). Es wurden 0,53 ng (4,3 fmol) CD22-Fc Wt an den unbehandelten Anti-huIgG gebunden, aber nur 0,4 ng (3,2 fmol) an den VCS-behandelten Anti-huIgG. Dies könnte durch den Verlust von Antikörpermolekülen während der Regenerationsschritte erklärt werden. Jedoch wurde keine Änderung bei der Anbindung der CD22-Fc Dreifachmutante detektiert. Allerdings war die Bindung mit 0,27 ng (2,2 fmol) etwas geringer als beim Wt an den VCS-behandelten Anti-huIgG. Dieser Befund legt nahe, dass ein Teil der Bindung der CD22 Wt Fc-Chimären über Sialinsäuren auf dem immobilisierten anti-Fc-Antikörper vermittelt wird. Die Tatsache, dass auch nach VCS-Behandlung die Anbindung von CD22 Wt Fc-Chimären noch etwas höher war als bei der Mutante könnte daran liegen, dass die Sialidase-Behandlung nicht zu einem vollständigen Verlust der  $\alpha$ 2,6-verknüpften Sialinsäure führte.

Es muss berücksichtigt werden, dass CD22-Fc Wt Moleküle, die über Sialinsäure an die Antikörpermoleküle gebunden sind, nicht für eine Bindung von IgM zur Verfügung stehen.

Nach Zugabe von 500 ng IgM (500 fmol) wurde eine deutliche Bindung an CD22-Fc Wt beobachtet, die nach 4 Minuten eine Signalerhöhung von 140 Winkelsekunden erreichte (☞ **Abbildung 15 B**). Nach dem Entfernen ungebundener Fc-Chimären verblieben etwa 0,93 ng (0,93 fmol) gebundenes IgM. Dagegen konnte keine Bindung von IgM an die CD22-Fc Mutanten beobachtet werden.

## 4.5 Einfluss von Milchglykoproteinen und -peptiden auf die Sialinsäure-abhängige Bindung von CD22

### 4.5.1 Darstellung der verwendeten Milchproteine/-peptide

In Bindungsstudien mit CD22-Fc sollten native und proteolytisch verdaute Milchproteine unterschiedlicher Herkunft auf Interaktionen mit CD22-Fc getestet werden.

Dazu wurden von Milupa Research aus humaner, boviner und Kamel-Milch zunächst durch Säurepräzipitation bei pH 4,6 die Caseine an ihrem isoelektrischen Punkt ausgefällt. Dadurch werden die beiden Milchproteinfraktionen Caseine und Molkenproteine getrennt. Mit diesen Proteinfraktionen wurden enzymatische Hydrolysen durchgeführt. Dabei handelte es sich in der Regel um einen tryptisch/chymotryptischen Verdau. In ersten Versuchen wurden die Kamel-Caseine und bovines Laktoferrin zunächst nur mit Trypsin verdaut. Die Verdauungsenzyme wurden durch Erhitzung inaktiviert und die Proben lyophilisiert. Weiterhin wurden die Milchproteinhydrolysate säulenchromatographisch aufgetrennt. Der erste Schritt war dabei eine Gelpermeationschromatographie (GPC) mit einer Ausschlussgrenze von 3000 Da für globuläre Proteine. Die Fraktion GPC-1 enthielt mit dem Ausschlussvolumen eluierte proteolytische Produkte. Eine weitere Subfraktionierung der GPC-Fraktionen erfolgte durch *Reversed-Phase*-Chromatographie (RPC). Der Durchlauf (Fraktion RPC-3) der jeweils aufgetragenen GPC-Fraktion enthielt die stark hydrophilen Proteine/Peptide sowie Salze und freie Sialinsäuren. In der letzten Fraktion, RPC-6, wurden die am meisten hydrophoben Peptide/Proteine angereichert. Die Hydrophobizität korrelierte in der Regel mit der Größe der Moleküle (Milupa Research, persönliche Mitteilung). Alle Fraktionen wurden in lyophilisierter Form zur Verfügung gestellt. Für ihren Einsatz wurden sie gelöst und auf einen physiologischen pH von 7,4 eingestellt (⇨ 2.4).

In den folgenden Kapiteln werden die Produkte des proteolytischen Verdaus der Milchproteine vereinfacht als Peptide bezeichnet, obwohl auch unverdaute Proteine vorhanden sein können. Caseine und Molkenproteine sind Proteinfraktionen mit einer heterogenen Zusammensetzung aus verschiedenen Proteinen. Die Zusammensetzung kann z.T. auch von der Art der Aufarbeitung der Milch abhängig sein (Milupa Research, persönliche Mitteilung;)

### 4.5.2 Einfluss von Milchproteinen und-peptiden auf die Bindung von CD22 an IgM

Ein Ziel dieser Arbeit war es zu prüfen, ob Milchproteine und die daraus abgeleiteten Peptide Bindungspartner für CD22 enthielten. Um einen Überblick über Vorkommen und Stärke der Interaktionen von verschiedenen Milchfraktionen mit CD22 zu erhalten, wurden sie im IgM-Mikrotiterplatten-Bindungstest eingesetzt (⇨ Abbildung 5 , 3.18.1).

Glykosylierte Proteine und Peptide verhalten sich in Inhibitionstests anders als monovalente Monosaccharide wie das BPC-Neu5Ac. In diesem Zusammenhang ist vor allem wichtig, dass sie mehrere sialylierte Glykane enthalten können, die zu einer oligo- oder multivalenten Präsentation der Sialinsäure führen. Der Einfluss der Präsentation auf das inhibitorische Potential kann auch deutlich von der Konformation des Gesamtmoleküls abhängen. Zwischen verschiedenen Messreihen konnte es daher zu Unterschieden in den  $IC_{50}$ -Werten kommen. Auch die Konzentration der eingesetzten CD22-Fc-Chimären und des Anti-huIgG-AP sowie der lagerungsbedingte Zustand der aufgereinigten CD22-Fc-Chimären konnten zu diesen Schwankungen führen. Zudem war eine genaue Angabe der  $IC_{50}$ -Werte anhand der Molaritäten nicht möglich, da keine Massenbestimmung der verschiedenen Milchfraktionen vorlag bzw. es sich bei den Fraktionen um Gemische verschiedener Moleküle handelte. Aus diesem Grund werden im folgenden nur die relativen inhibitorischen Potentiale (rIP) bezogen auf eine interne Referenzmilchfraktion, die humanen Caseine, aufgeführt (↪ 3.18.4).

#### **4.5.3 Einfluss von Caseinen und Caseinpeptiden auf die Bindung von CD22 an IgM**

In **Tabelle 6** wurden die rIPs humaner, boviner und Kamel-Caseine, ihrer Peptide sowie einzelner Subfraktionen der Peptide gegenübergestellt. Die höchste Inhibition wurde bei humanen Caseinen gefunden, die als interne Referenz dienten. Sie inhibierten 5-fach besser als unverdaute Kamel-Caseine und 50-fach besser als bovine Caseine. Proteolytischer Verdau der Caseine führte in der Regel zu einer Reduktion des inhibitorischen Potentials. Dies war am deutlichsten bei den humanen Caseinen, bei denen die Hydrolyseprodukte 10-fach schlechter inhibierten als unverdaute Caseine. Damit waren die relativen Inhibitionspotentiale für Caseinpeptide aus humaner Milch und aus Kamelmilch ungefähr gleich und immer noch deutlich höher als das Inhibitionspotential der unverdauten bovinen Caseine. Nach säulenchromatographischer Auftrennung mittels GPC konnte das Inhibitionspotential der unfraktionierten Caseinpeptide fast ausschließlich im Ausschlussvolumen (GPC-1) wiedergefunden werden. Nach der weiteren Subfraktionierung mittels RPC wurde ein messbares rIP nur noch bei Peptiden aus humanen Caseinen (RPC-3, RPC-4 und RPC-6) gefunden.

Die höchsten Sialinsäurekonzentrationen wurden in den GPC-1 Fraktionen und deren RPC-Fraktionen 3 und 4 gefunden. Beim Vergleich der Sialinsäurekonzentrationen mit den rIPs fällt auf, dass alle Fraktionen, bei denen ein rIP nachgewiesen wurde, relativ viel Sialinsäuren enthalten. Allerdings bedeutet dies nicht, dass eine hohe Sialinsäurekonzentration auch zu einem hohen rIP führt. Beispielsweise ist der Sialinsäuregehalt der aus GPC-1 abgeleiteten Subfraktionen RPC-3, RPC-4 und RPC-6 bei humanen Caseinpeptiden und den entsprechenden Peptiden aus Kamelmilch ähnlich hoch. Jedoch wurde nur bei humanen Caseinen bei diesen Fraktionen ein rIP gefunden, jedoch nicht bei den entsprechenden Fraktionen aus Kamelmilchhydrolysaten.

**Tabelle 6** Relative Inhibitionspotentiale (rIP in %) von humanen, bovinen und Kamel-Caseinen und ihren Präparationen auf die Bindung von CD22-Fc an IgM.

Die Referenzsubstanz humane Caseine ist weiß auf schwarz hervorgehoben, die Präparationen mit einem rIP >9 % wurden dunkelgrau, mit einem rIP >3 % hellgraugrau unterlegt. Die Menge an Sialinsäuren ist in µg pro mg Probe angegeben. Kamel-Caseine wurden tryptisch; humane und bovine Caseine tryptisch/chymotryptisch verdaut. (Die bei höchster Konzentration maximal erreichte Inhibition ist in Klammern angegeben; ↷Tabelle 3 in 3.18.4)

Fraktion	humane Caseine		Kamel-Caseine		bovine Caseine	
	rIP %	µg Sia	rIP %	µg Sia	rIP %	µg Sia
Unverdaut	100	10,4	21,8	6,2	2,3	2,3
Hydrolysiert	9,5	14,9	11,8	9,5	< 1,4 (25%)	3,1
GPC-1	4,0	20,0	15,0	34,5	< 1,4 (25%)	8,5
GPC-2	0,1	0,2	<< 2,6 (15%)	1,2	<< 1,4 (15%)	1,1
GPC-3			<< 2,6 (20%)	1,3	<< 1,4 (15%)	0,4
GPC-4			<< 2,6 (15%)	1,1		
GPC-5			<< 2,6 (20%)	1		
GPC-6			<< 2,6 (15%)	0,6		
GPC-7			<< 2,6 (0%)	2,2		
GPC-1 RPC-3	4,0	33,3	<< 2,6 (0%)	13,8		
GPC-1 RPC-4	3,0	60,7	<< 2,6 (10%)	79,9		
GPC-1 RPC-5	0,9	5,1	< 2,6 (25%)	27,8		
GPC-1 RPC-6	3,6	8,3	(<) 2,1	11,6		
GPC-2 RPC-3			<< 2,6 (15%)	0,9		
GPC-2 RPC-4			<< 2,6 (15%)	0,5		
GPC-2 RPC-5	0,1	0,1	<< 2,6 (15%)	1,4		
GPC-2 RPC-6	0,1	4,2	<< 2,6 (15%)	1,5		

#### 4.5.4 Einfluss von Molkenproteinen und ihren Peptiden auf die Bindung von CD22 an IgM

In **Tabelle 7** wurden die rIPs, bezogen auf humane Caseine, von humanen und bovinen Molkenproteinen, deren Peptiden und Peptidsubfraktionen zusammengefasst und mit den Fraktionen aus humanen Caseinen verglichen. Zunächst fällt auf, dass keine der Peptidfraktionen der Molkenproteine einen rIP über 20 % hat.

Es zeigt sich, dass bei den bovinen Molkenproteinen die enzymatische Hydrolyse zu einem höheren rIP (12,7 %) gegenüber den unverdauten Molkenproteinen (rIP < 1,4 %) führte. Bei der Fraktionierung der bovinen Molkeproteinpeptide mittels GPC konnten die inhibitorischen Proteine/Peptide in der Fraktion GPC-1 etwas angereichert werden (rIP 19 %). Bei den GPC-Fraktionen korrelierte der Sialinsäuregehalt mit den rIPs. Eine weitere Subfraktionierung der bovinen Peptide mittels RPC erfolgte nicht.



**Tabelle 7** Relative Inhibitionspotentiale (rIP in %) von humanen und bovinen Molkenproteinen, und ihrer unfraktionierten und säulenchromatographisch fraktionierten proteolytischen Produkte.

Als Referenz wurden humane Caseine (rIP 100 %) verwendet (weiß auf schwarz). Die Präparationen mit einem rIP >9 % sind dunkelgrau, mit einem rIP >3 % hellgrau unterlegt. Der Sialinsäuregehalt ist in µg pro mg Probe angegeben. Alle Proteine wurden tryptisch/chymotryptisch verdaut. (Die bei höchster Konzentration maximal erreichte Inhibition ist in Klammern angegeben; ↯Tabelle 3 in 3.18.4)

Fraktion	humane Caseine		humane Molkenproteine		bovine Molkenproteine	
	rIP in %	µg Sia	rIP in %	µg Sia	rIP in %	µg Sia
Unverdaut	100	10,4	4,2	11,9	< 1,4 (25%)	10,0
Hydrolysiert	9,5	14,9	4,0	25,7	12,7	13,7
GPC-1	4,0	20,0	7,7	26,0	19,0	17,3
GPC-2	0,1	0,2	1,8	13,8	2,6	10,3
GPC-3			<< 1,4 (10%)	6,7	<< 1,4 (20%)	4,3
GPC-4			<< 1,4 (20%)	1,1		
GPC-5						
GPC-6			< 1,4 (40%)	4,1		
GPC-7			< 1,4 (30%)	2,0		
GPC-8			< 1,4 (30%)	0,2		
GPC-1 RPC-3	4,0	33,3	15,0	40,0		
GPC-1 RPC-4	3,0	60,7	1,8	19,9		
GPC-1 RPC-5	0,9	5,1	4,0	8,9		
GPC-1 RPC-6	3,6	8,3	12,2	6,0		
GPC-2 RPC-3			5,1	12,9		
GPC-2 RPC-4			0,2	2,6		
GPC-2 RPC-5	0,1	0,1				
GPC-2 RPC-6	0,1	4,2	0,4	2,4		
GPC-3 RPC-3			<< 1,4 (20%)	11,9		
GPC-4 RPC-3			<< 1,4 (10%)	0,0		
Laktoferrin			13,0	7,9		
Laktoferrin tryptisch					5,2	9,7

Auch bei humanen Molkenproteinen konnten höhere rIPs in den Peptidfraktionen mit höherem Sialinsäuregehalt beobachtet werden. Im Gegensatz zu den bovinen Molkenproteinen zeigte die rIPs von unverdauten und verdauten humanen Molkenproteinen kaum Unterschiede. Wie bei den bovinen Peptiden, wurde eine Anreicherung inhibitorisch aktiver Moleküle in der Fraktion GPC-1 gegenüber GPC-2 bis GPC-8 beobachtet. Diese Anreicherung wurde durch die RPC fortgeführt. Die Peptide von RPC-3 und RPC-6 zeigten die höchsten rIPs innerhalb der humanen Molkenprotein-Präparationen. Verglichen mit den übrigen inhibitorisch aktiven Fraktionen hatte RPC-6 einen relativ geringen Sialinsäuregehalt.

#### 4.5.5 Einfluss von Proteinen pflanzlicher Herkunft auf die Bindung von CD22 an IgM

Neben den oben beschriebenen Milchproteinhydrolysaten wurden zwei Hydrolysate von Proteinen aus Erbsen und Soja untersucht. In **Tabelle 8** wurden die Ergebnisse dieser Untersuchungen zusammengefasst und mit denen verschiedener Milchproteinen verglichen. Das inhibitorische Potential der Pflanzenproteinhydrolysate lag unter 1,4% bezogen auf humane Caseine mit 100%.

**Tabelle 8** Relative Inhibitionspotentiale (rIP in %) von Pflanzenproteinhydrolysaten im Vergleich zu Milchproteinhydrolysaten auf die Bindung von CD22-Fc an IgM.

Als Referenz wurden humane Caseine (rIP 100%) verwendet (weiß auf schwarz). Die Hydrolysate mit einem rIP >9% sind dunkelgrau, mit einem rIP >3% hellgrau unterlegt. Der Sialinsäuregehalt ist in µg pro mg Probe angegeben. Alle Proteine wurden tryptisch/chymotryptisch verdaut. (Die bei höchster Konzentration maximal erreichte Inhibition ist in Klammern angegeben; ↗ Tabelle 3 in 3.18.4)

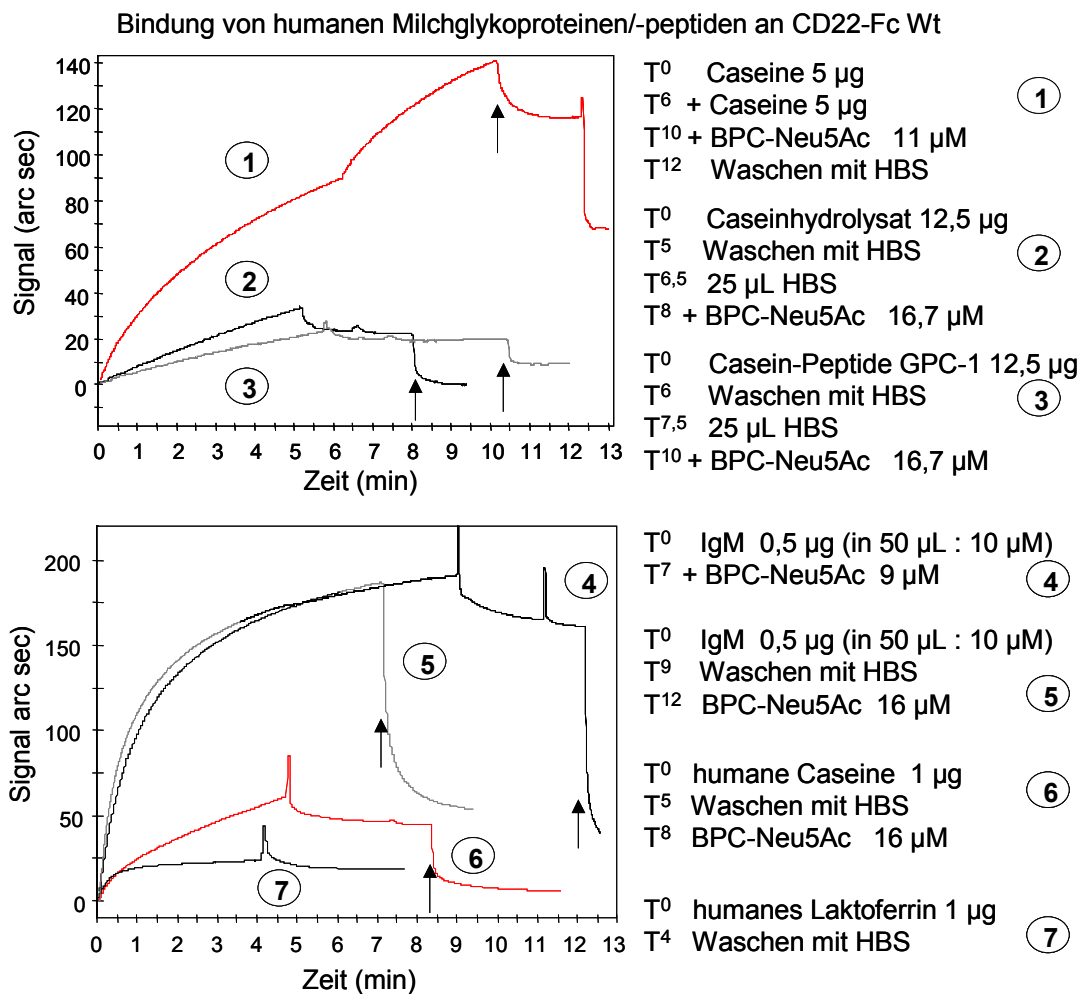
Probe	rIP in %	µg Sia
humane Caseine hydrolysiert	9,5	14,9
humane Molkenproteine hydrolysiert	4,0	25,7
Kamel-Caseine hydrolysiert (tryptisch)	11,8	9,5
bovine Caseine hydrolysiert	< 1,4 (25%)	3,1
bovine Molkenproteine hydrolysiert	12,7	13,7
Erbsenprotein-Isolat	1,4	(nicht nachweisbar)
Erbsenprotein-Isolat hydrolysiert	<< 1,4 (15%)	(nicht nachweisbar)
Sojaproteinhydrolysat <i>Si Brm 4</i>	<< 1,4 (15%)	(nicht nachweisbar)
<b>humane Caseine unverdaut</b>	<b>100</b>	<b>10,4</b>

#### 4.5.6 Bindungsstudien von CD22-Fc mit humanen Caseinen im *IAsys*

Für die Bindungsanalysen im *IAsys*<sup>TM</sup> (↗ 3.20) mit den Milchproteinen wurde eine Carboxymethyl-Dextran (CMD)-Oberfläche eingesetzt. Es wurden 32 ng (~222 fmol) Anti-huIgG an die CMD-Oberfläche immobilisierten und im Mittel 3,2 ng (26 fmol) CD22-Fc gebunden (nicht abgebildet).

Die Zugabe von insgesamt 10 µg humanen Caseinen führte nach 10-minütiger Anbindung zu einem Signal von 140 Winkelsekunden (arc sec) (↗ **Abbildung 16** ①). Die Zugabe von 11 µM BPC-Neu5Ac (T<sup>10</sup> ①) in die Caseinlösung führte zu einer Dissoziation um 25 arc sec. Nach dem Entfernen ungebundener Moleküle (T<sup>12</sup> ①) ergab sich ein Signal von 70 arc sec, was einer Bindung der Caseine von 1,4 ng entspricht. Die Anbindung verdauter humaner Caseine ist trotz erhöhtem Einsatz von 12,5 µg wesentlich geringer als bei unverdauten Caseinen (↗ **Abbildung 16** ②③). Es verblieben nach dem Entfernen ungebundener Moleküle etwa 0,4 ng (T<sup>6-8</sup> ②③). Bei dem Caseinhydrolysat ② entspricht das 6 pg (19 fmol) Sialinsäuren, bei den Peptiden der GPC-1 etwa 8 pg (26 fmol) Sialinsäuren. Die Zugabe von 16,7 µM BPC-Neu5Ac (T<sup>8</sup> ②) bewirkt eine vollständige Dissoziation des Caseinhydrolysates innerhalb von 1,5 Minuten.

Die Zugabe von 16,7  $\mu\text{M}$  BPC-Neu5Ac ( $T^{10,5}$  ③) führte aber nicht zu einer vollständigen Dissoziation der Peptiden der GPC-1 ( $T^{11}$  ③). Neben den humanen Caseinen wurden zum Vergleich Laktoferrin und IgM in den Bindungsexperimenten eingesetzt (↷ **Abbildung 16** ④-⑦). Nach der Anbindung und dem Entfernen ungebundener Moleküle haben nach 0,5  $\mu\text{g}$  Einsatz 3,2 ng IgM gebunden ( $T^{12}$  ④) und nach 1  $\mu\text{g}$  Einsatz 0,9 ng humane Caseine ( $T^8$  ⑥) und 0,4 ng Laktoferrin ( $T^7$  ⑦) an CD22-Fc gebunden. Die Zugabe von 16  $\mu\text{M}$  BPC-Neu5Ac bewirkte eine vollständige Dissoziation der gebundenen Caseine ( $T^{8-12}$  ⑥). Durch Zugabe von 9  $\mu\text{M}$  BPC-Neu5Ac zu 10  $\mu\text{M}$  IgM konnten 80 % des gebundenen IgMs vom CD22-Fc innerhalb von 2 Minuten verdrängt werden.



**Abbildung 16** Bindungsstudien von Caseinen und Caseinpeptiden mit CD22-Fc Wt im *IAsys*.

3,2 ng (0,026 pmol) CD22-Fc waren an 32 ng (0,22 pmol) immobilisierten Anti-huIgG auf einer CMD-Oberfläche gebunden. Zeitpunkte (min), an denen eine Zugabe an Lösung erfolgte oder ein Bindungs- oder Dissoziationsereignis stattfand wird als  $T^X$  angegeben. Pfeile markieren die Zugabe von BPC-Neu5Ac.

Die Bindung wird anhand der Signalstärke nach dem Entfernen ungebundener Moleküle berechnet. Die Abbildung zeigt die Bindung von ① humanen Caseinen, ② Caseinhydrolysat und ③ der GPC-Fraktion 1 der Caseinpeptide außerdem von ④⑤ IgM, ⑥ humanen Caseinen und ⑦ humanem Laktoferrin. In den angegebenen Mengen. Die tatsächliche Bindung nach Entfernen ungebundener Moleküle durch Waschen mit HBS / und Zugabe von BPC-Neu5Ac oder durch direkte Zugabe von BPC-Neu5Ac während der Anbindung wurde verfolgt.

## 4.6 Einfluss von Milchglykoproteinen und –peptiden auf die BZR-abhängige $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung

### 4.6.1 Verwendete Milchproteine und –peptide und die Messung der $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung in B-Zellen

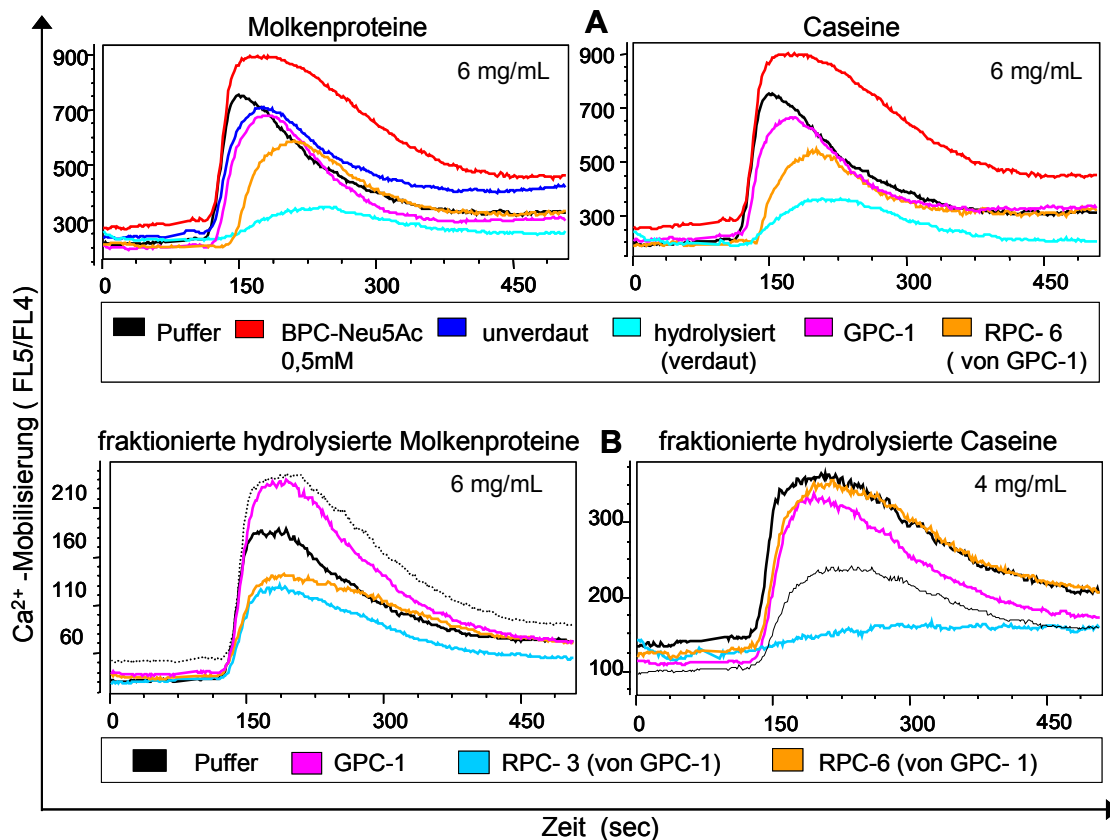
Um eine immunmodulierende Wirkung von Milchproteinen und -peptiden zu untersuchen, wurde ihr Einfluss auf das intrazelluläre BZR-Signal analysiert. Ein direkter Nachweis für die Stärke des BZR-Signals nach Stimulation ist die Veränderung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in der B-Zelle, deren Höhe mit der Stärke des BZR-Signals korreliert. Wenn die inhibitorische Wirkung von CD22 auf das BZR-Signal fehlt, wie in CD22-defizienten B-Zellen oder in B-Zellen, die mit dem CD22-affinem BPC-Neu5Ac inkubiert wurden, tritt eine deutlich höhere und länger anhaltende  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung ein (Nitschke et al., 1997; Kelm et al., 2002).

Für die Analyse der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung wurden Daudi-Zellen, eine humane B-Zelllinie, eingesetzt, die mit dem Calcium-Chelator Indo-1 beladen waren (☞3.22.1). Nach Vorinkubation mit den entsprechenden Proben wurden die Daudi-Zellen mit einem monoklonalen anti-IgM-Antikörper stimuliert (☞2.1.1) und die  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung mittels Durchflusszytometrie gemessen (☞3.22). Durch Zugabe von BPC-Neu5Ac, welches eine hohe Affinität zu CD22 besitzt, kann die inhibitorische Wirkung des CD22 gehemmt werden. Im Vergleich zu den  $\text{IC}_{50}$ -Werten des BPC-Neu5Ac in den *in vitro* Mikrotiterplattentests von ca. 0,4-8  $\mu\text{M}$ , müssen ca. 100-fach höhere Konzentrationen eingesetzt werden (0,5 mM), um eine messbare Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung zu detektieren. Es wurde daher angenommen, dass die Milchfraktionen auch in relativ hohen Konzentrationen ab 1 mg/mL eingesetzt werden müssen, um einen ähnlichen Effekt zu erzielen.

Die eingesetzten Proben wurden basierend auf ihren Inhibitionspotentialen im IgM-Mikrotiterplattentest ausgewählt, bei dem unverdaute humane Caseine am potentesten die Bindung von CD22-Fc an IgM inhibiert hatten. Kamel-Caseine inhibierten ebenfalls, aber schlechter (☞Tabelle 6). Außerdem sollten humane Molkenproteine vergleichend zu humanen Caseinen eingesetzt werden. Auch der Einfluss der Hydrolyse und der säulenchromatographischen Fraktionierung der Peptide wurde analysiert. In den Inhibitionsstudien zeigte sich, dass das inhibitorische Potential der verdauten Milchproteinfraktionen auf die CD22-Bindung hauptsächlich oder ausschließlich nach GPC in GPC-1 wiedergefunden wurde. Nach *Reversed-Phase*-Chromatographie dieser Fraktion zeigten RPC-3 und RPC-6 die beste inhibitorische Wirkung (☞Tabelle 7). Verschiedene Konzentrationen dieser Fraktionen wurden daher in ihrem Einfluss auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung mit Daudi-Zellen getestet. Die erfassten Daten der Messungen wurden in den folgenden Abbildungen mit der Auswertungssoftware FlowJo erstellt. Es wurden die gemittelten Fluoreszenzen von  $\text{Ca}^{2+}$ -gebundenem und ungebundenem Indo-1 als Funktion gegen die Zeit aufgetragen. Die so kalkulierten Kurven mehrerer Messungen wurden zum leichteren Vergleich gemeinsam dargestellt (☞Abbildung 6 in 3.22.2).

#### 4.6.2 Humane Caseine, Molkenproteine und ihre Peptide und ihr Einfluss auf die $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung

In **Abbildung 17 A** wurde der Einfluss von unverdauten und tryptisch/chymotryptisch verdauten humanen Caseinen und Molkenproteinen, ihren säulenchromatographisch aufgetrennten Peptiden aus der Gelpermeationschromatographie Fraktion 1 (GPC-1) und denen aus dieser Fraktion mittels *Reversed-Phase*-Chromatographie aufgetrennten Peptiden Fraktion 6 (GPC-1 RPC-6) auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung im Vergleich zu Puffer und BPC-Neu5Ac dargestellt. Unverdaute humane Caseine konnten nicht eingesetzt werden, da die Trübung der Lösung durch die Caseinmicellen keine korrekte Fluoreszenzmessung zuließ.



**Abbildung 17** Einfluss proteolytischer Produkte humaner Caseine und Molkenproteine auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung in Daudi-Zellen.

(A)  $0,9 \times 10^6$  Indo-1 beladene Daudi-Zellen wurden mit Puffer, BPC-Neu5Ac oder den Casein- und Molkenprotein-Präparationen in den angegebenen Konzentrationen für 8 min bei RT im Dunkeln vorinkubiert. Es wurde mit Anti-IgM ( $0,8 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) stimuliert.

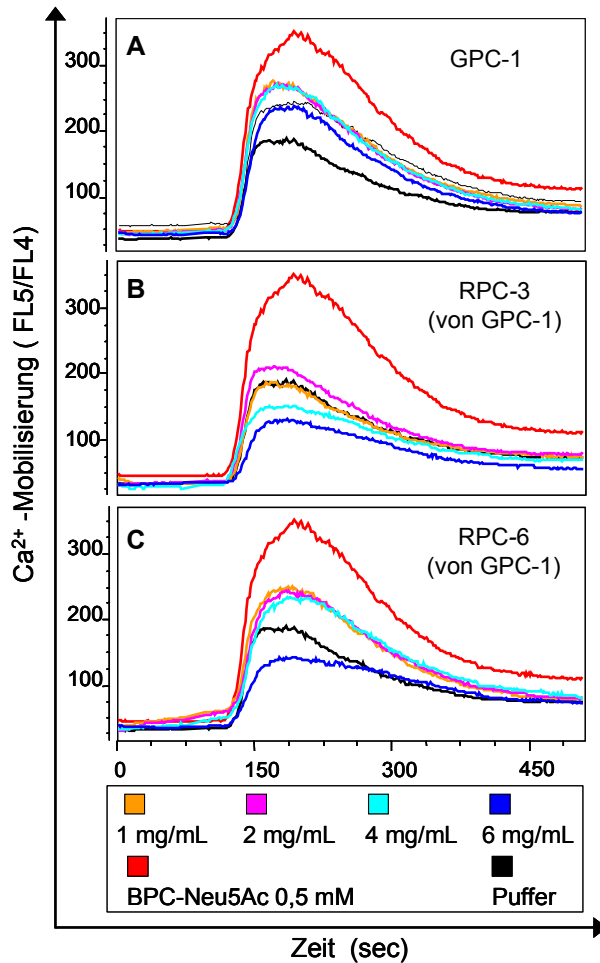
(B)  $1 \times 10^6$  Indo-1 beladene Daudi-Zellen wurden mit hydrolysierten und fraktionierten Caseinen und Molkenproteinen behandelt. Es wurde mit  $0,4 \mu\text{g}/\text{mL}$  Anti-IgM stimuliert. In B wurden die Pufferkontrolle „nach“ Titration der Peptide/am Ende der Messreihe als dünne/ gestrichelte schwarze Linie abgebildet.

Im Vergleich zu der Pufferkontrolle wurde mit allen eingesetzten Fraktionen keine Erhöhung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals wie bei BPC-Neu5Ac, sondern eine weitere Dämpfung gegenüber der Pufferkontrolle beobachtet, mit Ausnahme der Peptide der GPC-1 sowie der unverdauten Molkenproteine, die keine oder nur eine sehr schwache Dämpfung bewirkten. Die Fraktionen, die durch Auftrennung der proteolytisch verdauten humanen Molkenproteine und Caseine

erhalten wurden, zeigten ansonsten bei gleichen Konzentrationen ähnliche Auswirkungen: Den geringsten Effekt im Vergleich zu der Pufferkontrolle hatten die Peptide der GPC-1. Die Peptide der RPC-6 hatten einen stärker dämpfenden Effekt, doch die stärkste Dämpfung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals wurde durch die unfraktionierten Peptide erzielt (☞ **Abbildung 17 A**). Bei dieser Messung war die  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung in Anwesenheit von Puffer bereits relativ hoch und wurde durch das BPC-Neu5Ac nicht wesentlich erhöht.

Bei einem weiteren Experiment mit den fraktionierten Peptiden wurden daher niedrigere Konzentrationen der stimulierenden Antikörper und Peptide eingesetzt (☞ **Abbildung 17 B**). Der dämpfende Effekt konnte hierbei nicht für alle Fraktionen bestätigt werden. Bei humanen Molkenproteinen führten die Peptide von RPC-6 und RPC-3 zu einer Dämpfung, die der GPC-1 dagegen zu einer Erhöhung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals. Zum Vergleich wurde eine weitere (dünngestrichelte) Pufferkontrolle dargestellt, um zu verdeutlichen, dass es mit zunehmender Alterung der beladenen Zellen zu einem höheren  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal auch ohne BPC-Neu5Ac kommt. Bei humanen Caseinen konnte der dämpfende Effekt für RPC-6 bei niedrigeren Konzentrationen nicht bestätigt werden, während RPC-3 bei diesen Konzentrationen bereits den stärksten dämpfenden Effekt auf das  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal hatte.

Zur Analyse des Einflusses der Konzentration der Peptide auf einen dämpfenden Effekt bei der  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung wurden Titrations mit den fraktionierten Peptiden der humanen Molkenproteine durchgeführt (☞ **Abbildung 18**). Es wurden bei diesen Versuchen geringere Konzentrationen des stimulierenden Antikörpers eingesetzt. Das  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal ist daher die Stimulation ohne Inhibitor relativ gering, der Einfluss durch BPC-Neu5Ac auf eine erhöhte Mobilisierung jedoch wesentlich deutlicher. Bei dieser Messung haben die Peptide von GPC-1 auch bei 6 mg/mL keinen dämpfenden Einfluss (☞ **Abbildung 18 A**). Bei den Peptiden von RPC-3 konnte eine Dämpfung ab 4 mg/mL beobachtet werden, bei denen von RPC-6 ab 6 mg/mL. Bei niedrigen Konzentrationen konnte sogar ein gegenläufiger Effekt, nämlich ein erhöhtes  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal gegenüber der Pufferkontrolle durch die Peptide der GPC-1 und vor allem durch die Peptide der RPC-6 beobachtet werden (☞ **Abbildung 18 A,C**).

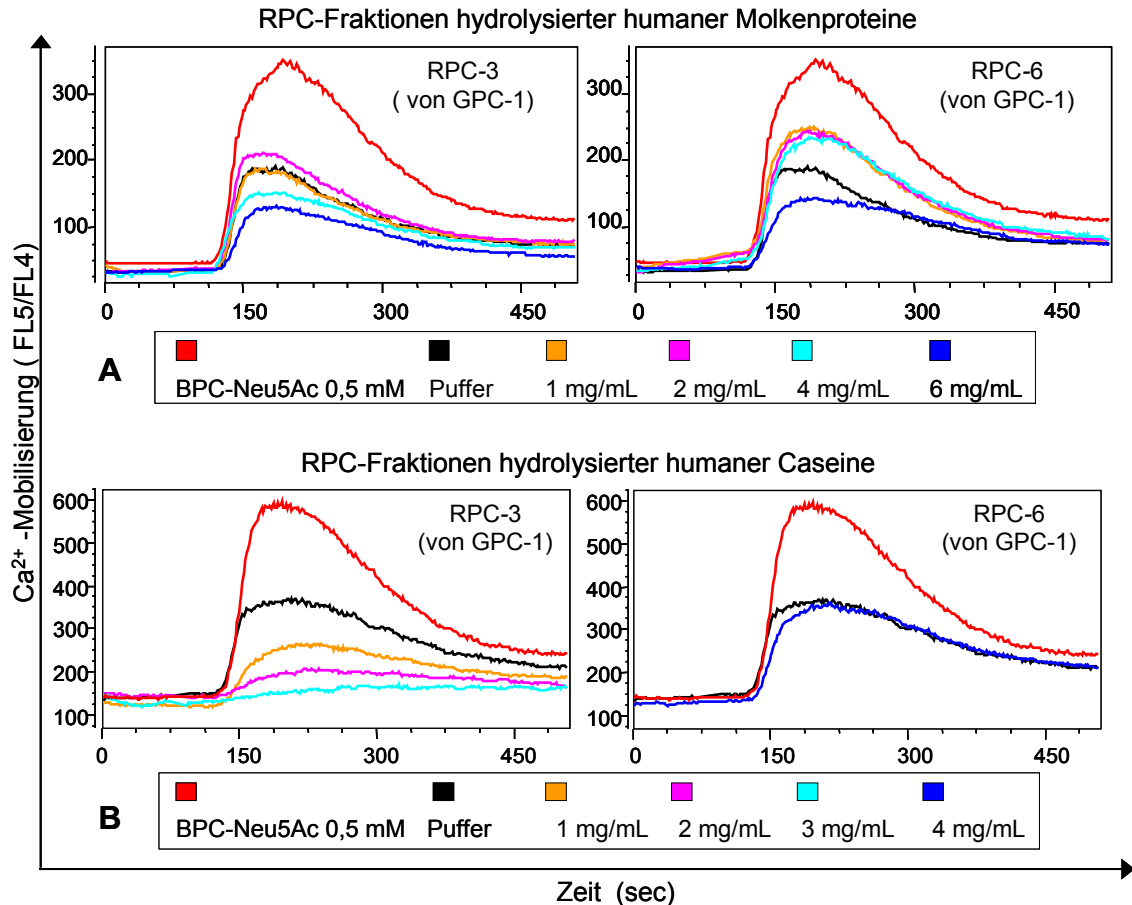


**Abbildung 18** Konzentrationsabhängiger Einfluss der Peptide der GPC- und RPC-Fractionen humaner Molkenproteinhydrolysate auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung in Daudi-Zellen.

$1 \times 10^6$  Indo-1 beladene Daudi-Zellen wurden mit (A) den Produkten der GPC-1 hydrolysierter humaner Molkenproteine und den RPC-Subfraktionen der GPC-1, (B) RPC-3 und (C) RPC-6, behandelt. Es wurde mit  $0,4 \mu\text{g/mL}$  Anti-IgM stimuliert. In Abbildung A wurde die Pufferkontrolle „nach“ Titration der GPC-1 Peptide / am Ende der Messreihe als gestrichelte schwarze Linie abgebildet.

Der Einfluss der Peptide der Fractionen aus der *Reversed-Phase*-Chromatographie von humanen Caseinen und Molkenproteinen wurde in **Abbildung 19** dargestellt. Es stand nicht immer genügend Ausgangsmaterial der säulenchromatographischen Fraktionierungen für mehrere Messungen zur Verfügung. Daher waren nicht alle Titrations vollständig. Während die Peptide der RPC-Fractionen von humanen Molkenproteinen erst bei hohen Konzentrationen zu einer Erniedrigung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals führten, dämpften die Peptide von RPC-3 der humanen Caseine bereits bei  $1 \text{ mg/mL}$ . Bei  $3 \text{ mg/mL}$  wurde das  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal auf das des Basissignals vor der Aktivierung mit Antikörper reduziert. Dagegen zeigten die RPC-6 Peptide bei  $4 \text{ mg/mL}$  keinen Effekt gegenüber der Pufferkontrolle.

Für weitergehende Versuche wurde auf eine aufwendige Fraktionierung der Peptide verzichtet, sondern nur mit unfraktionierten tryptisch/chymotryptischen Hydrolysaten gearbeitet, da deren Effekte am stärksten waren.



**Abbildung 19** Einfluss der Peptide der RPC-Fractionen hydrolysiertes Molkenproteine und Caseine auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung in Daudi-Zellen.

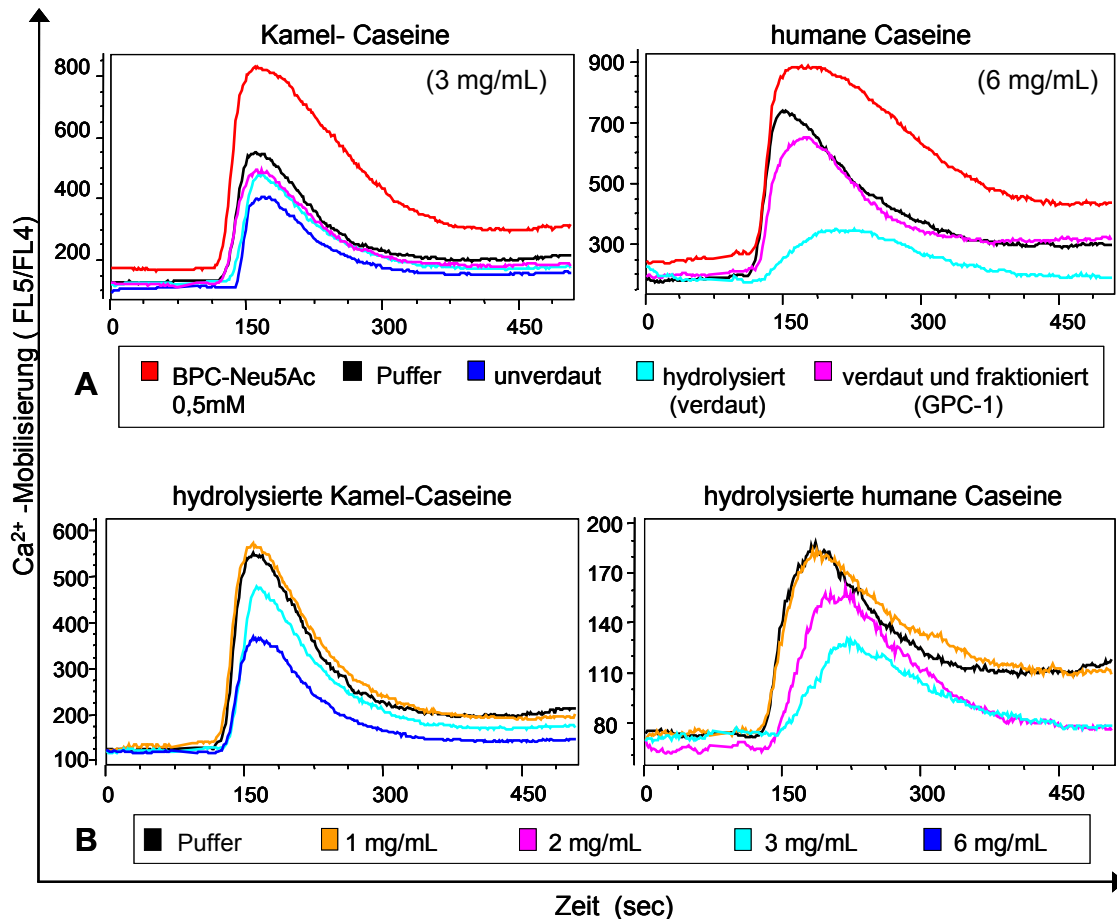
$1 \times 10^6$  Indo-1 beladene Daudi-Zellen wurden mit den Peptiden der *Reversed-Phase*-Fractionen der GPC-1 tryptisch/chymotryptisch hydrolysierten Milchproteinen behandelt. Es wurde mit  $0,4 \mu\text{g/mL}$  Anti-IgM stimuliert.

#### 4.6.3 Kamel-Caseinhydrolysate und ihr Einfluss auf die $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung

Neben humanen Caseinen und Molkenproteinen wurden auch Kamel-Caseine in den B-Zell-Aktivierungsexperimenten eingesetzt. Aufgrund der geringen verfügbaren Mengen der fraktionierten Kamel-Caseinpeptide wurden vor allem unverdaute und tryptisch verdaute Kamel-Caseine und die Peptide der GPC-1 eingesetzt, die eine deutliche Inhibition bei den Bindungsstudien bewirkt hatten ( $\rightarrow$  **Abbildung 20**). Weiterhin wurden zum Vergleich Fractionen der *Reversed-Phase*-Chromatographie von GPC-2 getestet, die in den Bindungsstudien kein inhibitorisches Potential auf die CD22-Bindung an IgM gezeigt hatten.

In **Abbildung 20 A** wurden die Effekte auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung durch Kamel-Caseine zunächst denen von humanen Caseinen gegenübergestellt, wobei die Kamel-Caseine geringer konzentriert eingesetzt wurden. Im Gegensatz zu humanen Caseinen konnten die unverdauten Kamel-Caseine im FACS gemessen werden. Eine Trübung der Stammlösung, wie sie bei humanen Caseinen durch die Caseinmicellen entsteht, konnte bei Kamel-Caseinen nicht festgestellt werden.





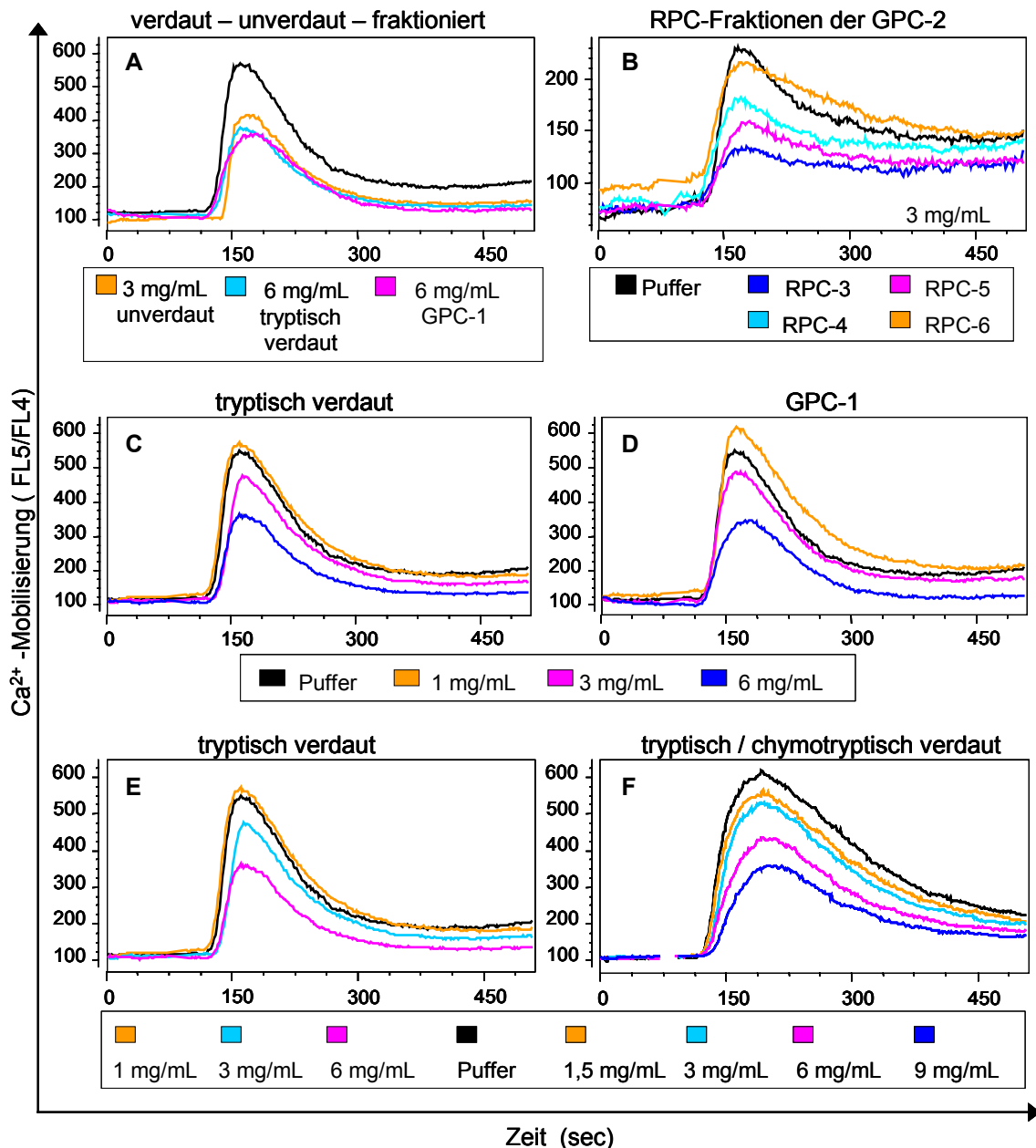
**Abbildung 20** Einfluss proteolytischer Produkte humaner Caseine und Kamel-Caseine auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung in Daudi-Zellen.

(A)  $0,9 \times 10^6$  Indo-1 beladene Daudi-Zellen wurden mit den angegebenen Caseinfraktionen in den angegebenen Konzentrationen behandelt. Es wurde mit  $0,8 \mu\text{g/mL}$  Anti-IgM stimuliert. Unverdaute humane Caseine ließen keine korrekte Fluoreszenzmessung im FACS zu.

(B)  $0,9 \times 10^6$  Indo-1 beladene Daudi-Zellen wurden mit tryptisch verdauten Kamel-Caseinen und  $1 \times 10^6$  Indo-1 beladene Daudi-Zellen wurden mit den tryptisch/chymotryptisch verdauten humanen Caseinen in den angegebenen Konzentrationen behandelt. Es wurde mit  $0,4 \mu\text{g/mL}$  Anti-IgM stimuliert.

Bei humanen Caseinen führten unfraktionierte Peptide zu einer deutlichen, die Peptide der GPC-1 nur zu einer geringen Dämpfung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals bei  $6 \text{ mg/mL}$ . Beide Fraktionen zeigten dagegen bei den Kamel-Caseinen nur einen geringen dämpfenden Effekt ( $\varnothing$  **Abbildung 20 B**). Bei gleicher Konzentration zeigten unverdaute Kamel-Caseine einen stärkeren Dämpfungseffekt. Bei Titrationen der unfraktionierten Caseinhydrolysate zeigten die Kamel-Caseinhydrolysate erst bei  $6 \text{ mg/mL}$  einen deutlichen Dämpfungseffekt. Dieser konnte bei humanen Caseinhydrolysaten bereits bei  $3 \text{ mg/mL}$  erzielt werden.

In **Abbildung 21** wurden verschiedene Fraktionen der Kamel-Caseinhydrolysate miteinander verglichen und Konzentrationseffekte dargestellt. Unfraktionierte Peptide und die Peptide der GPC-1 zeigen erst bei einer verdoppelten Konzentration eine stärkere Dämpfung als die unverdauten Kamel-Caseine.



**Abbildung 21** Konzentrationsabhängiger Einfluss unterschiedlich hydrolysierter Kamel-Caseine und ihrer Chromatographiefraktionen auf die Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung in Daudi-Zellen.

(A,C,D,E)  $0,9 \times 10^6$  Indo-1 beladene Daudi-Zellen wurden mit den beschriebenen Kamel-Caseinfraktionen in den angegebenen Konzentrationen behandelt. Es wurde mit  $0,8 \mu\text{g/mL}$  Anti-IgM stimuliert.

(B)  $1,5 \times 10^6$  Indo-1 beladene Daudi-Zellen wurden mit  $3 \text{ mg/mL}$  der GPC-2 tryptisch verdauter Kamel-Caseine behandelt. Es wurde mit  $0,4 \mu\text{g/mL}$  Anti-IgM stimuliert.

(F)  $1,25 \times 10^6$  Indo-1 beladene Daudi-Zellen wurden mit tryptisch/chymotryptisch verdauten Kamel-Caseinen in den angegebenen Konzentrationen behandelt. Es wurde mit  $0,8 \mu\text{g/mL}$  Anti-IgM stimuliert.

Der direkte Vergleich der Titrationen unfraktionierter Peptide und GPC-1 zeigte, dass bei der Höchstkonzentration von  $6 \text{ mg/mL}$  beide Präparationen eine ähnlich starke Dämpfung des Ca<sup>2+</sup>-Signals bewirken (⇨ **Abbildung 21 C, D**). Bei  $1 \text{ mg/mL}$  zeigt sich, dass die GPC-1 Peptide zu einer leichten Erhöhung der Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung führen, wie sie schon bei den GPC-1 Peptiden der humanen Molkenproteine beobachtet werden konnte.

Bei späteren Versuchen mit humanen, bovinen und Kamel-Caseinhydrolysaten wurden die Caseine alle tryptisch/chymotryptisch verdaut eingesetzt. Die erzielten Ergebnisse wurden daher den mit tryptisch verdauten Kamel-Caseinen erzielten Ergebnissen gegenübergestellt (⇨ **Abbildung 21 E,F**). Bei 6 mg/mL führen beide Hydrolysate zu einer ähnlichen Reduktion des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals im Vergleich zur Pufferkontrolle. Bezogen auf das Fluoreszenzmaximum können beide eine Reduktion um das 1,4 bis 1,5-fache bewirken. Bei gleicher Konzentration bewirken hydrolysierte humane Caseine eine 2-fache Reduktion (⇨ **Abbildung 20**).

Zum Vergleich verschiedener RPC-Subfraktionen wurden die Peptide der GPC-2 RPC-3 bis RPC-6 mit 3mg/mL eingesetzt (⇨ **Abbildung 21 B**). Es zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den Fraktionen. Wie bei humanen Caseinen hatten die Peptide von RPC-3 einen dämpfenden Einfluss auf das  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal, während die von RPC-6 kaum einen Effekt zeigten. Insgesamt zeigten die unverdauten Kamel-Caseine den deutlichsten Effekt auf eine Dämpfung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals bei humanen Daudi-Zellen.

**Tabelle 9** Tabellarische Zusammenfassungen der Effekte humaner Molkenproteine und Caseine sowie Kamel-Caseine auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung in stimulierten Daudi-Zellen.

Relatives inhibitorisches Potential (rIP) der Proteine /Peptide gegenüber der jeweiligen Pufferkontrolle (rIP=1) bezogen auf das maximale  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal (FL5/FL4).

Konz. mg/mL	humane Molkenproteine			humane Caseine			Kamel-Caseine		
	1	3 - 4	6	1	3	6	1	3	6
unverdaut	/	/	0,95	nicht messbar			/	<b>0,75</b>	/
verdaut	/	/	<b>0,45</b>	1,0	0,7	<b>0,5</b>	1,05	0,9	<b>0,7</b>
GPC-1	1,5	1,5	1,3	/	0,9	0,9	1,15	0,9	<b>0,65</b>
	<i>1,15</i>	<i>1,15</i>	<i>0,95</i>						
RPC-3	1,0	0,85	0,7	0,75	<b>0,4</b>	/	nicht getestet		
RPC-6	1,4	1,4	0,8	/	1,0	0,75	nicht getestet		

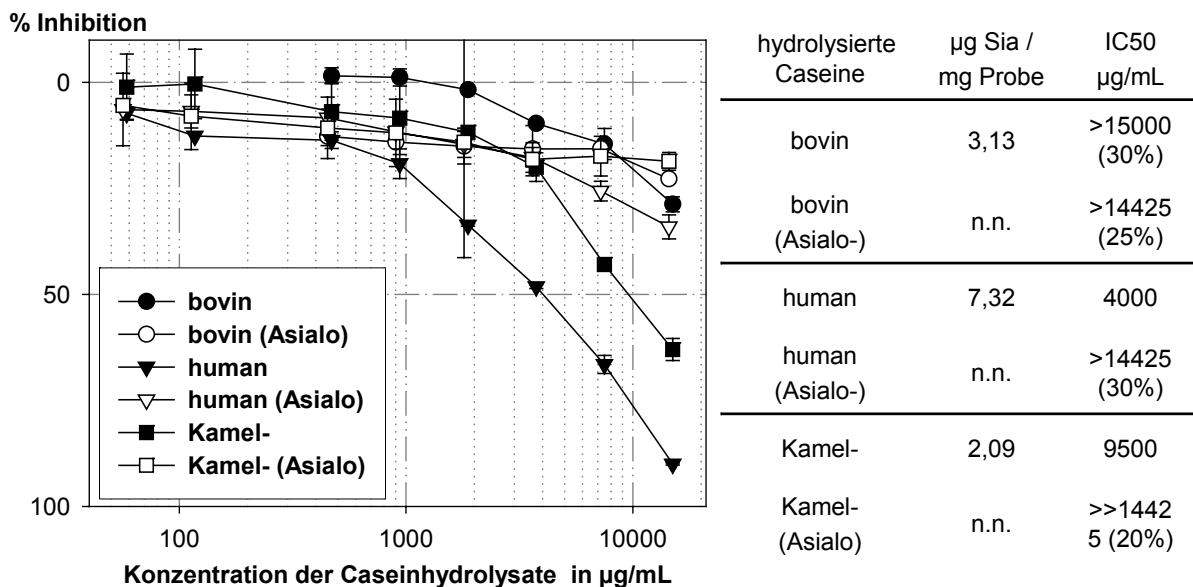
#### 4.6.4 Vergleich von humanen, bovinen und Kamel-Caseinhydrolysaten in der Dämpfung der $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung

Aufbauend auf vorherige Ergebnisse aus den B-Zell-Aktivierungstests mit humanen und Kamel-Caseinhydrolysaten wurden unfraktionierte tryptisch/chymotryptisch verdaut Caseine aus boviner, humaner und Kamel-Milch im direkten Vergleich in den B-Zell-Aktivierungsexperimenten eingesetzt. Die Peptide wurden als hochkonzentrierte Stammlösungen angesetzt, um die Peptide in den Messungen in möglichst hohen Konzentrationen einsetzen zu können.

Um den Einfluss der Sialylierung der Peptide auf das  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal in Daudi-Zellen zu analysieren, wurden Peptide eingesetzt, die zur Abspaltung der Sialinsäure mit 0,1 M HCL hydrolysiert worden waren (⇨ 3.12). Die freien Sialinsäuren wurden für die Aktivierungsversuche mit den Daudi-Zellen nicht entfernt, da sie als freie Monosaccharide keinen Einfluss auf die CD22-Bindung oder das  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal haben sollten. Parallel wurden

diese Asialo-Peptide im IgM-Mikrotiterplatten-Bindungstest eingesetzt und ihr Sialinsäuregehalt im Bial-Test überprüft (⇨ **Abbildung 22**). Die Sialinsäurebestimmung zeigte, dass humane Caseinehydrolysate am stärksten sialyliert sind. Es konnten keine Sialinsäure bei den desialylierten Caseinhydrolysaten nachgewiesen werden.

Im Bindungstest wird deutlich, dass die Inhibition der Bindung von CD22-Fc an IgM durch die Caseinpeptide Konzentrations- und Sialinsäure-abhängig ist. Weder bovine Sialo- noch Asialo-Caseinpeptide konnten bei den eingesetzten Konzentrationen eine 50-%ige Inhibition erreichen. Der IC<sub>50</sub> für humane Caseinpeptide betrug 4 mg/mL und für Kamel-Caseinpeptide 9,5 mg/mL. Eine 50-%ige Inhibition konnte durch die korrespondierenden Asialo-Peptide nicht erreicht werden.



**Abbildung 22** Einfluss der Caseinhydrolysate und ihrer Sialylierung auf die Bindung von CD22-Fc an IgM.

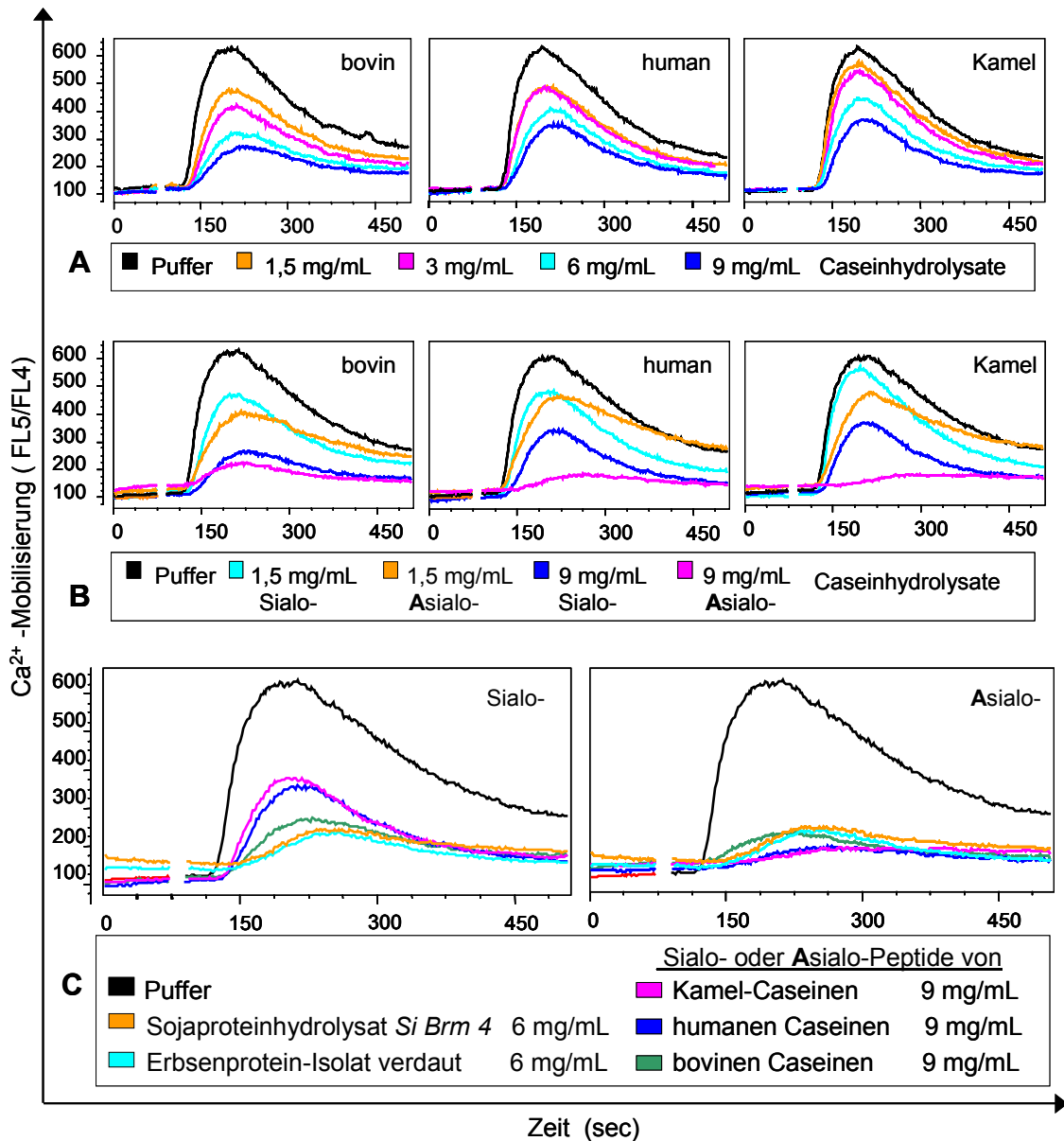
Die Caseinhydrolysate wurden durch HCL-Behandlung desialyliert (⇨ 3.12) und für den IgM-Bindungstest und für die Sialinsäurebestimmung die Sialinsäure durch Acetonfällung entfernt (⇨ 3.13). „n.n.“= nicht nachweisbar (Hintergrund).

(links) Eine 384-well-Platte wurde nach Protokoll B mit IgM beschichtet und die Komplexe eingesetzt. Die Caseinhydrolysate wurden in den angegebenen Konzentration eingesetzt.

(rechts) Tabellarische Auflistung der korrespondierenden IC<sub>50</sub>-Werte und der Sialinsäuregehalte der Caseinhydrolysate.

In den B-Zell-Aktivierungsexperimenten wurden zunächst Titrations dieser Caseinhydrolysate von 1,5 mg/mL bis 9 mg/mL mit den Daudi-Zellen durchgeführt, um den Effekt auf die Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung zu testen (⇨ **Abbildung 23 A**). Die bovinen Caseinhydrolysate zeigten im B-Zell-Aktivierungstest den größten dämpfenden Einfluss auf die Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung. Bereits bei 1,5 mg/mL ist der Effekt deutlich erkennbar und erhöhte sich bis zu der höchsten eingesetzten Konzentration von 9 mg/mL. Die humanen

Caseinhydrolysate zeigen bei 1,5 mg/ml einen ähnlichen Einfluss wie die bovinen Peptide. Bei der höchsten Konzentration ist die Dämpfung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals niedriger als bei den bovinen Peptiden. Kamel-Caseinhydrolysate zeigten den schwächsten Effekt bei niedrigen Konzentrationen, bei der Höchstkonzentration war die Reduktion des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals ähnlich wie durch humane Caseinhydrolysate.



**Abbildung 23** Konzentrations- und Sialinsäure-abhängiger Einfluss der bovinen, humanen und Kamel-Caseinhydrolysate auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung in Daudi-Zellen.

$1,25 \times 10^6$  Indo-1 beladene Daudi-Zellen wurden mit den angegebenen Hydrolysaten in den angegebenen Konzentrationen vorinkubiert. Es wurde mit  $0,8 \mu\text{g/ml}$  anti-IgM-Antikörper stimuliert. Die Caseinhydrolysate wurden mittels saurer Hydrolyse desialyliert ( $\varphi 3.12$ ). Die freien Sialinsäuren wurden für die FACS-Analysen nicht entfernt.

Die Dämpfung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals durch die Asialo-Peptide war gegenüber den unbehandelten Peptiden verstärkt ( $\varphi$  **Abbildung 23 B**). Bei den bovinen Asialo-Caseinhydrolysaten konnte eine weitere Dämpfung gegenüber den Sialo-Peptiden nur bei 1,5 mg/mL detektiert werden.

Auch die humanen Asialo-Caseinhydrolysate zeigten bei 1,5 mg/mL einen ähnlich Effekt wie die bovinen Caseinhydrolysate. Bei 9 mg/mL war das  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal sogar geringer als bei humanen Sialo-Peptiden oder bovinen Asialo-Peptiden. Bei den Kamel-Caseinhydrolysaten wirkten die Asialo-Peptide bei 1,5 mg/mL stärker dämpfend als die Sialo-Peptide. Dabei wurde das Niveau der bovinen und humanen Asialo-Peptide erreicht. Wie bei den humanen Asialo-Caseinhydrolysaten war bei 9 mg/mL der stärkste Dämpfungseffekt aller Kamel-Proben zu beobachten (☞ **Abbildung 23 B**).

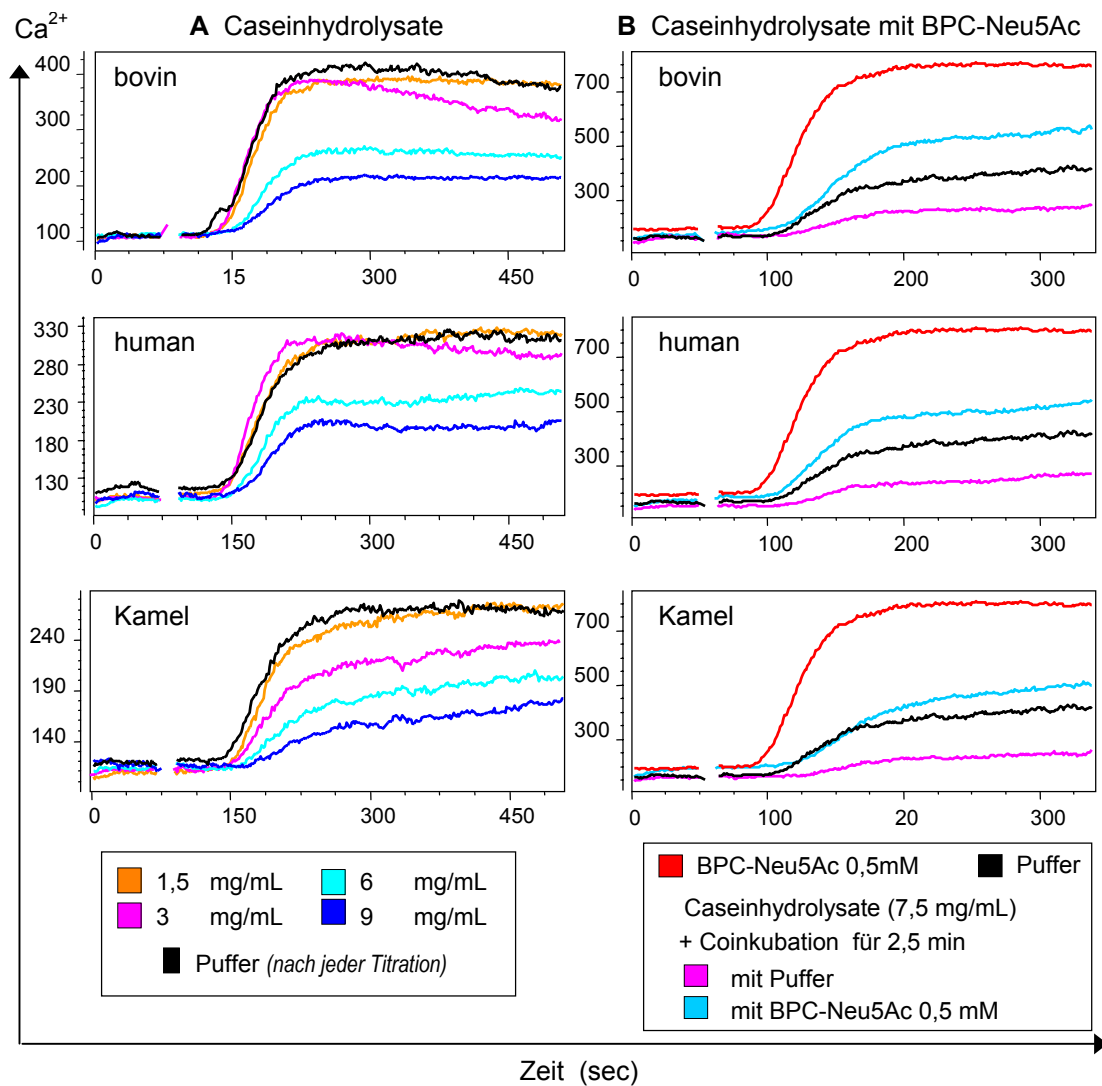
Weiterhin wurden pflanzliche Proteinhydrolysate im B-Zell-Aktivierungstest eingesetzt, um den Effekt von Natur aus nicht-sialylierter Peptide zu testen (☞ **Abbildung 23 C**). Die mit 6 mg/ml eingesetzten Hydrolysate von Erbsenprotein und Sojaprotein führten im Vergleich zu 9 mg/mL konzentrierten Sialo-Caseinhydrolysaten zu einem deutlich stärkeren Dämpfungseffekt als humane und Kamel-Caseinhydrolysate, aber nur zu einem gering verbesserten Effekt gegenüber den bovinen Caseinpeptiden. Im Vergleich zu den Asialo-Peptiden ergab sich der umgekehrte Fall. Hier dämpften humane und Kamel-Asialo-Caseinhydrolysate das  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal mehr als die pflanzlichen Proteinhydrolysate und die bovinen Asialo-Caseinhydrolysate.

Hydrolysate		rIP bei 1 mg/mL	rIP bei 6 mg/mL	rIP bei 9 mg/mL
Sialo- bovine Caseine		0,8	0,5	0,45
Asialo-		0,65		0,35
Sialo- humane Caseine		0,8	0,65	0,55
Asialo-		0,75		<b>0,25</b>
Sialo- Kamel-Casein		<b>0,9</b>	0,7	0,6
Asialo-		0,75		0,3
	Erbsenprotein		0,35	
	Soja		0,4	

**Tabelle 10** Tabellarische Darstellung der Effekte (rIP) der Sialo-/Asialo-Caseinhydrolysate auf das  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal  
 Relatives inhibitorisches Potential (rIP) der Sialo-/ Asialo-Caseinhydrolysate aus boviner, humaner und Kamel-Milch bei den angegebenen Konzentrationen gegenüber der Pufferkontrolle (rIP=1) bezogen auf das maximale  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal (FL5/FL4) (Näherungsangaben)

Durch die Coinkubation der Caseinhydrolysate mit BPC-Neu5Ac sollte analysiert werden, ob die stark dämpfende Wirkung der Hydrolysate durch BPC-Neu5Ac aufgehoben werden kann. In **Abbildung 24 A** wurde eine Titration der Caseinhydrolysate dargestellt, um diese Ergebnisse mit den Coinkubationsexperimenten vergleichen zu können, die mit denselben beladenen Zellen durchgeführt wurden. Die Ergebnisse der Titrations stimmten im wesentlichen mit denen der vorherigen Titrations überein (☞ **Abbildung 23**). Bei niedrigen Konzentrationen wurden im Vergleich zu vorherigen Messungen kein deutlicher Effekt im Vergleich zur Pufferkontrolle beobachtet. Bovine Caseinhydrolysate zeigten den stärksten Effekt. Bei humanen Caseinhydrolysaten war erst ab 6 mg/mL ein deutlicher Dämpfungseffekt zu sehen. Die Kamel-Caseinhydrolysate zeigten selbst bei der höchsten Konzentration den niedrigsten Effekt.

Während bei den bisherigen Experimenten die Proben 8 Minuten mit den Daudi-Zellen inkubiert wurden, wurden bei den Coinkubationsexperimenten (⇨ **Abbildung 24 B**) die Caseinhydrolysate für 5,5 Minuten mit den Daudi-Zellen inkubiert und für die verbleibende Zeit gleiche Volumina an Puffer oder BPC-Neu5Ac dazugegeben und coinkubiert. Bei allen Caseinhydrolysaten konnten bei 2,5-minütiger Coinkubation mit BPC-Neu5Ac im Vergleich zu der Coinkubation mit Puffer eine Erhöhung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals beobachtet werden. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung war im Vergleich zur Pufferkontrolle erhöht, erreichte aber nicht das Niveau wie nach ausschließlicher BPC-Neu5Ac-Inkubation der Daudi-Zellen.



**Abbildung 24** Einfluss boviner, humaner und Kamel-Caseinhydrolysate sowie der Coinkubationen mit BPC-Neu5Ac auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung in Daudi-Zellen.

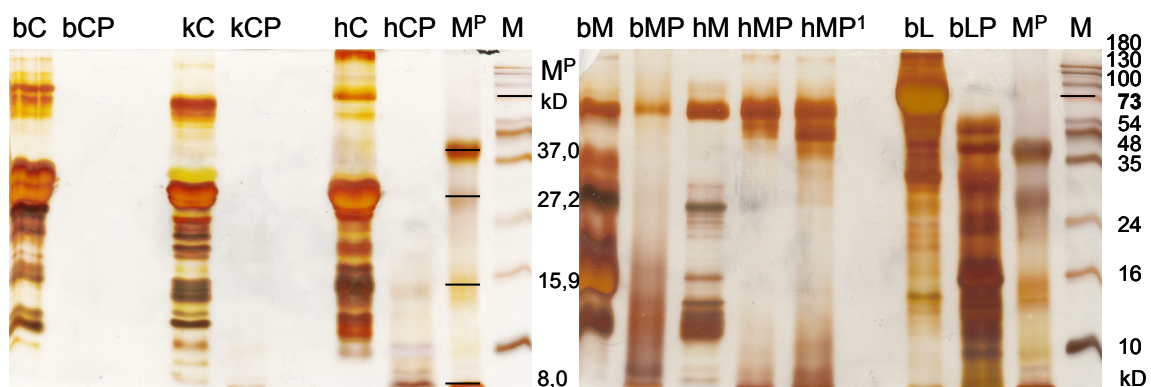
$1,2 \times 10^6$  Indo-1 beladene Daudi-Zellen wurden **(A)** mit den Caseinhydrolysaten in den angegebenen Konzentrationen oder **(A+B)** mit Puffer und 0,5 mM BPC-Neu5Ac für 8 min vorinkubiert. Es wurde mit Anti-IgM (0,8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) stimuliert. **(B)** 7,5 mg Caseinhydrolysate/mL wurden mit den Zellen für 5,5 min inkubiert und für die restlichen 2,5 min mit gleichen Volumina an Puffer oder BPC-Neu5Ac (Endkonzentration 0,5 mM) coinkubiert.

#### 4.7 Zusammensetzung und Sialylierung von Caseinen und Molkenproteinen

Für die Charakterisierung der beiden Hauptproteinfraktionen der Milch, den Caseinen und den Molkenproteinen, wurden die in ihnen enthaltenen Proteine elektrophoretisch nach ihrem Molekulargewicht und isoelektrischen Punkt aufgetrennt (☞3.14), Proteine durch Coomassie- oder Silberfärbung detektiert (☞3.15) und sialylierte Glykoproteine durch Lektinnachweis (☞3.15.5) identifiziert.

##### 4.7.1 Analyse der Caseine und Molkenproteine durch Auftrennung mittels SDS-PAGE mit Proteinfärbung und Lektinnachweis

Es wurden zunächst Caseine und Molkenproteine aus humaner, boviner und Kamel-Milch unverdaut und nach proteolytischem Verdau elektrophoretisch nach ihrem Molekulargewicht mittels SDS-PAGE aufgetrennt, um einen Überblick über die Molekulargewichte der Proteine und Peptide zu erhalten (☞Abbildung 25). Bei den verdauten Caseinen konnten keine Protein-/Peptidbanden über 20 kD nachgewiesen werden. Dagegen konnten bei den verdauten Molkenproteinen Proteine mit einem apparenten Molekulargewicht um 48-73 kD detektiert werden. Diese(s) Protein(e) scheinen in der GPC-1 Fraktion der verdauten humanen Molkenproteine angereichert zu werden.



**Abbildung 25** Nachweis elektrophoretisch aufgetrennter Caseine und Molkenproteine sowie deren proteolytischer Produkte durch Silberfärbung.

Auftrennung von 25 µg Caseinen oder Molkenproteinen und ihre Hydrolysate unter reduzierenden Bedingungen mittels SDS-PAGE in einem 15-%igen Polyacrylamidgel mit nachfolgender Silberfärbung: bovin (b), human (h), Kamel (k), Casein (C), Molkenproteine (M), Laktoferrin (L), -Peptide/Hydrolysate (P), GPC-Fraktion 1 ( <sup>1</sup> ), Proteinstandard (M), Peptidstandard (M<sup>P</sup>).

Aufgrund der insgesamt geringeren molekularen Masse der Peptide wurden für folgende elektrophoretische Analysen nur unverdaute Proteine eingesetzt. Der Schwerpunkt wurde auf die Charakterisierung der humanen Caseine gesetzt, da sie in den Bindungstests mit CD22 das höchste inhibitorische Potential (rIP) gezeigt hatten. Nach der Analyse der rIPs gegenüber der Bindung von CD22-Fc an IgM im IgM-Mikrotiterplatten-Bindungstest und der Sialinsäurequantifizierung sollte die Sialylierung der unverdauten Milchproteine nach elektrophoretischer Auftrennung untersucht werden.



Die Detektion einer CD22-spezifischen Bindung war dabei nicht oder nur unzureichend möglich, da die Bindungsaffinität des CD22 zu der Sialinsäure zu gering ist, um einen direkten Nachweis im Lektinblot zu ermöglichen. Die  $K_d$  von rekombinatem CD22 bei 4°C für die Sequenz Neu5Ac $\alpha$ 2,6Gal $\beta$ 1,4Glc ist nur 30  $\mu$ M (Powell et al., 1995). Die Bindungsspezifität von CD22 ist jedoch mit der von SNA vergleichbar (Powell et al., 1995). SNA erlaubt einen spezifischen Nachweis der Sequenz Sia $\alpha$ 2,6Gal/GalNAc mit einer  $K_d$  von 2,5  $\mu$ M (Shibuya et al., 1987). Damit erkennt SNA sialylierte *N*-Glykane und *O*-Glykane. Die  $\alpha$ 2,6-Sialylierung an GlcNAc in *N*-Glykanen, wie in der Sequenz Neu5Ac $\alpha$ 2,3Gal $\beta$ 1,3-(Neu5Ac $\alpha$ 2,6)-GlcNAc $\beta$ 1,4Man wird nicht erkannt. Um zwischen *O*- und *N*-Glykanen zu unterscheiden, kann PNA, das Erdnuss-Agglutinin, eingesetzt werden. Es erkennt die Sequenz Gal $\beta$ 1,3GalNAc $\beta$ 1,3Ser/Thr (Green et al., 1988), wie sie bei desialylierten *O*-Glykanen vorkommt. Um diese Sequenz auf *O*-Glykanen zu erfassen, müssen die Proteine daher vorher desialyliert werden ( $\approx$ 3.12).

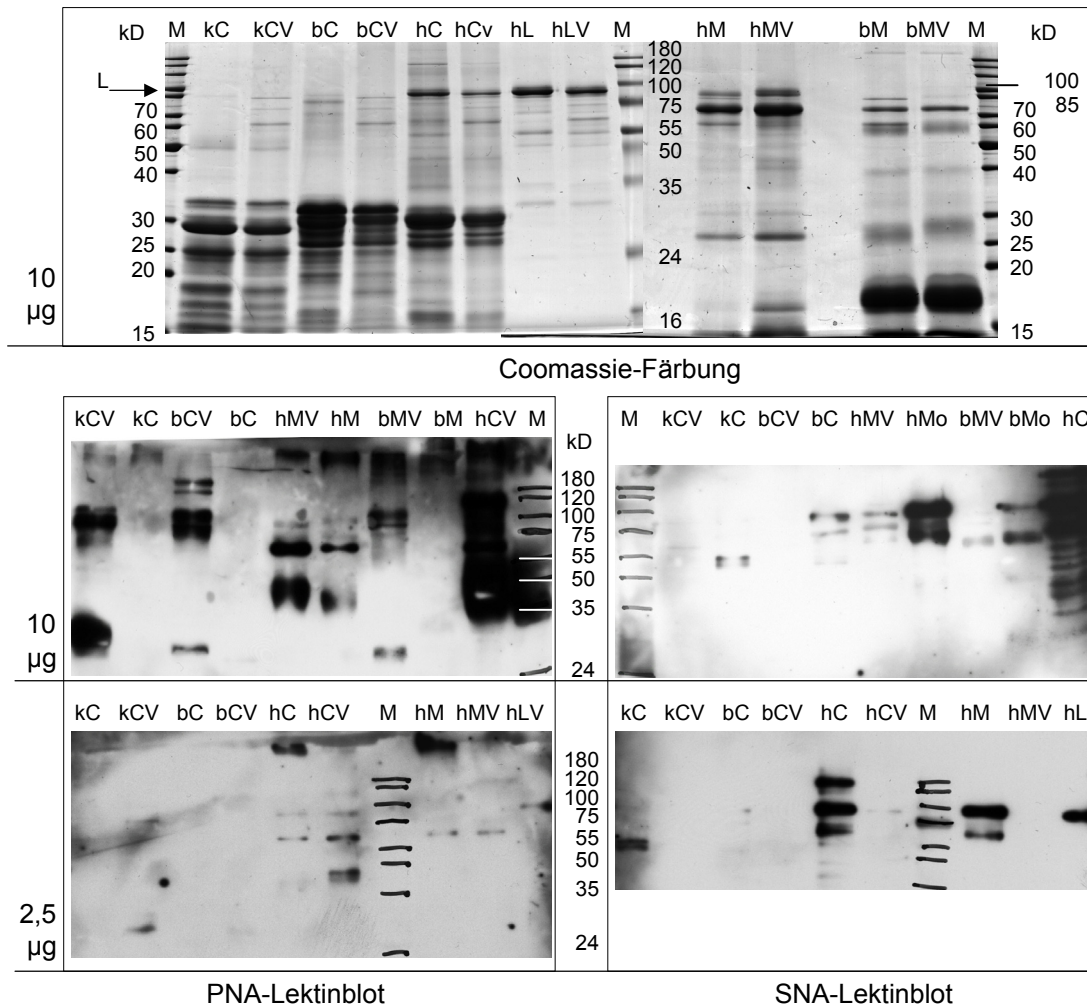
In **Abbildung 26** wurden verschiedene unbehandelte und Sialidase-behandelte Caseine und Molkenproteine elektrophoretisch aufgetrennt, Coomassie gefärbt oder ein Lektinnachweis mit SNA und PNA durchgeführt. Die detektierten Hauptproteinbanden aller getesteten Milchproteinfraktionen wurden in **Tabelle 11** zusammengefasst.

Die verschiedenen Caseine ( $\alpha$ - $\beta$ - $\kappa$ -Casein) haben ein apparentes Molekulargewicht zwischen 19-25 kDa. Wie in **Abbildung 25** und **Abbildung 26** deutlich erkennbar, unterscheiden sich humane, bovine und Kamel-Caseine in diesem Hauptproteinbereich zwischen 25-32 kDa. Aufgrund posttranslationaler Modifikationen wie Glykosylierung und vor allem Phosphorylierung wandern diese Proteine langsamer in der SDS-PAGE und können bei einem höheren Molekulargewicht nachgewiesen werden. Außerdem beeinflussen diese Modifikationen den Ladungszustand der Proteine, die zu Mikroheterogenitäten führen und als Spot-Muster nach 2D-PAGE nachgewiesen werden können ( $\approx$ Abbildung 27). Neben den potentiellen Caseinen konnten weitere Proteine detektiert werden, deren  $M_w$  höher oder niedriger als das der Caseine ist.

Es konnte gezeigt werden, dass durch die Lektine keine Proteine mit einem  $M_w < 30$  kD detektiert werden konnten ( $\approx$ **Abbildung 26**). Nicht alle in den desialylierten Proben mit PNA nachgewiesenen Proteine konnten in der unbehandelten Probe mit SNA detektiert werden. Es konnten keine sialylierten Proteine im Hauptmolekulargewichtsbereich der Caseine identifiziert werden.

Bei hohen Proteinauftragsmengen zeigte sich deutlich, dass bei humanen desialylierten Caseinen prominente, *O*-glykosylierte Proteine mit PNA in dem Molekulargewichtsbereich von 35-120 kDa identifiziert werden konnten. Bei den unbehandelten Caseinen konnte mit SNA dieser Bereich ebenfalls detektiert werden, vorrangig aber Proteine  $> 75$  kDa. In den IgM-Bindungstests erwiesen sich humane Caseine als beste Inhibitoren einer Sialinsäure-abhängigen Bindung.

In den meisten unbehandelten Proben war kein Nachweis durch PNA möglich, mit Ausnahme von Proteinen im hochmolekularen Bereich (>200 kD). Bei den desialylierten Proben konnte SNA vereinzelt sialylierte Proteine erkennen, was für eine unvollständige Abspaltung der  $\alpha$ 2,6-verknüpften Sialinsäuren durch die *Vibrio cholerae* Sialidase spricht, wie sie schon an anderer Stelle beobachtet wurde (↪ 4.3.2, ↪ Abbildung 15).



**Abbildung 26** Elektrophoretische Auftrennung und SNA- und PNA-Lektinnachweis von nativen und VCS-behandelten Caseinen und Molkenproteinen aus humaner, boviner und Kamel-Milch.

Auftrennung von 10  $\mu$ g bzw. 2,5  $\mu$ g unbehandelten oder VCS-behandelten Caseinen oder Molkenproteinen unter reduzierenden Bedingungen mittels SDS-PAGE in einem 12-%igem Polyacrylamidgel. Die Gele wurden Coomassie gefärbt oder geblottet und mit 2  $\mu$ g/mL PNA oder 0,5  $\mu$ g/mL SNA eine Lektindetektion durchgeführt. Für die VCS-Behandlung wurden 50  $\mu$ g Protein mit 50 mU *GlycoCleave*®VCS für 4 h bei 37°C inkubiert. Als Positivkontrolle diente humanes Laktoferrin. Abkürzungen: bovin (b), human (h), Kamel (k), Casein (C), Molkenproteine (M), Laktoferrin (L), VCS-behandelt (V), Proteinstandard (M).

**Tabelle 11** Tabellarische Zusammenfassung der nachgewiesenen Proteine in Caseinen und Molkenproteinen nach Auftrennung mittels SDS-PAGE.

Nach Auftrennung mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung, SNA- oder PNA-Detektion in Molkenproteinen (M) oder Caseinen (C) aus boviner (b), humaner (h) oder Kamel-Milch (k) nach VCS-Behandlung oder ohne Behandlung nachgewiesene Proteine. Das Molekulargewicht der Proteine gibt die Position ihrer Banden im Gel wieder. Ein positiver Nachweis wird mit „+“, nicht-nachweisbar wird durch „-“ gekennzeichnet. „Schmier“ bedeutet, eine diffuse breite Bande.

Nr.	Probe	Mw (kDa)	Coomassie	SNA (nativ)	PNA (VCS-)
1	KCa, hCa, bCa, hMo, bMo	>>180	-	-	+
2	hCa, hMopo,	120-180	+	+	+
	kCa	120-180	+	-	+
3	hCa, bCa, hMo, bMo, hLf	70-100	+	+	+
	kCa	70-100	+	-	+
4	hCa, kCa, hMo, bMo	> 55	+(Schmier)	+	+
	bCa	> 55	+(Schmier)	-	-
5	hC, hMo, bCa,	35-50	+(Schmier)	+	+
	bMo	40	+	-	-
6	hCa, kCa, bCa	25-32	+	-	+
7	hMo	25-30	+	-	-
	bMo	25-30	+	-	+
8	hCa, kCa, bCa	< 25	+	-	-
9	hCa, kCa, bCa, bMo, hMo	< 20	+	-	-

#### 4.7.2 Analyse der Caseine durch Auftrennung mittels 2D-PAGE mit Proteinfärbung und Lektindetektion

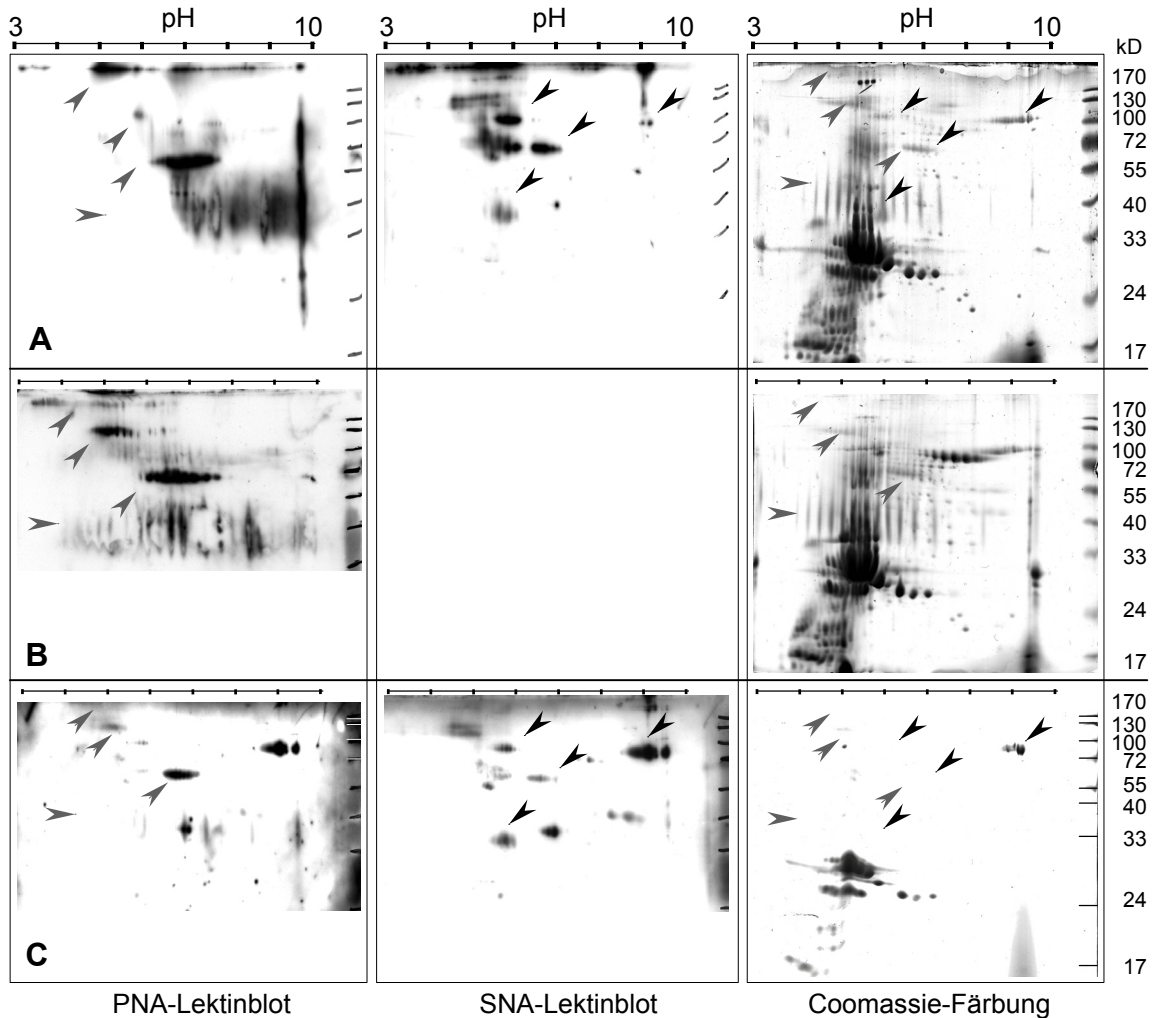
Nachdem die eindimensionale Auftrennung der Milchproteine nur begrenzte Differenzierungen der Proteine in den Milchproteinfraktionen zuließ, wurde dazu übergegangen diese zweidimensional aufzutrennen: nach ihrem isoelektrischen Punkt (pI) über einen pH-Bereich von 3-10 und anschließend nach ihrem Molekulargewicht (Mw) (☞3.14.2).

Es wurden zunächst unterschiedliche Mengen humaner Caseine mittels 2D-PAGE aufgetrennt, Coomassie gefärbt und ein Lektinnachweis mit SNA und PNA durchgeführt (☞Abbildung 27). Für den PNA-Nachweis wurden sowohl durch HCl-Behandlung desialyrierte humane Caseine, als auch unbehandelte Caseine eingesetzt. In **Abbildung 28** werden mittels 2D-PAGE aufgetrennte humane Caseine (H) mit bovinen (B) und Kamel-Caseinen (K) miteinander verglichen. Die nachweisbaren Hauptproteine, ihr Mw und pI sind in **Tabelle 12** dargestellt.

Nach zweidimensionaler elektrophoretischer Auftrennung humaner, boviner und Kamel-Caseine (☞Abbildung 28) mittels 2D-PAGE wurde deutlich, dass die Caseine (Mw 25-32 kDa) dominieren und sich vor allem durch unterschiedliche isoelektrische Punkte aber geringere Molekulargewichtsänderungen auszeichnen.

Caseine sind stark phosphorylierte und zum Teil glykosylierte Proteine. Diese Modifikationen können die Heterogenitäten der verschiedenen Casein-Subtypen in der 2D-PAGE erklären.

Die Caseine selbst konnten durch SNA nicht nachgewiesen werden, dafür konnten aber weitere Proteine in der Caseinfraction detektiert werden. Bei humanen Caseinen (⇨ **Abbildung 27**) konnten dabei deutlich mehr sialylierte Proteine identifiziert werden, wie schon zu **Abbildung 26** beschrieben. Die Mehrheit der mit SNA detektierten Glykoproteine hatten ein Molekulargewicht über 40 kDa.

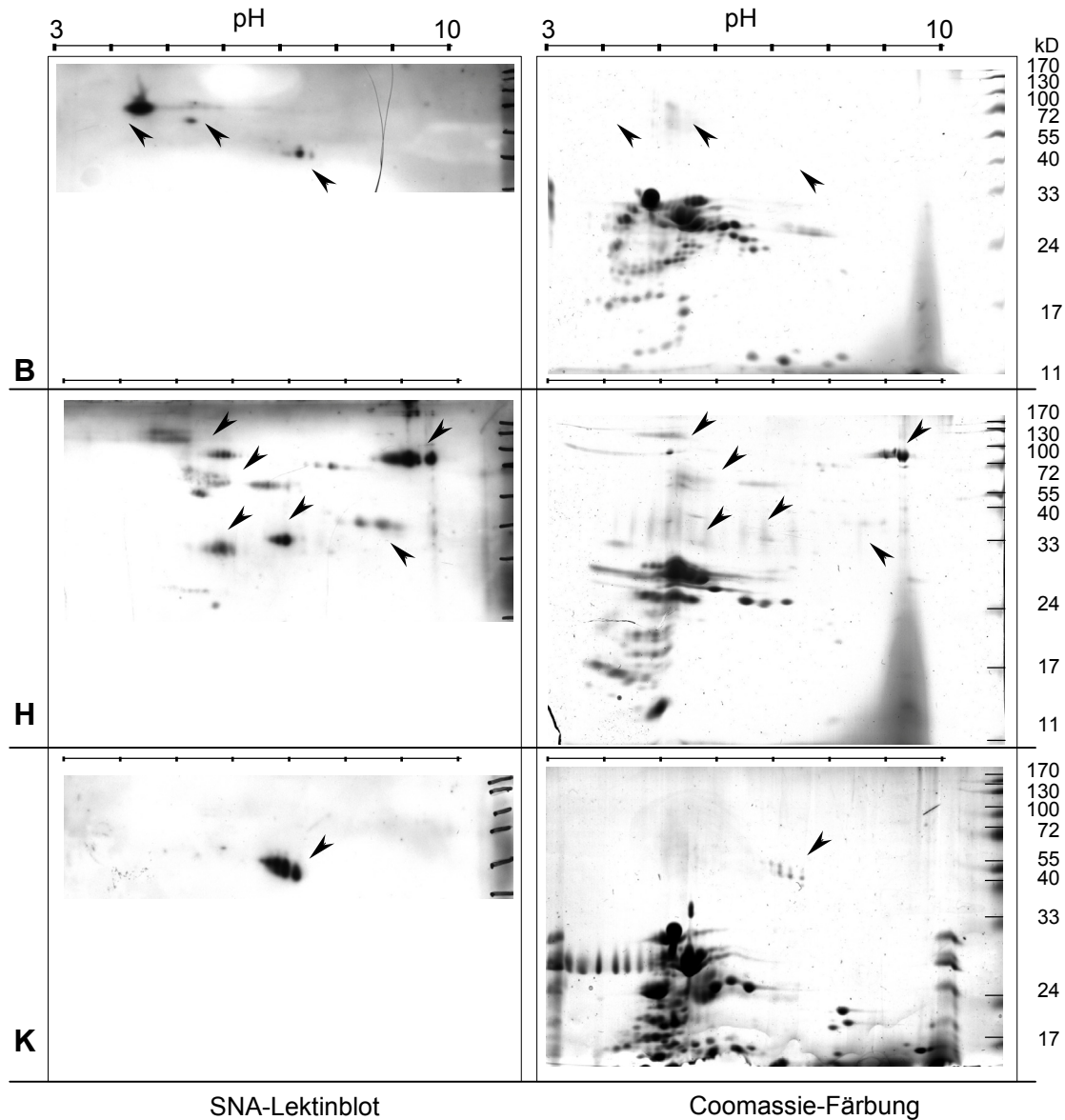


**Abbildung 27** PNA- und SNA-Lektinnachweis von humanen Caseinen nach zweidimensionaler elektrophoretischer Auftrennung.

25, 50 und 125 µg humane Caseine wurden mittels 2D-PAGE in einem 12-%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt, Coomassie gefärbt oder auf eine Membran geblottet und eine Lektindetektion mit SNA oder PNA durchgeführt. Es wurden **(A)** 125 µg Casein (bei der PNA-Detektion: HCl-behandelte Caseine ⇨ 3.12), **(B)** 140 µg Casein und **(C)** 25µg Casein eingesetzt. Die Pfeile kennzeichnen gleiche Spotmuster in den 2D-Gelen.

Mit PNA konnten in der desialylierten Probe hauptsächlich Spots im basischen pH-Bereich erkannt werden. Durch Coomassie-Färbung konnte eine Vielzahl vertikaler Spots mit heterogenen pIs von 4-10 und mit einem apparenten Molekulargewicht über 35-50 kDa angefärbt werden. PNA erkennt diese Spots bei desialylierten Caseinen erst ab pH 6, bei

nativen Caseinen über den gesamten pH-Bereich. Ohne Sialinsäuren haben Glykoproteine generell einen basischeren pI. Da von PNA unbehandelte Glykoproteine mit saurem pI erkannt wurden, scheinen die *O*-Glykane an den Proteinen als Gemisch sialylierter und desialylierter Strukturen vorzukommen.



**Abbildung 28** SNA- und Coomassie-Nachweis von bovinen, humanen und Kamel-Caseinen nach zweidimensionaler elektrophoretischer Auftrennung.

Es wurden je 25µg bovine (B), humane (H) und Kamel-(K) Caseine mittels 2D-PAGE in einem 12-%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und Coomassie gefärbt oder auf eine Membran geblottet und eine Lektindetektion mit SNA durchgeführt. Die Pfeile kennzeichnen gleiche Spotmuster in den 2D-Gelen.

**Tabelle 12** Tabellarische Zusammenfassung der nachgewiesenen Proteine in humanen, bovinen und Kamel-Caseinen nach Auftrennung mittels 2D-PAGE sowie Proteinfärbung und Lektinnachweis.

Nachgewiesene Proteine aus humanen, bovinen und Kamel-Caseinen nach Auftrennung mittels 2D-PAGE mit nachfolgender Coomassie-Färbung oder SNA-Detektion (und PNA-Detektion bei humanen Caseinen) (⇨Abbildung 27, Abbildung 28). Die Positionen der nachgewiesenen Proteine im 2D-Gel werden durch das apparente Mw und den pIs dargestellt. Die Nummerierungen beziehen sich auf die in Tabelle 11 angegebenen Mw-Bereiche. Die Liganden aus der CD22-Fc-Affinitätschromatographie mit den Caseinen sind fett gedruckt (⇨4.8.1). ‚35-50‘ kDa steht für hohe-vertikale Spots.

Nr.	humane Caseine				bovine Caseine			Kamel-Caseine		
	Mw (kDa)	pl Coo	pl SNA	pl PNA	Mw (kDa)	pl Coo	pl SNA	Mw (kDa)	pl Coo	pl SNA
2	120-180	4,5-6	4,5-6	5-6	/	/	/	/	/	/
3	~100	5-6	5-6	6	70-100	4-5	/	/	/	/
	<b>70-100</b>	<b>7-8,5</b>	(7-8,5)	(7-8,5)						
	<b>70-100</b>	<b>8,5-9,5</b>	<b>8,5-9,5</b>	8,5-9,5						
4	> 55	5-7,5	5-7,5	6-7,5	> 55	~ 5,5	~ 5,5	/	/	/
5	‚35-50‘	4-8	/	(4)6-10	40-55	7-7,5	7-7,5	<b>40-55</b>	<b>6,5-7,5</b>	<b>6,5-7,5</b>
	<b>33(-40)</b>	<b>5-6</b>	5-6	?						
	33-40	6,5-7,2	6,5-7,2	/						
	> 40	8-9	8-9	/						
6	< 32	5,5-6			< 32	<b>4-5</b>		< 32	<b>4,8-5,3</b>	
	~ 27-32	<b>5-6,5</b>			25-32	4,8-5,5		25-32	5-6	
	~ 27	<b>4,5 -6</b>						30	3-5	
	>25	<b>4,7-6</b>			> 25	5,5-6,5		> 25	5,5-6,5	

Nach dem Nachweis sialylierter Proteine in Caseinen sollten diese in der Affinitätschromatographie mit CD22 eingesetzt werden, um potentielle (sialylierte) Liganden aufzureinigen und zu identifizieren.

## 4.8 Affinitätschromatographie von Milchglykoproteinen mit CD22-Fc

### 4.8.1 Affinitätschromatographie mit bovinen, humanen und Kamel-Caseinen

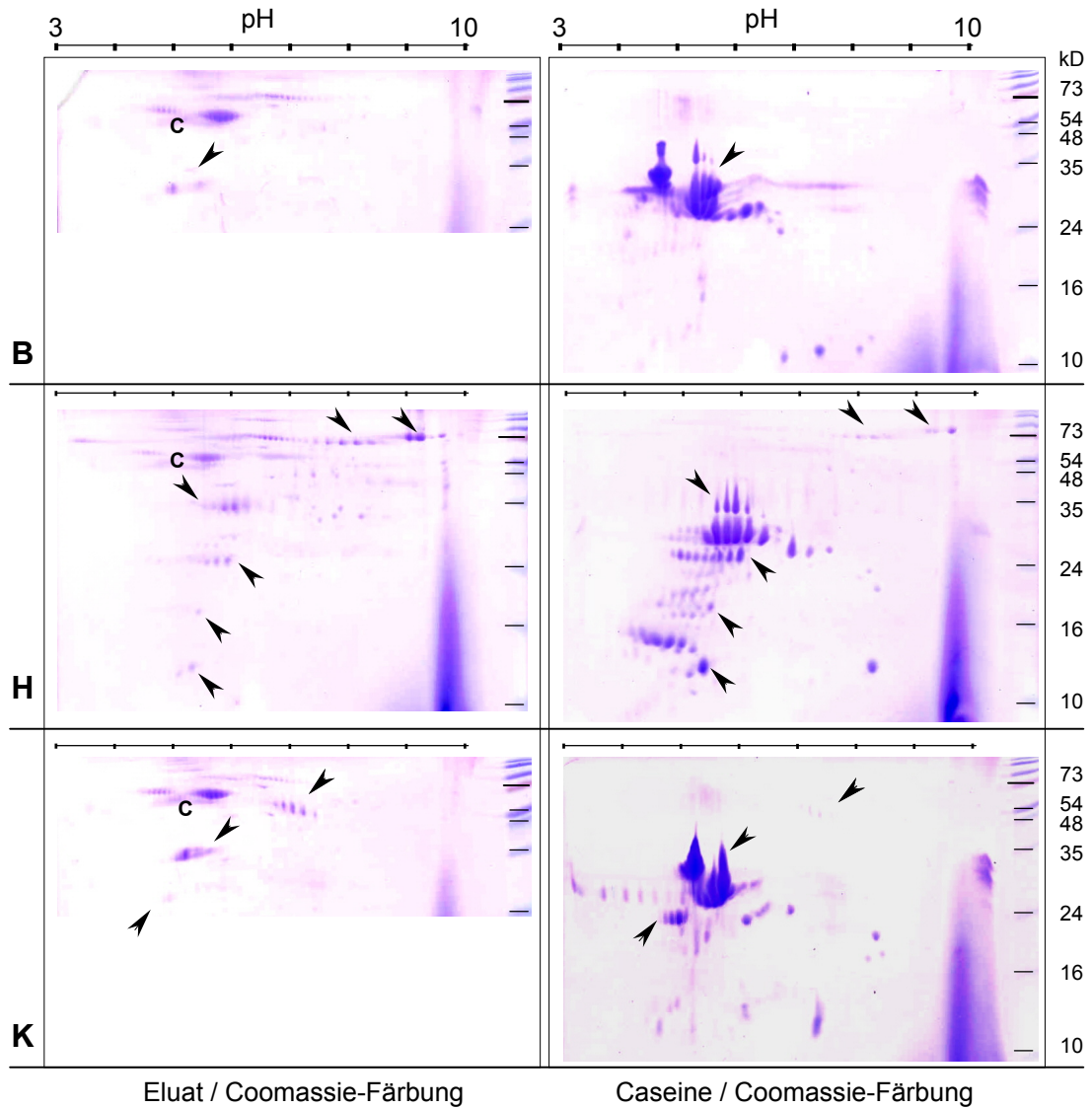
Die Affinitätschromatographie von bovinen (B), humanen (H) und Kamel-Caseinen (K) wurde mit CD22-Fc durchgeführt, welches über den Fc-Teil an Protein A-Sepharose gebunden wurde (↪3.16). Aufgrund dieser gerichteten Anbindung an den Träger sollte die Sialinsäure-Bindungsdomäne von CD22-Fc frei vorliegen. Bei dieser Anbindung wird das CD22-Fc jedoch nicht-kovalent gekoppelt. Es besteht die Gefahr, dass es während der Aufreinigungs- und Elutionsschritte vom Träger abgelöst wird. Die Spezifität der Affinitätschromatographie mit CD22-Fc wurde durch die Elution mit dem CD22-affinem Sialinsäurederivat BPC-Neu5Ac verstärkt. Auf diese Weise sollten Liganden, die spezifisch über die Sialinsäure-Bindungsstelle an CD22-Fc gebunden haben, durch das BPC-Neu5Ac verdrängt und dadurch eluiert werden. Die Coomassie-gefärbten, mittels 2D-PAGE aufgetrennten Eluate und Caseine wurden vergleichend dargestellt (↪**Abbildung 29**) und erstere mit den mittels SNA detektierten, elektrophoretisch aufgetrennten Caseinen aus **Abbildung 28** verglichen (↪**Abbildung 30**). Anhand durch Coomassie-Färbung detektierten Proteine im mittels 2D-PAGE aufgetrennten BPC-Neu5Ac-Eluat zeigte sich, dass aus allen Caseinen potentielle CD22-Liganden aufgereinigt werden konnten. Diese sind in **Tabelle 12 fett** hervorgehoben.

Aus allen eingesetzten Caseinen konnten Proteine mit einem apparenten Mw zwischen 33-55 kDa und einem pI um 5-7,5 aufgereinigt werden. Bei bovinen Caseinen sind diese Proteine in dieser **Abbildung** nur schwach oder gar nicht zu erkennen. Diese Proteine konnten mit SNA nachgewiesen werden. Weiterhin wurden aus allen Caseinen Proteine aufgereinigt, die ein apparentes Mw unter 35 kDa haben, pIs um 5 besitzen und mit SNA nicht nachweisbar waren.

Die meisten Liganden wurden aus humanen Caseinen aufgereinigt. Dort konnten auch Proteine mit einem apparenten Mw < 100 kDa und weitere Proteine mit einem Mw > 70 kDa nachgewiesen werden, die überwiegend durch SNA als  $\alpha$ 2,6-sialylierte Proteine identifiziert wurden.

In allen Eluaten können Proteine mit einem Mw bei 55-75 kDa mit pIs zwischen 5-6 und bei ca. 90 kDa mit pI zwischen 5,8-7,5 nachgewiesen werden, bei denen es sich, wie in folgenden **Abbildungen** gezeigt (↪**Abbildung 31**), um CD22-Fc handelt. Im weiteren Verlauf wurden Affinitätschromatographien von humanen Caseinen mit CD22-Fc, das auf unterschiedliche Weise an eine Matrix immobilisiert wurde, durchgeführt (↪2.2.3). Dabei war vorrangiges Ziel, CD22-Fc-Kontaminationen im Eluat auszuschließen, aber Liganden in präparativen Mengen aufzureinigen.

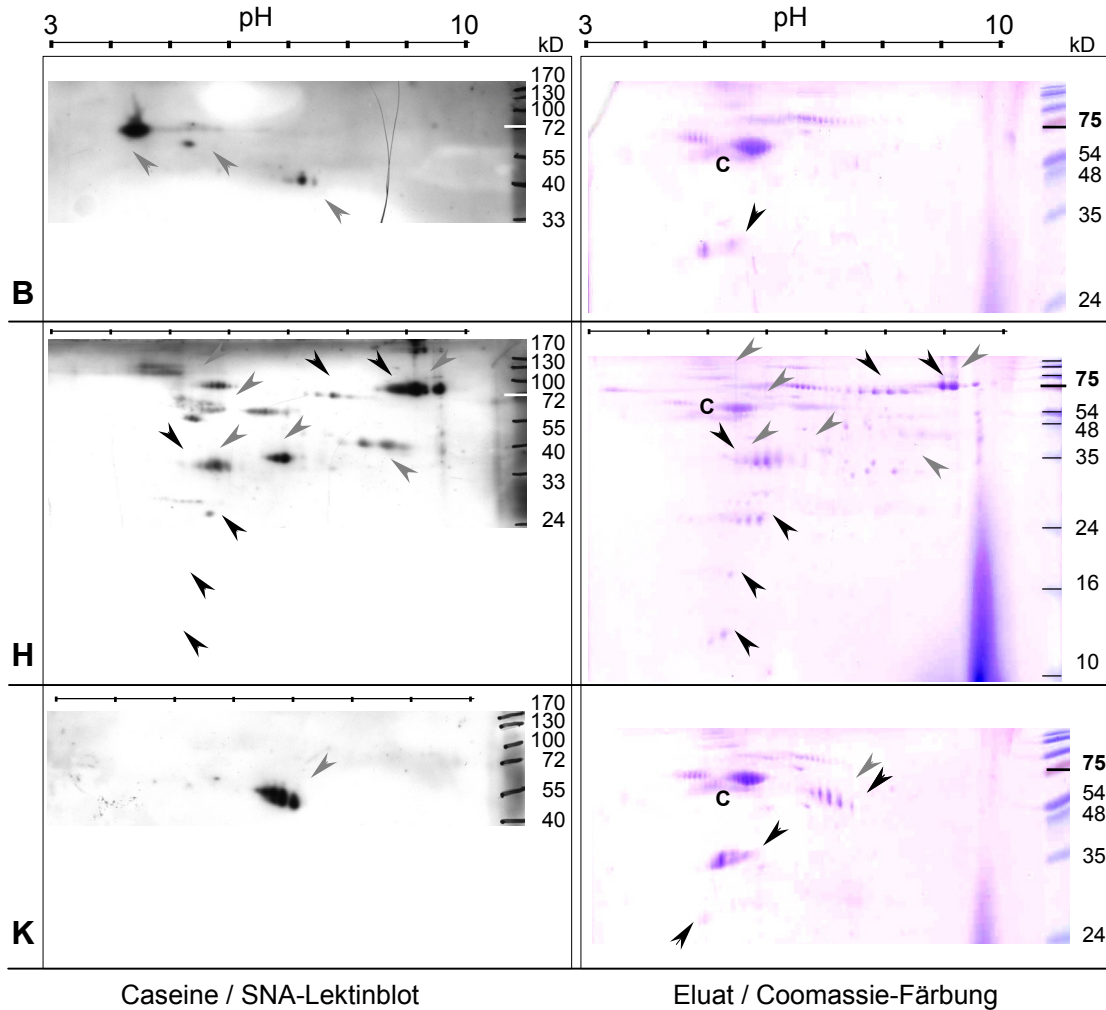




**Abbildung 29** Eluate der Affinitätschromatographie von bovinen, humanen und Kamel-Caseinen mit CD22-Fc vs. den Caseinen nach zweidimensionaler elektrophoretischer Auftrennung.

Die Affinitätschromatographie wurde von 2 mg bovinen (**B**), humanen (**H**) oder Kamel-Caseinen (**K**) mit Protein A-Sepharose-gebundenem CD22-Fc (220  $\mu\text{g}$  an 10  $\mu\text{L}$ ) über Nacht bei 4°C durchgeführt. Eluiert wurde mit 100  $\mu\text{L}$  0,75 mM BPC-Neu5Ac. Die Eluate (links) und 50  $\mu\text{g}$  Caseine (rechts) wurden mittels 2D-PAGE in einem 15-%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und Coomassie gefärbt. Die Pfeile kennzeichnen gleiche Spotmuster in den 2D-Gelen von Eluat und Caseinen (potentielles CD22-Fc: C).





**Abbildung 30** Eluate der Affinitätschromatographie von bovinen, humanen und Kamel-Caseinen mit CD22-Fc vs. SNA-Nachweis von Caseinen nach zweidimensionaler elektrophoretischer Auftrennung.

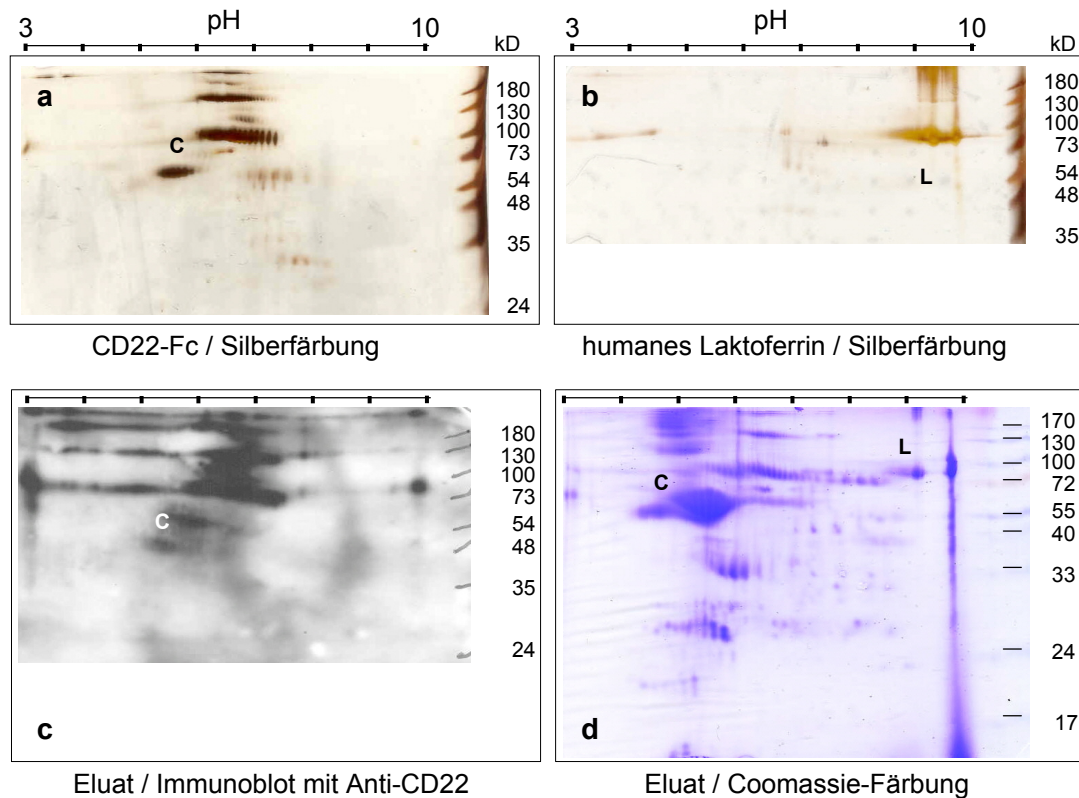
**(links)** 25 µg Caseine wurden mittels 2D-PAGE in einem 12-%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf eine Membran geblottet und eine Lektindetektion mit SNA durchgeführt.

**(rechts)** Die Affinitätschromatographie wurde von 2 mg bovinen (**B**), humanen (**H**) oder Kamel-Caseinen (**K**) mit Protein A-Sepharose-gebundenem CD22-Fc (220 µg an 10 µL) ü.N. bei 4°C durchgeführt. Eluiert wurde mit 100 µL 0,75 mM BPC-Neu5Ac. Die Eluate wurden mittels 2D-PAGE in einem 15-%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. Die grauen Pfeile kennzeichnen mit SNA nachgewiesene Spots, die schwarzen Pfeile die Spots potentieller CD22-Liganden (potentielles CD22-Fc: C) in den 2D-Gelen.

#### 4.8.2 Vergleichende Affinitätschromatographie von humanen Molkenproteinen mit CD22-Fc

Für die Affinitätschromatographie von humanen Molkenproteinen mit CD22-Fc wurden vor allem Liganden im Molekulargewichtsbereich >60 kDa erwartet. Die CD22-Fc-Affinitätschromatographie von den Caseinen hatte gezeigt, dass vermutlich CD22-Fc während der Elution von der Matrix dissoziiert und in größeren Mengen im Eluat vorhanden ist. Außerdem wurde aufgrund der vorherigen Ergebnisse vermutet, dass Laktoferrin ein potentieller CD22-Ligand sein könnte. Daher wurden CD22-Fc und Laktoferrin, sowie das

Eluat einer Affinitätschromatographie von humanen Caseinen mit CD22-Fc mittels 2D-PAGE aufgetrennt, die Proteine wurden gefärbt und CD22-Fc immunologisch durch Anti-CD22 nachgewiesen (⇨ **Abbildung 31**).



**Abbildung 31** Immunologischer Nachweis von CD22-Fc im Eluat der Affinitätschromatographie sowie Silberfärbung von CD22-Fc und Laktoferrin nach zweidimensionaler elektrophoretischer Auftrennung.

30 µg Laktoferrin (**b**) aus humaner Milch und 13 µg CD22-Fc Wt (**a**) wurden mittels 2D-PAGE in einem 10-%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und Silber gefärbt.

(**c,d**) BPC-Neu5Ac (100 µL 1mM)-Eluat der Affinitätschromatographie von humanen Caseinen (2 mg) mit CD22-Fc Wt (100 µg) gekoppelt an Protein A-Sepharose (20 µL). Das Eluat wurde mittels 2D-PAGE in einem 10-%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Der Nachweis erfolgte durch (**d**) Coomassie-Färbung oder (**c**) oder immunologisch nach Western-Blotting mit einem anti-CD22-Antikörper.

Das Laktoferrin hat ein aufgrund seiner Aminosäuresequenz ein errechnetes Mw von 78 kDa und einen pI von 8,6. Nach Auftrennung von Laktoferrin mittels 2D-PAGE konnten Proteinspots mit einem apparenten Mw von 85-90 kDa und pIs zwischen 8,6 bis 9,6 nachgewiesen werden (⇨ **Abbildung 31 b**). Die Differenzen sind auf die Glykosylierung von Laktoferrin zurückzuführen. Diese Spotmuster konnten in aufgetrennten humanen Caseinen mittels Coomassie-Färbung und SNA-Detektion, sowie im Eluat der CD22-Affinitätschromatographie von humanen Caseinen nachgewiesen werden (⇨ **Abbildung 27**, **Abbildung 30**).

Für die Hauptbande einer Untereinheit von CD22-Fc konnte bereits eine Bande mit einer apparente Molekularmasse von etwa 90 kDa identifiziert werden (☞ Abbildung 7). Sie konnte sowohl bei CD22-Fc als auch im Eluat der CD22-Fc-Affinitätschromatographie nach Auftrennung mittels 2D-PAGE durch Proteinfärbung und mittels Immunoblot mit Anti-CD22 nachgewiesen werden (☞ **Abbildung 31 a/c/d**). Die Heterogenität von CD22-Fc, ersichtlich anhand der pIs zwischen 5,8-7,5, kann auf Glykane an den potentiellen *N*-Glykosylierungsstellen des Proteins zurückgeführt werden (☞ Abbildung 36, Anhang). Außerdem wurden weitere Spots mit Molekularmassen zwischen 55-75 kDa und pIs um 5,5 und >100 kDa und pIs zwischen 5,8-7,5 als CD22-Fc identifiziert. Es handelt sich dabei wahrscheinlich um Nebenprodukte oder Aggregate von CD22-Fc (☞ 4.2), da sie mit dem CD22-spezifischen Antikörper detektiert werden konnten (☞ **Abbildung 31 c**).

Humane Molkenproteine enthalten Immunglobuline, vor allem sIgA, aber auch IgG und IgM, deren schweren Kette ein apparentes Molekulargewicht zwischen 50-70 kDa hat. Zum Vergleich mit dem Eluat der Affinitätschromatographie von humanen Molkenproteinen (☞ **Abbildung 32 B,C**) wurden daher mittels 2D-PAGE aufgetrenntes und Silber-gefärbtes humanes IgM (hellgrauer Pfeil, C) sowie CD22-Fc (grauer Pfeil, B) eingesetzt, um Hinweise auf ähnliche Spotmuster zu bekommen. Zur Kontrolle der Sialinsäure-abhängigen Bindung der humanen Molkenproteine wurde die CD22-Fc Dreifachmutante in der Affinitätschromatographie eingesetzt (☞ **Abbildung 32 D,E**). Es konnten keine CD22-spezifischen Liganden eluiert werden. Vielmehr konnte auch hier eine Ablösung der CD22-Fc-Chimären nach der 30-minütigen Elution gezeigt werden. Durch Elution bei pH 3 wurden alle an Protein A-gebundenen Moleküle eluiert und es zeigte sich, dass es sich überwiegend um CD22-Fc handelte (E). Da weitere Proteine durch die pH-Senkung miteluiert wurden, wurden eine Affinitätschromatographie von humanen Molkenproteinen mit Protein A, welches hochspezifisch an IgG bindet, durchgeführt (☞ **Abbildung 32 F**). Es konnte dasselbe Spotmuster bei einem apparenten Mw von 55 kDa und pIs zwischen 6-9 nachgewiesen werden. Wie bei IgM wurden Proteine im Molekulargewichtsbereich der leichten Kette der Immunglobuline detektiert.

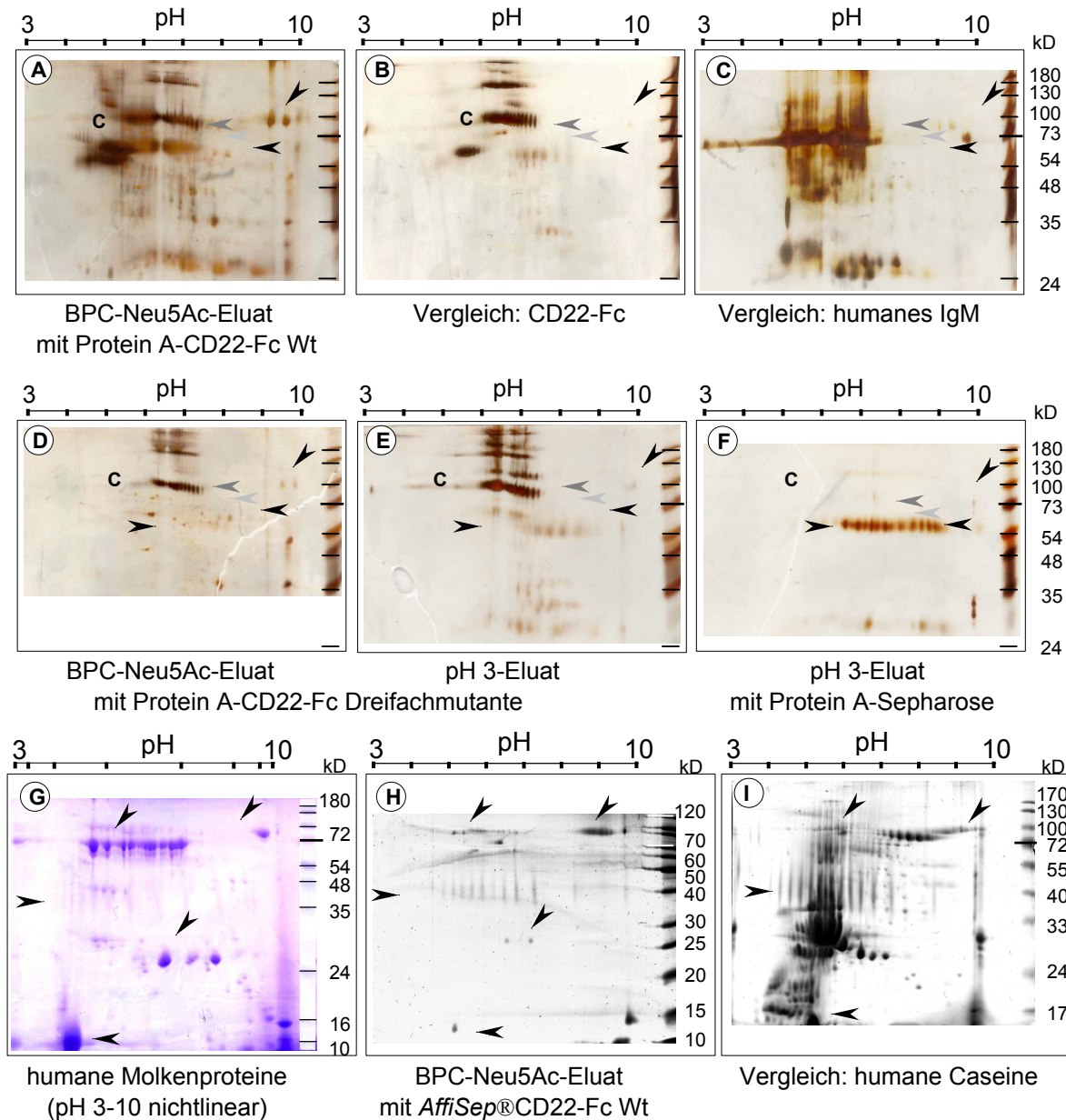
Der Einsatz von Protein A-Sepharose führte bei den Molkenproteine aufgrund der CD22-Kontaminationen zur Problemen bei der Detektion von potentiellen CD22-Liganden. Es wurde daher kovalent gekoppeltes *AffiSep*®CD22-Fc in der Affinitätschromatographie eingesetzt (☞ **Abbildung 32 H**). In dem resultierenden Eluat konnten die bereits in aufgetrennten humanen Caseinen detektierten, charakteristischen vertikalen Spots mit einem pI von 4 bis 8 nachgewiesen werden. Die in Molkenproteinen sowie im Eluat der Affinitätschromatographie von Molkenproteinen mit Protein A-CD22-Fc detektierten Spots mit einem apparenten Mw von 70-100 kDa und pIs zwischen 5-7 konnte nur unzureichend nachgewiesen werden (☞ **Abbildung 32 G,H**). Dafür konnten die potentiellen Laktoferrinspots in allen drei Gelen detektiert werden. Die Ergebnisse aus Abbildung 31 und 32 wurden in **Tabelle 13** zusammengefasst.

**Tabelle 13** Tabellarische Zusammenfassung von Molkenproteinen und der verschiedenen Eluate der Affinitätschromatographie von humanen Molkenproteinen nach Auftrennung mittels 2D-PAGE und Proteinfärbung vergleichend zu den mittels Protein- und Lektindetektion nachgewiesenen Proteinen in humanen Molkenproteinen nach SDS-PAGE.

(A) Nach Auftrennung mittels SDS-PAGE, Coomassie-Färbung, SNA- oder PNA-Detektion in Molkenproteinen nachgewiesene Proteine. Das Molekulargewicht der Proteine gibt die Position ihrer Banden im Gel wieder. Ein positiver Nachweis wird mit „+“, nicht nachweisbar wird durch „-“ gekennzeichnet ( aus Abbildung 25, Abbildung 26, Tabelle 11)

(B) Nach Auftrennung mittels 2D-PAGE und Coomassie- oder Silberfärbung in Molkenproteinen/ nach unterschiedlichen Affinitätschromatographieansätzen von Molkenproteinen im Eluat nachgewiesene Proteine. Das Mw und der pI der Proteine geben ihre Positionen im Gel wieder. „Eluate“ beziehen sich, wenn nicht anders benannt, auf die Eluate aus Affinitätschromatographie von humanen Molkenproteinen mit Protein A /-gekoppelten Fc-Chimären. Angegeben sind in Klammern die Buchstabencodes analog zu Abbildung 31 und Abbildung 32.

Nr.	(A) Molkenproteine / SDS-PAGE				(B) Eluat-/Molkenproteine + Vergleichsproteine / 2D-PAGE		
	Mw (kDa)	Coo	SNA (nativ)	PNA (VCS-)	Mw (kDa)	pI	Proteine wurden nachgewiesen bei:
/					>150 90 (55-75)	6-7,5 5,8-7,2 (5,5)	BPC-Neu5Ac-Eluat mit CD22-Fc Triple (D) pH3-Eluat von CD22-Fc Triple (E) BPC-Neu5Ac-Eluat mit CD22-Fc Wt (A) <b>CD22-Fc / Silberfärbung + Anti-CD22 (c,d)</b>
3	70-100	+	+	+	85-90	8,6-9,6	<b>Laktoferrin / Silberfärbung (b)</b> BPC-Neu5Ac-Eluat mit <i>AffiSep</i> CD22-Fc (H) BPC-Neu5Ac-Eluat mit CD22-Fc Wt (A) Molkenproteine / Coomassie (G) humane Caseine / Coomassie (I)
/					70	5-7,5	<b>IgM / Silberfärbung (schwere Kette) (C)</b>
4	> 55 -75	+	+	+			Molkenproteine / Coomassie (G) BPC-Neu5Ac-Eluat mit CD22-Fc Wt (A) BPC-Neu5Ac-Eluat mit <i>AffiSep</i> CD22-Fc (H) ?
(4)	55				~55 ~ 55	7-9 6-9	pH3-Eluat mit CD22-Fc Triple (E) <b>pH3-Eluat mit Protein A (F)</b>
5	35-50	+	+	+	,35-50' vertikal	4-8	BPC-Neu5Ac-Eluat mit <i>AffiSep</i> CD22-Fc (H) <b>humane Caseine / Coomassie (I)</b>
7	25-30	+	-	-	> 24	6-8	IgM / Silberfärbung ( <b>leichte Kette</b> ) (C) Molkenproteine / Coomassie (G) BPC-Neu5Ac-Eluat mit CD22-Fc Wt (A) BPC-Neu5Ac-Eluat mit <i>AffiSep</i> CD22-Fc (H) pH3-Eluat mit CD22-Fc Triple (E) pH3-Eluat mit Protein A (F)
9	< 20	+	-	-	< 16	5	Molkenproteine / Coomassie (G) BPC-Neu5Ac-Eluat mit <i>AffiSep</i> CD22-Fc (H) humane Caseine mit bovinem <b>Laktalbumin</b> / Coomassie (I) :



**Abbildung 32** Eluate der Affinitätschromatographie von humanen Molkenproteinen mit CD22-Fc, CD22-Fc Triple und Protein A nach zweidimensionaler elektrophoretischer Auftrennung.

Affinitätschromatographie von humanen Molkenproteinen (2 mg) mit Protein A-Sepharose (50  $\mu$ L): **(A)** gekoppelten CD22-Fc Wt (250  $\mu$ g) : BPC-Neu5Ac (100  $\mu$ L 1mM)-Eluat; **(D)** gekoppelten CD22-Fc Dreifachmutante (250  $\mu$ g): BPC-Neu5Ac (100  $\mu$ L 1mM)-Eluat und **(E)** Eluat mit 200  $\mu$ L 0,1 M Glycin pH 3 nach der BPC-Neu5Ac-Elution; **(F)** ohne Fc-Chimären: Eluat mit 200  $\mu$ L 0,1 M Glycin pH 3 (pH3-Eluat)

**(B)** CD22-Fc Wt (13  $\mu$ g) (grauer Pfeil) und **(C)** humanes IgM (Dianova) 20  $\mu$ g (dunkelgrauer Pfeil)

**A-F** wurden mittels 2D-PAGE in einem 10-%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und Silber gefärbt. (schwarze Pfeile A-C: möglicher Ligand in A; schwarze Pfeile D-F: möglicherweise schwere Kette von IgG)

**(G)** 140  $\mu$ g humane Molkenproteine mittels 2D-PAGE in einem nichtlinearen IPG-Streifen pH 3-10 und in einem 8-16-%igen Gradientenfertigel (BIORAD) aufgetrennt und Coomassie gefärbt.

**(H)** BPC-Neu5Ac (50  $\mu$ L 3mM)-Eluat der Affinitätschromatographie von humanen Molkenproteinen (2 mg) mit *AffiSep*®CD22-Fc Wt -MiniSpin-Säule und **(I)** 140  $\mu$ g humane Caseine mittels 2D-PAGE in einem 12-%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und Coomassie gefärbt. ( schwarze Pfeile G-I: mögliche Liganden)

#### 4.8.3 Vergleich der Affinitätschromatographie von humanen Caseinen mit kovalent gekoppeltem und Protein A-gebundenem CD22-Fc

Eine Möglichkeit, die Ablösung von CD22-Fc von der Matrix zu verhindern, ist die kovalente Kopplung von CD22-Fc an die Matrix. NHS-aktivierte Sepharose besteht aus einer mit einem N-Hydroxysuccinimid (NHS)-Ester derivatisierten Sepharose. Unter Abspaltung von Succinimid reagieren die primären Aminogruppen (Lysine, N-terminale Aminogruppen) von Proteinen mit dem NHS-Ester zu einer stabilen Aminoverbindung. Freie Bindungsstellen können mit Puffern, die reich an Aminogruppen sind, abgesättigt werden. Die Nachteile der kovalenten Kopplung liegen in der Kopplungschemie und in der ungerichteten, unspezifischen Art der Kopplung, durch welche z.B. die Integrität der Bindungstasche bei CD22-Fc gestört werden kann.

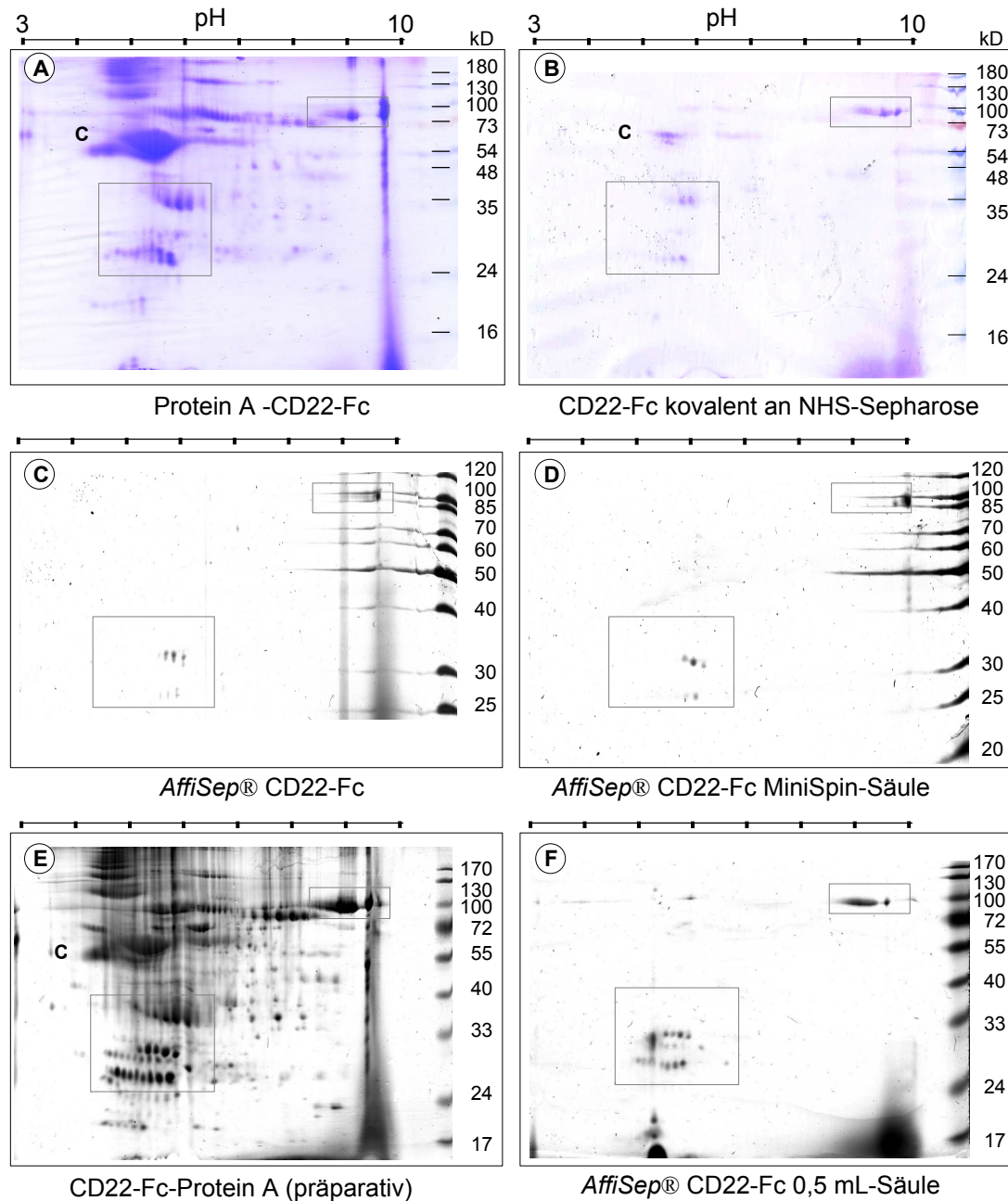
In **Abbildung 33** wurden Eluate verschiedener Affinitätschromatographieansätze von humanen Caseinen mit CD22-Fc nach Auftrennung mittels 2D-PAGE und Anfärbung mit Coomassie dargestellt.

In **Abbildung 33 A/B** wurde CD22-Fc nicht-kovalent an Protein A-Sepharose gebunden oder kovalent an NHS-Sepharose gekoppelt. Bei der Kopplung an Protein A-Sepharose wurde das 2,5-fache an CD22-Fc gebunden, die Anzahl der Bindungsstellen sollte dementsprechend höher sein, da die Kopplung gerichtet war. Tatsächlich konnten mehr Proteine in höheren Quantitäten detektiert werden. Einige der Proteine finden sich in beiden Ansätzen wieder. Sie sind offensichtlich unabhängig von der bei der Kopplung verwendeten Matrix und damit wahrscheinlich CD22-spezifische Liganden. Proteinspots, bei denen es sich wahrscheinlich um CD22-Fc handelt, sind in dem Ansatz mit der kovalenten Kopplung von CD22-Fc deutlich verringert, aber noch detektierbar (☞ **Abbildung 31**).

Weiterhin wurde CD22-Fc von der Firma GALAB kovalent an eine *AffiSep*®-Matrix gekoppelt (☞ 2.2.3). Die Affinitätschromatographie wurde zum einen mit *AffiSep*®CD22-Fc in Suspension und als Minispin-Säule mit 350 µg gekoppelten CD22-Fc verwendet. Die Menge der aufgereinigten Liganden war bei der MiniSpin-Säule etwas geringer (☞ **Abbildung 33 D**). Bei gleicher Menge gebundener CD22-Fc-Chimären bei den Ansätzen A,C und D konnte festgestellt werden, dass die Menge an Liganden durch die kovalente Kopplung (C/D) des CD22-Fc zurückgeht. Die Reinheit des Eluats ist jedoch für eine effiziente Affinitätschromatographie und Identifizierung der Liganden essentiell. In dem Eluat aus den Ansätzen mit *AffiSep*®CD22-Fc konnte kein potentielles CD22-Fc detektiert werden. Ein weiterer Vorteil war, dass die Säulen nach Regeneration mehrmals gebraucht werden konnten.

Für die Affinitätschromatographie im präparativen Maßstab wurden zwei *AffiSep*®CD22-Fc mit jeweils 2,9 mg kovalent gekoppeltem CD22-Fc eingesetzt und der Einsatz an humanen Caseinen deutlich erhöht (☞ **Abbildung 33 F**).





**Abbildung 33** Eluat der Affinitätschromatographie von humanen Caseinen mit kovalent und nicht-kovalent gekoppeltem CD22-Fc nach zweidimensionaler elektrophoretischer Auftrennung.

Affinitätschromatographie von 1,5 mg humanen Caseinen mit (A) Protein A-Sepharose-gebundenem CD22-Fc (900 µg an 100 µL) und (B) an NHS-Sepharose kovalent gekoppeltem CD22-Fc (ca. 375 µg an 50 µL). Eluiert wurde mit 100 µL 3 mM BPC-Neu5Ac. (C) 100 µL *AffiSep*®CD22-Fc oder mit (D) *AffiSep*®CD22-Fc MiniSpin-Säule. Eluiert wurde mit 50 µL 3 mM BPC-Neu5Ac. Die Eluate wurden mittels 2D-PAGE in einem 12-%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und Coomassie gefärbt.

Präparative Affinitätschromatographie von 75 mg humanen Caseinen mit (F) zwei *AffiSep*®CD22-Fc 0,5mL-Säulen, jede wurde mit 1 mL 3 mM BPC-Neu5Ac eluiert. (E) Der Durchlauf der Caseine wurde anschließend mit Protein A-Sepharose-gebundenem CD22-Fc (2,9 mg an 500 µL) eingesetzt. Eluiert wurde mit 500 µL 3 mM BPC-Neu5Ac. Bei beiden präparativen Ansätzen wurden die Eluate gepoolt und mittels 2D-PAGE in jeweils drei 12-%igen Polyacrylamidgelen aufgetrennt und mit PAGE-Blue Proteinfärbelösung gefärbt (∞3.15.1). Die grauen Kästchen kennzeichnen potentielle CD22-Liganden (potentielles CD22-Fc: C).

Um die Ligandenmengen zu erhöhen, wurden der Durchlauf der Caseine aus dem präparativen Ansatz mit *AffiSep*®CD22-Fc in einem weiteren Ansatz mit an Protein A-Sepharose gekoppeltem CD22-Fc eingesetzt (☞ **Abbildung 33 E**). Ausgewählte Proteinspots aus beiden präparativen Ansätzen wurden für ihre Identifikation „in-Gel“ tryptisch verdaut (☞ 3.17), die Peptide massenspektrometrisch analysiert und über ihren Peptidmassen-„Fingerabdruck“ identifiziert (☞ **Abbildung 34**).

#### 4.9 Identifizierung von CD22-Liganden aus humanen Caseinen mittels Peptidmassen-„Fingerabdrucks“

Bei den Caseinen handelt es sich um relativ hydrophobe Proteine (Schlimme et al., 1995). Bei ersten Experimenten mit ausgewählten Proteinbanden aus Eluaten der Affinitätschromatographie von Caseinen mit CD22-Fc sowie aus humanen Caseinen konnten keine aussagekräftigen Ergebnisse nach massenspektrometrischer Analyse erzielt werden. In der 1D-PAGE aufgetrenntes Laktoferrin konnte dagegen ohne Probleme aufgrund seines Peptidmassen-„Fingerabdrucks“ identifiziert werden. Es wurde angenommen, dass hydrophobe Peptide während der Aufbereitung für die massenspektrometrische Analyse an die Plastikwände der Reagiergefäße adhären. Daher wurde die Aufbereitung derselben Proben in verschiedenen Reagiergefäßen durchgeführt, die zudem vor ihrem Einsatz mit Acetonitril behandelt wurden. Es wurde festgestellt, dass bei der Verwendung bestimmter Reagiergefäße die Peptide während der Aufbereitung reduziert wurden, da sie massenspektrometrisch nicht analysiert werden konnten. Für die folgenden Aufbereitungen der Proben wurden daher nur 1,5 mL-Reagiergefäße von Eppendorf verwendet, bei denen dieser „Peptidverlust“ nicht festgestellt werden konnte.

Für die Identifizierung der CD22-Liganden aus humanen Caseinen wurde eine präparative Affinitätschromatographie mit *AffiSep*®CD22-Fc und mit Protein A-Sepharose-gekoppeltem CD22-Fc durchgeführt (☞ 4.8.3, ☞ **Abbildung 33**). Es wurden Proteine ausgewählt, deren Spots eine relativ große Proteinmenge versprachen und die in unabhängigen Versuchen immer wieder detektiert worden waren. Im Eluat mit *AffiSep*®CD22-Fc konnten Verunreinigungen durch Nebenprodukte von CD22-Fc relativ sicher ausgeschlossen werden. Die Quantitäten der Proteine im *AffiSep*®CD22-Fc-Eluat waren jedoch relativ gering. Für die Analyse wurden daher vorrangig die potentiellen, analogen Proteinspots aus dem Protein A-CD22-Fc-Eluat verwendet, da die Proteinquantitäten, sichtbar anhand der intensiveren Coomassie-Färbung, höher waren. Die für die massenspektrometrische Analyse vorgesehenen Spots sind in den dargestellten Gelen umkreist und nummeriert (☞ **Abbildung 34**).

**Tabelle 14** Nummerierungsgrundlage der ausgewählten Proteinsspots im 2D-Polyacrylamidgel

Nummerierungsgrundlage	Nummerierung	Bsp.
Spot detektiert im <i>AffiSep</i> ®CD22-Fc-Eluat	erste Ziffer	1.
Spot detektiert im Protein A-CD22-Fc-Eluat	erste Ziffer	2.
identische Spots in beiden Ansätzen	zweite Ziffer gleich	1.2 und 2.2



Im aufgetrennten *AffiSep*®CD22-Fc-Eluat gab es für Spot 2.2 und 2.3 keine Entsprechung (☞ **Abbildung 34**). Da diese Spots in den Protein A-Ansätzen sehr prominent waren, wurden sie mitanalysiert. Für Proteinspot 1.4 gab es im Protein A-Ansatz keine Entsprechung, möglicherweise wurde dieses Proteins bereits bei der ersten Affinitätschromatographie mit *AffiSep*®CD22-Fc vollständig aus den humanen Caseinen isoliert. Bovines Laktalbumin wurde ausschließlich dem *AffiSep*®CD22-Fc-Eluat als interner Standard zugefügt.

Die Peptidmassen der aufgetragenen Peptidextrakte wurden durch Marko Mank (Milupa Research) zunächst in einem Voyager MALDI-TOF Massenspektrometrie-System bestimmt und die Identifizierung der Spots mittels Datenbankabgleich der Peptidmassen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in den nachfolgenden Tabellen zusammengefasst. Der Vergleich der erhaltenen Massenspektren zeigte, dass sich bestimmte Peptidmassenverteilungen wiederholten. Proteinspots, die gleiche Peptidmassen enthielten, wurden daher zunächst in Gruppen eingeteilt (☞ **Tabelle 15**).

**Tabelle 15** Gruppierung der analysierten potentiellen CD22-Liganden aus humanen Caseinen aufgrund gleicher Peptidmassen.

Ausgewählte Proteine aus der Auftrennung des Eluats der Affinitätschromatographie von humanen Caseinen mit *AffiSep*®CD22-Fc (1.) und Protein A-CD22-Fc (2.) mittels 2D-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung wurden „in-Gel“ tryptisch verdaut und die Peptidextrakte massenspektrometrisch analysiert.

Gruppe Nr.	Spotziffer	prominente Peptidmassen (Dalton)	Identifiziertes Protein
1	1.1 / 2.0 / 2.1 / 2.3	1097, 1683, 1863, 2087, 2858	Laktoferrin (human)
2	1.6 / 2.6 / 2.7	970, 2267, 2295	$\alpha_{S1}$ -Casein (human)
3	2.5	1634	$\beta$ -Casein (human)
4	2.2	1075,1394,1874,2314	Clusterin <i>precursor</i> (human)
5	1.8	710,1201,1700,2004,3058	$\alpha$ -Laktalbumin (bovin)

Generell wiesen die Spektren aller Peptidextrakte der ausgeschnittenen Proteinspots eine gute Qualität bezüglich des Signal/Nichtsignal-Verhältnisses und der Signalintensitäten auf. Allerdings zeigten hauptsächlich die Spektren der Proteinspots aus dem Protein A-Ansatz (Spot 2.0, 2.1, 2.3) und von Spot 1.1 aus dem *AffiSep*-Ansatz eine ausreichend hohe Anzahl Massenpeaks. Diese sind nötig, um eine sichere Identifizierung mittels des Peptidmassen-„Fingerabdrucks“ im Rahmen der bei externen Kalibrierung gegebenen Massengenauigkeit von ca. +/- 300 ppm zu erreichen. Spot 1.4 und Spot 1.7 waren nicht auswertbar. Die Anzahl der Peaks in den Spektren der übrigen Peptidextrakte reichte für eine sichere Identifizierung mittels Peptidmassen-„Fingerabdrucks“ nicht aus. Durch Vergleich mit den analysierten Peptidmustern mit denen aus einem theoretischen, tryptischen Verdau von humanen Caseinen, zeigten sich Übereinstimmungen. Diese Übereinstimmungen wurden zur „manuellen“ Identifizierung der Spots verwendet (☞ **Tabelle 16**), zur Datenbanksuche in der NCBI-Proteindatenbank wurde das Programm MS-Fit (UCSF) verwendet. Aus den Spektren

wurden jeweils maximal 25 m/z-Werte der höchsten Intensitäten extrahiert. Bei erfolgloser Suche im Gesamtproteom der Swissprot-Datenbank wurde die Spezies auf „*homo sapiens*“ eingeschränkt. Für die Datenbanksuche wurde eine Massengenauigkeit von 300 ppm zugrunde gelegt. Weitere Bemerkungen zur Art und Qualität der Proteinidentifizierung durch die Peptidspektren der analysierten Proteinspots sind in **Tabelle 16** zusammengefasst.

**Tabelle 16** Bemerkungen zu Art und Qualität der Proteinidentifizierung der massenspektrometrisch analysierten Peptidextrakte ausgewählter Proteinspots

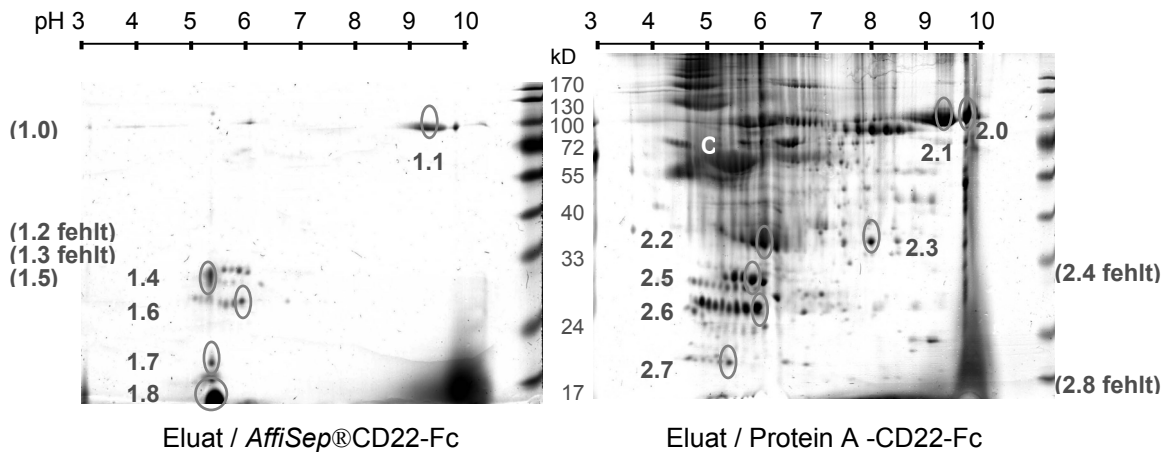
Spot	Art der Identifizierung (Bemerkungen)
2.0	MS-Fit (20 Peptidmassen zugeordnet, hoher Mowse-Score - durch MS-Fit identifiziert)
1.1 2.1	MS-Fit + Vergleich mit Peptidmuster von Spot 2.0 (20 Peptidmassen zugeordnet, durch MS-Fit identifiziert)
2.2	MS-Fit (nur 4 Peptidmassen zugeordnet)
2.3	MS-Fit nach Einschränkung auf humane Proteine + Vergleich / Übereinstimmung mit Peptidmuster von Spot 2.1 / 1.1 (4. Platz Mowse Score, aber bester in Chemical Score; Fragment von Laktoferrin ?)
2.5	„manueller“ Vergleich mit theoretischen Peptidfragmenten aus Trypsinverdau
2.6	MS-Fit + „manueller“ Vergleich mit theoretischen Peptidfragmenten aus Trypsinverdau von $\alpha_{S1}$ -Casein (human)
1.6	MS-Fit + Vergleich mit Peptidmuster aus Spot 2.6
2.7	Vergleich mit Peptidmuster aus Spot 2.6
1.8	MS-Fit nach Einschränkung auf bovine Proteine und Entfernung der Masse 832 aus dem Massen-Set (Kontamination ?)

Die Ergebnisse der Proteinidentifizierung durch die Nutzung von MS-Fit oder durch den „manuellen“ Vergleich mit den theoretischen Peptidmustern sind in **Tabelle 17** dargestellt.

**Tabelle 17** Darstellung der identifizierten, potentiellen CD22-Liganden aus humanen Caseinen.

Ausgewählte Proteine aus der Auftrennung des Eluats der Affinitätschromatographie von humanen Caseinen mit *AffiSep*@CD22-Fc (1) und Protein A-CD22-Fc (2) mittels 2D-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung wurden „in-Gel“ tryptisch verdaut und die Peptidextrakte massenspektrometrisch analysiert und mittels ihres Peptidmassen-„Fingerabdrucks“ identifiziert. Die Access-Nummer gibt den Eintrag des identifizierten Proteins in den gängigen Datenbanken wieder. Die aufgrund der Aminosäuresequenz kalkulierten Mw und pIs sind angegeben und den Spotziffern sowie der Position der Spots im 2D-Gel (in Klammern) gegenübergestellt.

Spotziffer <i>AffiSep</i>	Spotziffer <i>Prot. A</i>	Zuverlässigkeit Zuordnung	identifiziertes Protein (human)	MW (kDa) / pI Zuordnung (Gel)	Access-Nr. (Datenbank)
(1.0)	2.0	relativ sicher	Laktoferrin	78,0 / 8,6 (<100 / 9,1)	P 02788
1.1	2.1	relativ sicher	Laktoferrin	78,0 / 8,6 (<100 / 8,8)	P 02788
(1.2 fehlt)	2.2	unsicher	Clusterin precursor	52,5 / 5,9 (33-40 / 5,8)	P 10909
(1.3 fehlt)	2.3	mittel	Laktoferrin	78,0 / 8,6 (<36 / 7,4)	P 02788
1.4	(2.4 fehlt)	nicht auswertbar			
(1.5)	2.5	unsicher - mittel	$\beta$ -Casein	23,8 / 5,3 (30 / 5,7)	P 05814
1.6	2.6	mittel	$\alpha_{S1}$ -Casein	21,0 / 5,3 (27 / 5,6)	P 47710
	2.7	mittel	$\alpha_{S1}$ -Casein	21,0 / 5,3 (20 / 5,1)	P 47710
1.7		nicht auswertbar			
1.8	(2.8 fehlt)	mittel	$\alpha$ -Laktalbumin bovin	16,0 / 4,9 (16 / 5,0)	P 79100



**Abbildung 34** Eluate der präparativen Affinitätschromatographie von humanen Caseinen mit *AffiSep*®CD22-Fc und mit Protein A-gekoppeltem CD22-Fc nach zweidimensionaler Auftrennung.

Präparative Affinitätschromatographie von 75 mg humanen Caseinen (1.) mit zwei *AffiSep*®CD22-Fc 0,5mL-Säulen, jede wurde mit 1 mL 3 mM BPC-Neu5Ac eluiert. (2.) Der Durchlauf der Caseine wurde anschließend mit Protein A-Sepharose-gebundenem CD22-Fc (2,9 mg an 500 µL) eingesetzt. Eluiert wurde mit 500 µL 3 mM BPC-Neu5Ac. Bei beiden präparativen Ansätzen wurden die Eluate gepoolt und mittels 2D-PAGE in jeweils drei 12-%igen Polyacrylamidgelen aufgetrennt und mit PAGE-Blue Proteinfärbelösung gefärbt. Es wurde jeweils ein Gel ausgewählt und dargestellt.

Proteinsspots, die im Eluat mit *AffiSep*®CD22-Fc detektiert worden waren, erhielten die erste Ziffer „1.“

Proteinsspots, die im Eluat mit Protein A-gekoppeltem CD22-Fc detektiert worden waren, erhielten die erste Ziffer „2.“ Als „identisch bewertete Proteinsspots in beiden Ansätzen erhielten die gleiche zweite Ziffer (z.B. 1.2/2.2). „1.2 fehlt“ bedeutet, dass der Spots bei diesem Affinitätschromatographie-Ansatz nicht nachgewiesen werden konnte. „(1.0)“ bedeutet, dass der Spot nachgewiesen werden konnte, aber nicht für die Analyse eingesetzt wurde. Der interne Standard Laktalbumin (1.8) wurde nur dem *AffiSep*®CD22-Fc-Eluat hinzugefügt.

Die ausgewählten Spots der drei Gele wurden aus dem Gel entfernt und in einem 1,5mL-Reagiergefäß vereinigt. Die Aufbereitung, der „in-Gel“-Trypsinverdau und das Auftragen der Proben auf den MALDI-Träger wurde wie beschrieben durchgeführt (3.17). Die Proben wurden durch Marko Mank bei Milupa Research mittels MALDI-MS analysiert und die Proteinidentifizierung durch Datenbanksuche mit den erhaltenen MALDI-MS-Spektren aufgrund des spezifischen Peptidmassen-„Fingerabdrucks“ vorgenommen.

Wie bereits aufgrund des visuellen Vergleichs mit dem 2D-Gel von aufgetrenntem Laktoferrin angenommen, handelt es sich bei Spot 1.0/ 1.1/ 2.0/ 2.1 um humanes Laktoferrin. Laktoferrin konnte mit hoher Zuverlässigkeit identifiziert werden. Auch Spot 2.3 wurde als Laktoferrin identifiziert, dabei könnte es sich um Nebenprodukte von Laktoferrin handeln.

Aufgrund der geringen Anzahl von Peptidmassen in den Spektren der übrigen Präparationen ist auch die Zuverlässigkeit ihrer Identifizierung entsprechend geringer. Eine sichere Identifizierung des Clusterin *precursors* und des  $\beta$ -Caseins durch weitere Analysen ist daher notwendig. Clusterin ist ein Serumprotein, welches zum Komplementsystem gehört. Es ist u.a. Bestandteil der Milchfettkugelchenmembran in der Muttermilch. Die korrespondierenden Spots konnten nicht in der Affinitätschromatographie von humanen Caseinen mit *AffiSep*®CD22-Fc detektiert werden (1.2 fehlt).



## 5 DISKUSSION

Ziel dieser Arbeit war es, Interaktionen von Glykoproteinen/-peptiden aus der Milch mit CD22, einem akzessorischen Molekül des BZR und Sialinsäure-bindenden Lektin nachzuweisen. Dazu wurden Bindungs- und Inhibitionsstudien mit verschiedenen Milchproteinen und -peptiden durchgeführt (⇨4.5), ausgewählte Milchprotein-/peptid-Fractionen im B-Zell-Aktivierungstest eingesetzt (⇨4.6) und Milchproteine bezüglich ihres Molekulargewichts, isoelektrischen Punkts und Lektinbindung charakterisiert (⇨4.7). Mittels Affinitätschromatographie wurden Sialinsäure-abhängige CD22-Liganden aus der Milch isoliert (⇨4.8) und massenspektrometrisch analysiert und mittels ihres Peptidmassen-„Fingerabdrucks“ identifiziert (⇨4.9).

### 5.1 Die Analyse der Sialinsäure-abhängigen Bindung von CD22

Für die Analyse einer Sialinsäure-abhängigen Bindung der Siglecs wurde in der Vergangenheit ein Hapten-Inhibitionstest verwendet, dessen Grundlage die Bindung von CD22-Fc an sialylierte Zielzellen war. Für Untersuchungen mit oligo-/multivalenten Milchglykoproteinen war diese Methode jedoch ungeeignet, da bei diesem Verfahren eine verstärkte Agglutination der Zellen und damit eine erhöhte unspezifische Bindung zu beobachten war (Diplomarbeit Bock, 2000). In Versuchen mit *GlycoWell*-Platten zeigte sich, dass die Affinität des CD22-Fc zu der immobilisierten Neu5Ac zu gering war, um eine spezifische Bindung zu erzielen (⇨4.3.1). Es wurde mit IgM als sialyliertes Zielmolekül, das an Plastikflächen immobilisiert wurde, ein Bindungstest entwickelt (⇨4.3.2). Die Bindung von CD22 an IgM konnte bereits in verschiedenen Studien durch Copräzipitationsexperimente (Peaker et al., 1993; LePrince et al., 1993), ELISA-Bindungsversuche (Powell et al., 1995) und in Inhibitionsexperimenten (Hanasaki et al., 1995a) nachgewiesen werden. Außerdem ist CD22 *in vivo* mit dem mIgM des BZR-Komplexes assoziiert. IgM wird als möglicher *cis*-Ligand von CD22 diskutiert (Kelm et al., 2002).

IgM trägt mehr Sialinsäuren als alle anderen Immunglobuline. Die schwere Kette des IgMs besitzt fünf *N*-Glykosylierungsstellen, die „high-mannose“-Glykane und komplexe, biantennäre Glykane mit ausschließlich  $\alpha$ 2,6-verknüpften Sialinsäuren tragen (Hickman et al., 1972; Miller, 1971). Die monomeren IgM-Moleküle werden durch die ebenfalls glykosylierte „joining-chain“ zu einer pentameren Struktur verbunden (Baenziger, 1979). Die  $\alpha$ 2,6-Sialylierung des IgMs erklärte die nicht-nachweisbare Sialinsäure-abhängige Bindung des  $\alpha$ 2,3-spezifische Siglec-4 (MAG) an IgM.

Als weiteres sialyliertes Zielmolekül wurde Fetuin mit CD22-Fc im Mikrotiterplatten-Bindungstest eingesetzt. Fetuin enthält drei *N*- und drei *O*-Glykosylierungsstellen (Spiro et al., 1974; Edge et al., 1987; Nilsson et al., 1979). Die *N*-Glykane besitzen trisialylierte Strukturen mit  $\alpha$ 2,3- und  $\alpha$ 2,6-verknüpften Sialinsäuren, sowie die in *N*-Glykanen seltene Sequenz Neu5Ac $\alpha$ 2,3-Gal $\beta$ 1,3-(Neu5Ac $\alpha$ 2,6-)GlcNAc $\beta$ 1,4-Man $\alpha$ 1,3 (Bernard 1984).

Aufgrund dieser Sialylierung konnte sowohl die Bindung von CD22-Fc als auch von MAG-Fc an Fetuin nachgewiesen werden. Die Bindung von CD22-Fc an Fetuin war geringer als die an IgM (⇨ Abbildung 10, Abbildung 14). Die Bindung von MAG-Fc an Fetuin war eindeutig Sialinsäure-abhängig, da eine Bindung von MAG-Fc an Sialidase-behandeltes Fetuin nicht detektiert werden konnte (⇨ Abbildung 10). Die Bindung von CD22-Fc konnte dagegen durch Sialidase-Behandlung von IgM und Fetuin nicht vollständig reduziert werden. Anhand der fehlenden Bindung von CD22-Fc an durch saure Hydrolyse desialyliertes IgM / Fetuin sowie durch die vollständige Inhibition der Bindung in Anwesenheit des Sialinsäurederivats BPC-Neu5Ac konnte die Sialinsäure-abhängige Bindung an diese Glykoproteine nachgewiesen werden (⇨ 4.3.2, ⇨ Abbildung 10). Bei beiden Kontrollen konnte die Bindung von CD22-Fc auf das Niveau der Pufferkontrolle gesenkt werden. Eine Hitzebehandlung des IgMs führte zu einer reduzierten Anbindung von CD22-Fc. Eine Denaturierung der Proteine durch die Hydrolyse und eine unvollständige Immobilisierung an die Plastikoberfläche aufgrund veränderter Oberflächenladung konnte daher nicht ausgeschlossen werden. Die Pufferkontrolle wurde als allgemeine Kontrolle für die unspezifische Bindung eingesetzt.

Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die *Vibrio cholerae* Sialidase  $\alpha$ 2,6-verknüpfte Sialinsäuren nicht vollständig vom Glykoprotein abspaltet. Diese Ergebnisse konnten durch weitere Versuche bestätigt werden (Daten nicht gezeigt) und stimmen mit der in der Literatur beschriebenen, höheren Spezifität des Enzyms für  $\alpha$ 2,3-verknüpfte Sialinsäuren überein (Corfield et al., 1983).

Bindungstests von CD22-Fc mit IgM und Fetuin wiesen darauf hin, dass die Affinität des IgMs für CD22 sehr hoch ist. IgM inhibierte 100-fach besser als Fetuin und das Sialinsäurederivat BPC-Neu5Ac (⇨ Abbildung 11). BPC-Neu5Ac inhibiert seinerseits 200-fach besser als Me $\alpha$ Neu5Ac (Kelm et al., 2002). Sialinsäuren, die mit den Glykanen des Fetuins und vor allem des IgMs verknüpft sind, inhibieren damit besser als monomere Sialinsäuren. Dabei scheint nicht nur die Art der Bindung der Sialinsäure, sondern insbesondere auch die räumliche Anordnung der Glykane, das heißt deren Präsentation, eine besondere Rolle zu spielen.

Die hohe Affinität des IgMs für CD22 war bereits aus früheren Bindungs- und Inhibitionsexperimenten bekannt. Die in diesen Studien ermittelten Gleichgewichtskonstanten ( $K_d$ ) waren für  $\alpha$ 2,6-Sialyllaktose 15-30  $\mu$ M, für IgM < 3  $\mu$ M. Es wurde festgestellt, dass eine Proteinase K-Behandlung des IgMs, welche die pentamere Struktur zerstörte, zu einer Abnahme des Inhibitionspotentials bei der Sialinsäure-abhängigen CD22-Bindung führte. Der hohe Sialinsäuregehalt des IgMs ist möglicherweise nicht ausschließlich für die hohe Affinität zum CD22 verantwortlich. Vielmehr müssen die multiplen Sialinsäuren in einer spezifischen Orientierung oder Konformation präsentiert werden (Hanasaki et al., 1995a). Dieser Einfluss der strukturabhängigen Anordnung und Zusammensetzung der Glykane auf die Bindung wurde beispielsweise auch für die Interaktion von dem Hämagglutinin des Influenza A Virus

mit sialylierten Glykoproteinen beschrieben (Pritchett et al., 1989).

Für das Sialinsäurederivat BPC-Neu5Ac konnte gezeigt werden, dass es als kompetitiver Inhibitor die CD22-Bindung an ein sialyliertes Zielmolekül effektiv hemmt (Kelm et al., 2002; Diplomarbeit Bock, 2000). Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Bindungsversuche konnten außerdem zeigen, dass BPC-Neu5Ac auch bereits gebundenes CD22-Fc aus der Bindung an sialylierte Zielmoleküle verdrängen kann. Die Menge an dissoziierten CD22-Fc-Chimären war abhängig von der Inkubationsdauer mit BPC-Neu5Ac, dem sialylierten Zielprotein und der Inkubationsdauer der CD22-Fc/Anti-huIgG-AP-Komplexe mit dem sialylierten Zielprotein (⇨4.4.1). Es ist anzunehmen, dass durch Vernetzung der CD22-Fc/Anti-huIgG-Komplexe eine weitere Stabilisierung der Bindung von CD22-Fc an das sialylierte Zielmolekül erfolgt (⇨Abbildung 12). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die Inkubationsdauer der CD22-Fc/Anti-huIgG-AP-Komplexe von 16 h auf 4 h reduziert. Es konnte gezeigt werden, dass nach 2 h eine über 80-%ige und nach 4 h eine vollständige Anbindung erfolgt war (Daten nicht gezeigt). Bei den Experimenten mit dem *IAsys* wurde die Anbindung von IgM an CD22-Fc, welches an einen immobilisierten Antikörper gebunden war, gemessen. Durch die Zugabe von BPC-Neu5Ac wurde eine Verdrängung der IgM-Moleküle und nicht wie bei den Mikrotiterplattentests der CD22-Fc/Anti-huIgG-Komplexe bewirkt. Eine fast vollständige Dissoziation des IgMs vom CD22-Fc konnte durch die äquimolare Menge an BPC-Neu5Ac erzielt werden (⇨Abbildung 13). Diese Ergebnisse zeigten, dass BPC-Neu5Ac geeignet ist, die in der Affinitätschromatographie von Milchproteinen mit CD22-Fc aufgereinigten Liganden vom CD22-Fc zu verdrängen.

In dieser Arbeit wurden verschiedene Mutanten des CD22-Fc hergestellt. Dabei handelt es sich um Einzel-, Doppel- oder um eine Dreifach-(Triple) Mutante(n) mit den Änderungen des Arg120 zu Ala oder der Trp24 und Trp128 zu Gln (⇨4.2). Die Aminosäuren sind analog zu denen im Sialoadhäsın, für die eine Beteiligung an der Sialinsäure-Bindung gezeigt wurde. Frühere Mutagenesestudien mit murinem CD22 lieferten bereits Hinweise, dass diese Reste auch bei CD22 beteiligt sind (van der Merwe et al., 1996; May et al., 1998). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Faltung des Proteins durch die ausgetauschten Aminosäuren nicht beeinträchtigt war (van der Merwe et al., 1996). Für Sialoadhäsın konnte festgestellt werden, dass die Tryptophanreste im A- bzw. G-Strang (Trp2, Trp106) zum einen eine Bindung zu dem Kohlenstoff der Methylgruppe innerhalb des *N*-Acetylrestes und dem Kohlenstoffatom des C9 der Glycerolseitenkette herstellen. Humanes CD22 bindet im Gegensatz zu Sialoadhäsın sowohl an *N*-Acetyl- als auch an *N*-Glycolylneuraminsäure. Das für Sialoadhäsın kritische Trp2 könnte daher für die Bindung bei CD22 weniger bedeutend sein.

Die hergestellten CD22-Fc Einzelmutanten sollten im wesentlichen die Ergebnisse für Sialoadhäsın und murines CD22 bestätigen. Die Doppel- und Dreifachmutanten wurden

hergestellt, da nach Austausch einer einzelnen Aminosäure noch eine Restbindung möglich sein kann, die, wie am Beispiel von Siglec-4 (MAG) beschrieben wurde, noch relevant sein kann (Vinson et al., 2001).

Die Proteine wurden über Affinitätschromatographie gereinigt, mittels SDS-PAGE und Immunoblot mit Antikörpern gegen den Fc-Teil und gegen CD22 charakterisiert und funktionellen Bindungstests, wie Erythrozyten-Bindung, IgM-Bindung im Mikrotiterplatten-test und Bindungsstudien im *IAsys*, unterzogen. Bereits bei den Einfachmutanten war keine Sialinsäure-abhängige Bindung mehr messbar (⇨ Abbildung 14). Die Bindungsversuche deuteten zunächst darauf hin, dass die Einfachmutante W24Q noch eine messbare, gegenüber dem Wildtyp aber deutlich reduzierte, Sialinsäure-abhängige Bindung an Glykoproteine zeigte. Diese Ergebnisse konnten in weiteren Experimenten, bei denen die Mutanten oder IgM in hohen Konzentrationen eingesetzt wurden, um noch schwache Affinitäten messen zu können, nicht bestätigt werden. Eine geringe Bindung verschiedener CD22-Fc Mutanten an IgM wurde detektiert, wenn sehr hohen Konzentrationen der Fc-Chimären eingesetzt wurden. Diese konnte jedoch nicht durch Blockierung der Sialinsäure-Bindungsstelle mit BPC-Neu5Ac beeinflusst werden. Eine Sialinsäure-abhängige Restbindung konnte somit auch bei einem Überschuss an eingesetzten CD22-Fc Mutanten nicht festgestellt werden. Diese Ergebnisse wurden durch Bindungsstudien im *IAsys* bestätigt (⇨ Abbildung 15). Es wurde bei diesen Versuchen beobachtet, dass, verglichen zu den Mutanten, eine höhere Menge CD22-Fc Wt an den eingesetzten Ziege-anti-huIgG-Antikörper bindet. Diese zusätzliche Bindung ist offensichtlich Sialinsäure-abhängig. In Vorversuchen (Daten nicht gezeigt) konnte bereits festgestellt werden, dass Ziegenserum Proteine enthält, die an CD22 binden. Ferner wurden für Ziegen-IgGs *N*-Glykane mit *N*-Glycolylneuraminsäuren in  $\alpha$ 2,6-Verknüpfung (Raju et al., 2000) nachgewiesen, die eine Bindung an CD22 erklären würden. Die CD22-Fc Moleküle, die Sialinsäure-abhängig und nicht über den Fc-Teil an den Antikörper binden, erhöhen aber nicht die Bindungskapazität, da die Sialinsäure-Bindungsdomäne des CD22-Fc besetzt ist. Von Bedeutung kann die Sialinsäure-abhängige Bindung von CD22 aber bei der Komplexbildung mit Antikörpern sein. Bei Präzipitationen könnten Antikörper zu einer Inhibition der Sialinsäure-Bindungsdomäne führen und damit sensitive Bindungsstudien stören. Der Einsatz von desialylierten komplexierenden Antikörpern wäre daher ratsam.

Alle hergestellten CD22-Fc Mutanten zeigten keine Sialinsäure-abhängige Bindung und waren als Kontrolle für eine Sialinsäure-unspezifische Bindung von CD22-Fc geeignet.

## 5.2 Interaktionen von Milchglykoproteinen/-peptiden mit CD22

Sialinsäure-abhängige Interaktionen von Milchglykoproteinen/-peptiden wurden bereits als bedeutsam bei der Abwehr von Pathogenen im Säugling beschrieben (Schwertmann et al., 1999; Portelli et al., 1998; Hirno et al., 1998; Kohler et al., 2002). Die molekularen Mechanismen einer immunstimulierenden Wirkung, wie sie für eine Vielzahl von Milchproteinen/-peptiden beschrieben wurde, sind weitgehend unbekannt. Die



Untersuchungen zu Sialinsäure-abhängigen Interaktionen von Glykoproteinen/-peptiden aus der Milch mit CD22, als akzessorisches Molekül des BZR und Sialinsäure-bindendes Lektin, sollten dazu dienen, festzustellen, ob bestimmte Proteine oder Peptide aus der Milch eine modulierende Wirkung auf das Immunsystem durch Einfluss auf die B-Zell-Aktivierung haben und ob es dabei Unterschiede zwischen Milchproteinen verschiedener Spezies gibt (⇨4.5). Es ist wahrscheinlich, dass weitere Sialinsäure-abhängige Interaktionen von Milchglykoproteinen/-peptiden in anderen Systemen existieren, die immunmodulierende Auswirkungen haben (Rudloff et al., 2002). Neuere Untersuchungen zeigten eine Sialinsäure-abhängige, immunsteigernde Wirkung durch Interaktionen des Glykomakropeptids von  $\kappa$ -Casein mit Makrophagen (Li et al., 2004).

In IgM-Mikrotiterplatten-Bindungstests wurde die inhibitorische Wirkung verschiedener Proteine- und Peptide aus humaner, boviner und Kamel-Milch auf die Bindung von CD22-Fc an IgM bestimmt (⇨4.5.2, 4.5.3). Die humanen Caseine waren mit Abstand die potentesten Inhibitoren. Sie inhibierten 5-fach besser als Kamel-Caseine und 50-fach besser als bovine Caseine (⇨Tabelle 6).

Bei den Caseinen führte deren proteolytischer Verdau unabhängig von der Spezies zu einer Erniedrigung der Potenz, die Bindung von CD22-Fc an IgM zu inhibieren. Am deutlichsten war der Unterschied bei humanen und bovinen Caseinen, während bei den Kamel-Caseinen der Unterschied zwischen unverdauten und verdauten Caseinen sowie der GPC-1 der Peptide gering war.

Die GPC-1 verdauter humaner Caseine inhibierte die Bindung von CD22-Fc an IgM im Vergleich zu den anderen Peptidfraktionen am besten und dieses inhibitorische Potential konnte nach Subfraktionierung in der ersten und letzten RPC-Fraktion wiedergefunden werden. Damit konnten größere und/oder hydrophilere Peptide am ehesten die Sialinsäure-abhängige Bindung von CD22-Fc an IgM inhibieren.

Die Caseine bilden Submicellen, in denen die einzelnen Caseine nicht gleichmäßig verteilt sind und aus denen zusammen mit Calciumphosphat Micellen gebildet werden. Das  $\kappa$ -Casein ist vorrangig an der Micellenoberfläche lokalisiert (Donnelly et al., 1984; Schlimme et al., 1995). Während humane Caseine vornehmlich relativ kleine (50 nm) Caseinmicellen bilden, kommen bei bovinen und Kamel-Caseinen größere Caseinmicellen vor (>100 nm), wobei Kamel-Caseinmicellen bis zu 500 nm groß sein können (Farah, 1993). Die kleinen Caseinmicellen der Humanmilch enthalten aufgrund ihrer größeren spezifischen Oberfläche relativ mehr  $\kappa$ -Casein als die Caseinmicellen der Kuh- und Kamelmilch (Donnelly et al., 1984; Schlimme et al., 1995). Das  $\kappa$ -Casein aller drei Spezies enthält 5-10 *O*-Glykosylierungsstellen und die *O*-Glykane sind  $\alpha$ 2,6-sialyliert (Fiat et al., 1980; Kappeler et al., 1998; Saito et al., 1992). Das  $\kappa$ -Casein wäre daher ein potentieller CD22-Ligand aus Milch. Bei den Caseinen wäre es denkbar, dass die Präsentation und Verfügbarkeit der Sialinsäuren am besten bei den unverdauten, noch strukturell unversehrten Caseinen ist. Wie

bereits beschrieben führte beim IgM eine Zerstörung seiner pentameren Struktur zu einem Verlust der Affinität zu CD22 (Hanasaki et al., 1995a). Beim Vergleich zwischen humanen und bovinen Caseinen wäre die größere spezifische Oberfläche und der höhere Anteil an stärker sialyliertem  $\kappa$ -Casein eine Erklärung für den deutlichen Unterschied im Inhibitionspotential. Kamel-Caseine inhibieren schlechter als humane Caseine, aber besser als bovine Caseine und sie zeigen keine dramatischen Unterschiede vor und nach der Proteolyse. Die Struktur der Micellen beeinflusst möglicherweise die inhibitorische Potenz. Beispielsweise wäre es möglich, dass die Micellen der Kamel-Caseine während der Präparation bereits zerstört wurden. Das würde die geringen Unterschiede vor/nach Proteolyse erklären. Außerdem überwiegt in Kamelmilch wie in humaner Milch das  $\beta$ -Casein, während in Kuhmilch insgesamt die  $\alpha$ -Caseine überwiegen. Es ist nicht auszuschließen, dass neben dem hochglykosyliertem  $\kappa$ -Casein weitere Caseine die Fähigkeit, die Bindung von CD22-Fc an IgM zu inhibieren, beeinflussen.  $\beta$ -Casein ist das am stärksten hydrophobe Casein (Schlimme et al., 1995) und es ist möglich, dass seine Hydrolyse-Produkte in der RPC-6 auftreten.

Die Ergebnisse der Inhibitionsdaten mit den verdaut-fraktionierten humanen Caseinen weisen auch auf das Glykomakropeptid (GMP) des  $\kappa$ -Caseins als möglichen Bindungspartner von CD22-Fc hin. In chromatographischen Untersuchungen wurde für bovines GMP (Mw ~7000 Da) eine apparente molekulare Masse von 30-45 kDa nachgewiesen (Minikiewicz et al., 1996). Die veränderte Molekülgröße ist mit einem vergrößerten Volumen aufgrund elektrostatischer und sterischer Abstoßungseffekte der sialylierten und phosphorylierten Moleküle zu erklären. Es konnten bisher 14 glykosylierte Formen des bovines GMP identifiziert werden (Molle et al., 1995). Bei einer Ausschlussgrenze von 3000 Da in der GPC wird ein derart großes Molekül wahrscheinlich in der GPC-1 (Ausschlussfraktion) nachweisbar sein. Aufgrund der Hydrophilie des Glykomakropeptids wird es bei der RPC wahrscheinlich im Durchlauf (RPC-3) auftreten (Minikiewicz et al., 1996).

Bei humanen Molkenproteinen konnte eine Steigerung des Potentials, die Bindung von CD22-Fc an IgM zu inhibieren, bei verdauten und verdaut-fraktionierten Molkenproteinen beobachtet werden (☞Tabelle 7). Die Hauptproteine der Molkenproteinfraktion sind globuläre und gegenüber den Caseinen kompakt strukturierte Proteine, was zu einer gewissen Resistenz gegenüber Proteasen führt. Sie sind eine stark heterogene Gruppe, die auch mehrere Serumproteine enthalten. Für IgM konnte gezeigt werden, dass die Zerstörung der pentameren Struktur eine Anbindung an CD22 stört (Hanasaki et al., 1995a). Außerdem schützt die sekretorische Komponente das sIgA vor der Proteolyse im Magen-Darm-Trakt (Speer et al., 1993) und für einige Immunglobuline wird eine partielle Resistenz gegen Trypsin oder Chymotrypsin beschrieben (Brock et al., 1978). Aber die globuläre, häufig durch Disulfidbrücken stabilisierte Struktur könnte zur Folge haben, dass sialylierte Glykane nicht zugänglich sind. Für Peptide von Laktoferrin und der sekretorischen Komponente des IgA wurden probiotische und antibakterielle Effekte beschrieben (Liepke et al., 2002; Tomita et

al., 1991). Die Moleküle der Fraktionen GPC-1 und deren Subfraktionen RPC-3 und RPC-6 zeigten die stärkste inhibitorische Potenz auf die CD22-Bindung. Es handelt sich also vornehmlich um große und hydrophile Peptide. Beispielsweise wurde in der Fraktion GPC-1 mittels SDS-PAGE ein Protein von etwa 70 kDa nachgewiesen, das die sekretorische Komponente des IgA oder die schwere Kette von Immunglobulinen sein könnte (⇨Abbildung 25).

Vergleichbar zu den oben beschriebenen Befunden mit humanen Molkenproteinen konnte auch bei bovinen Molkenproteinen festgestellt werden, dass die höhermolekularen Moleküle der Fraktion GPC-1 die Bindung von CD22 deutlich besser als die unverdauten Proteine hemmen. Offensichtlich werden die inhibitorisch aktiven Peptide aus Molkenproteinen in der höhermolekularen Fraktion angereichert. Es handelt sich daher möglicherweise um Proteine, die eher resistent gegen proteolytischen Abbau sind.

Die eingesetzten Präparationen hydrolysierter Pflanzenproteine zeigten keine Bindung an CD22. Dieser Befund zeigt nochmals, dass es sich nicht um einen generellen Effekt von Peptiden handelt (⇨Tabelle 8).

### 5.3 Sialylierte Milchglykoproteine und Liganden für CD22

Caseine und Molkenproteine verschiedener Spezies wurden durch elektrophoretische Methoden aufgetrennt, mit Coomassie- oder Silberlösung angefärbt und  $\alpha$ 2,6-sialylierte Glykoproteine mit SNA sowie nicht-sialylierte *O*-Glykane mit der Sequenz Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\beta$ 1-3Ser/Thr mit PNA nachgewiesen. Soweit möglich, wurden die nach elektrophoretischer Auftrennung nachgewiesenen Proteine der eingesetzten Milchproteinfraktionen anhand der in Literatur beschriebenen elektrophoretischen Charakteristika zugeordnet. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 18** dargestellt.

Verschiedene Ursachen können dazu führen, dass die mittels SDS-PAGE und 2D-PAGE nachgewiesenen Proteinmuster nicht immer identisch sind. Insbesondere muss erwähnt werden, dass sich bei der 2D-PAGE glykosylierte oder phosphorylierte Proteinen in multiple Proteinspots aufgrund unterschiedlicher isoelektrischer Punkte auftrennen und dadurch möglicherweise die Detektionsgrenze unterschritten wird. Weiterhin können Unterschiede durch die Färbemethoden entstehen. Coomassie-Brilliantblau bindet unspezifisch an kationische und unpolare hydrophobe Seitenketten der verschiedenen Aminosäuren der Proteine, während bei der Silberfärbung vorwiegend Komplexe mit Glutamat-, Aspartat- und Cystein-Resten gebildet werden. Bei wiederholten Analysen einer Proteinfraktion wurden mitunter unterschiedliche Proteinmuster gefunden (⇨4.7.2). Dies kann dadurch erklärt werden, dass unterschiedliche Chargen der Proteinfraktion, die zudem je nach Herkunft z.T. anders vorbehandelt wurden, eingesetzt wurden (Milupa Research, persönliche Mitteilung). Durch Erhitzen der Milch wie z.B. bei der Pasteurisierung können sich thermolabile Molkenproteine an die Caseinmicellen anlagern, so dass es zu einer partiellen Copräzipitation

kommen kann (Schlimme et al., 1995). Besonders deutlich wird das bei dem zu der Molkenproteinfraktion gerechnetem Laktoferrin, welches auch in den humanen Casein-Präparationen nachgewiesen werden konnte (↷4.8.2). Weiterhin können wegen einer unvollständiger Trennung auch Caseine in der Molkenproteinfraktion auftreten (↷Abbildung 32).

Spezies-spezifische Unterschiede zwischen den Caseinen werden nach der Auftrennung mittels 2D-PAGE besonders deutlich (↷4.7.2, 4.8.1) (Anderson et al., 1982; Marvin et al., 2002). Durch Vergleich mit der Literatur konnten die verschiedenen, in dieser Arbeit verwendeten Caseine ihren Subklassen zugeordnet werden (↷Tabelle 18).

Auffällig sind die Ähnlichkeiten zwischen dem Proteinmuster von bovinen und Kamel-Caseinen (↷Abbildung 28, Abbildung 29), welche möglicherweise auf die großen Übereinstimmungen der Aminosäuresequenzen zurückgeführt werden können (Kappeler et al., 1998). Die Verteilung der Subklassen bei den humanen Caseinen weicht dagegen deutlich ab.  $\alpha_{S1}$ -Casein erscheint als Reihe von Spots unterhalb des  $\beta$ -Caseins. Bei bovinen und Kamel-Caseinen erscheint das  $\alpha_{S1}$ -Casein als prominenter Spot (mit niedrigerem pI) abgegrenzt von  $\beta$ -Casein und das  $\alpha_{S2}$ -Casein als Reihe von Spots oberhalb von  $\beta$ -Casein (Marvin et al., 2002). Diese Ergebnisse wurden nach tryptischen Verdau ausgewählter Spots, aus dem Eluat der Affinitätschromatographie von humanen Caseinen mit CD22, massenspektrometrisch verifiziert.

Bovines  $\kappa$ -Casein wird in der Literatur als Spotreihe unterhalb von  $\beta$ -Casein mit höheren pIs beschrieben (Marvin et al., 2002). Interessanterweise wurde für das bovine Glykomakropeptid mittels chromatographischer Methoden, wie bereits beschrieben, eine apparente molekulare Masse von 30-45 kDa (Minikiewicz et al., 1996) und eine Vielzahl glykosylierter Formen nachgewiesen (Molle et al., 1995). In der Literatur wird für humanes  $\kappa$ -Casein, nach Auftrennung mittels SDS-PAGE, ebenfalls eine diffuse Bande mit einem apparenten Molekulargewicht von 35-55 kDa beschrieben (Stromqvist et al., 1995). Nach Auftrennung von humanen Caseinen mittels 2D-PAGE konnten eine Vielzahl vertikaler (mit heterogenen Molekularmassen) Spots mit isoelektrischen Punkten von 4-10 mittels Coomassie-Färbung und PNA-Detektion nachgewiesen werden (↷Abbildung 27). Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um  $\kappa$ -Casein (Kunz et al., 1990b; Stromqvist et al., 1995; Minikiewicz et al., 1996). Humanes  $\kappa$ -Casein ist höher glykosyliert als bovinen  $\kappa$ -Casein und die O-Glykane enthalten zusätzlich zu Gal/GalNAc auch GlcNAc und Fukose (Fiat et al., 1980; van Halbeek et al., 1985; Yamauchi et al., 1981). Die potentiellen  $\kappa$ -Caseinspots konnten mit SNA jedoch nicht nachgewiesen werden. Es ist möglich, dass in  $\kappa$ -Casein die Verknüpfung der Sialinsäure an GlcNAc oder die Modifikationen der Glykane durch Fukosylierung eine Erkennung durch SNA verhindern (Shibuya et al., 1987). In den Oligosacchariden humaner Milch konnte Disialyllakto-N-hexaose II identifiziert werden, die die Sequenz Sia $\alpha$ 2,6-GlcNAc enthält (Kitagawa et al., 1991). PNA bindet an die potentiell zugeordneten  $\kappa$ -Casein-Spots sowohl in

desialylierten als auch in nativen humanen Caseinen (⇨ Abbildung 27). Bei letzteren werden von PNA auch Proteinspots mit niedrigerem pI erkannt. Diese PNA-Bindung weist indirekt auf eine Sialylierung des  $\kappa$ -Caseins hin. Die Desialylierung eines Proteins führte zu einer Verschiebung des pIs ins basische, daher können in aufgetrennten desialylierten humanen Caseinen nur  $\kappa$ -Casein-Spots ab pH 6 detektiert werden.

**Tabelle 18** Tabellarische Darstellung der nachgewiesenen Proteine aus elektrophoretisch aufgetrennten humanen Caseinen und Molkenproteinen und ihre Übereinstimmungen mit den in der Literatur beschriebenen Milchproteinen.

Zusammenfassung der nachgewiesenen Proteine aus humanen Molkenproteinen und Caseinen. Angegeben sind die apparenten Molekulargewichte und isoelektrischen Punkte der mittels SDS-/2D-PAGE aufgetrennten und mit Coomassie angefärbten Proteine (⇨4.7). In der Literatur beschriebene Proteine aus Caseinen /Molkenproteinen wurden erfasst und zitiert. Fett gedruckt sind die identifizierten Proteine aus der CD22-Affinitätschromatographie mit humanen Caseinen (⇨4.9).

Nr.	Mw (kDa)	pI	beschriebene Proteine (Literatur)	Referenz (Literatur)
1	>>180		Mucine	(Patton, 1994; Schroten et al., 1992)
2	120-180	4,5-6	FSK (IgA) Fab IgA Poly-Ig-Rezeptor	(Schwertmann et al., 1999; Schroten et al., 1998; Charlwood et al., 2002)
3	~100 70-100 70-100	5-6 7-8,5 8,5-9,5	Poly-IgG-Rezeptor, FSK <b>Laktoferrin</b>	(Kunz et al., 1990a; Nascimento de Araujo et al., 2001; Charlwood et al., 2002)
4	> 55	5-7,5	schwere Kette (IgA/G)	(Kunz et al., 1990a; Anderson et al., 1977)
5	„35-50“ 33(-40) 33-40 > 40	4-8 5-6 6,5-8 8-9	$\kappa$ -Casein / GMP <b>Clusterin precursor</b> <b>Laktoferrin-Produkte</b> Laktadherin	(Azuma et al., 1984; Stromqvist et al., 1995; Wilson et al., 2002; Charlwood et al., 2002; Minikiewicz et al., 1996)
6	<32 ~ 27-32 ~ 27 >25 <u>Vergleich:</u> <32 ~ 27-32 ~30 >25	5,5-6 5-6,5 4,5-6 4,7-6 4-5 (bovin) 4,8-5,3 (Kamel) 4,8-5,5 (bovin) 5-6 (Kamel) 3-5 (Kamel) 5,5-6,5 bovin /Kamel	? ( $\beta$ -Casein) <b><math>\beta</math>-Casein</b> ? ( $\beta$ -Casein) <b><math>\alpha_{S1}</math>-Casein</b> $\alpha_{S1}$ -Casein $\alpha_{S1}$ -Casein $\alpha_{S2}$ -Casein $\alpha_{S2}$ -Casein ? ? $\beta$ -Casein	(Anderson et al., 1982; Farah et al., 1985; Kunz et al., 1990a; Yamauchi et al., 1981; Marvin et al., 2002)
7	25-30	> 6-9	leichte Kette (IgA/G)	s. schwere Kette
8	< 25	4-6	Nebenprodukte: $\beta$ -Casein / $\alpha_{S1}$ -Casein	(Yamauchi et al., 1981)
9	< 20	< 5,5	$\alpha$ -Laktalbumin	(Kunz et al., 1990a)

In Coomassie-gefärbten Gelen der mittels 2D-PAGE aufgetrennten humanen Caseine ist  $\kappa$ -Casein manchmal nur schwach oder nicht nachzuweisen. Möglicherweise wird das  $\kappa$ -Casein durch Coomassie nur schwach angefärbt (⇨ Abbildung 29). Im Eluat der Affinitätschromatographie von humanen Caseinen mit CD22-Fc konnte  $\kappa$ -Casein nur schwach nachgewiesen werden. Weiterhin wurde das charakteristische Spotmuster von  $\kappa$ -Casein auch in humanen Molkenproteinen und daraus mittels Affinitätschromatographie angereicherten CD22-Bindungspartnern gefunden (⇨ Abbildung 32). Möglicherweise verbleibt ein Teil der Caseine bei der Fällung in Lösung und erscheint dadurch in der Molkenproteinfraktion. Ein tryptischer Verdau sowie die massenspektrometrische Analyse der  $\kappa$ -Caseine wurde nicht durchgeführt, da die Intensität der Spots zu gering war.

Im aufgetrennten Eluat der Affinitätschromatographie von humanen Caseinen mit CD22-Fc konnten  $\beta$ -Casein und  $\alpha_{S1}$ -Casein identifiziert werden (⇨ 4.9). Beide Proteine sind nicht glykosyliert. Durch die Affinitätschromatographie mit CD22-Fc als spezifisches Lektin für  $\alpha_{2,6}$ -sialylierte Glykane und der Elution mit dem CD22-spezifischen Inhibitor BPC-Neu5Ac sollten ausschließlich spezifisch  $\alpha_{2,6}$ -sialylierte Bindungspartner im Eluat nachweisbar sein. Im Gegensatz zu SNA wurde für CD22 nicht ausgeschlossen, dass es an Sia $\alpha_{2,6}$ -GlcNAc bindet (Powell et al., 1995).

Es ist anzunehmen, dass die eingesetzten Caseine zumindest zu einem wesentlichen Teil micellar vorlagen. Der potentielle Ligand für CD22 in Caseinen ist aufgrund seiner starken Sialylierung das  $\kappa$ -Casein, welches exponiert an der Micellenoberfläche vorliegt. Über die Bindung des  $\kappa$ -Caseins würden Caseinmicellen angereichert, so dass alle Bestandteile der humanen Caseinmicellen im BPC-Neu5Ac-Eluat vorliegen.

In beiden Hauptproteinfraktionen der Milch können Proteine der MilCHFettkugelchenmembran auftreten. Dabei handelt es sich um eine heterogene Gruppe von Proteinen u.a. mit einer Vielzahl an Enzymen und den Mucinen (Patton et al., 1989). Neuere Untersuchungen beschreiben sieben Hauptproteine der MilCHFettkugelchenmembran:  $\alpha$ -Laktalbumin, Lysozym *Precursor*,  $\beta$ -Casein, Clusterin (Apolipoprotein J), Laktoferrin, den Poly-Ig-Rezeptor *Precursor*, der die freie sekretorische Komponente (FSK) enthält, und das Laktadherin (EGF-8-Protein, MFG-E8) (Charlwood et al., 2002). Den Glykoproteinen der MilCHFettkugelchenmembran werden antivirale und antibakterielle Eigenschaften zugeschrieben (Peterson et al., 1998). Clusterin, Laktoferrin, der Poly-Ig-Rezeptor *Precursor* und Laktadherin sind N-glykosyliert und sialyliert (Charlwood et al., 2000).

Clusterin *precursor* und Laktoferrin konnten als CD22-Liganden identifiziert werden und sind durch SNA nachweisbar (⇨ 4.9 und Abbildung 27) (⇨ **Tabelle 18**). Clusterin besteht aus einer  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette, die durch eine Disulfidbrücke verbunden sind. Beide Ketten haben ähnliche molare Massen und isoelektrische Punkte und können als überlagertes Spotmuster nach Auftrennung mittels 2D-PAGE nachgewiesen werden (Wilson et al., 2002). In dem tryptisch verdauten Protein, des für die massenspektrometrische Analyse ausgewählten Proteinspots,

konnten Massen aus beiden Ketten des Clusterins nachgewiesen werden (wie bei Charlwood et al., 2002 ).

Im Eluat der Affinitätschromatographie von humanen Caseinen mit dem *AffiSep*®CD22-Fc konnte Clusterin nicht sicher detektiert werden. Dagegen wurde Clusterin als potentieller Bindungspartner von CD22-Fc, welches an Protein A-Sepharose gebunden war, identifiziert und von CD22-Fc, welches kovalent an NHS-Sepharose gekoppelt war, nachgewiesen. Durch die CD22-spezifische Elution mit BPC-Neu5Ac sollten nur CD22-spezifische Proteine aufgereinigt werden. Möglicherweise führt die kovalente Kopplung an die *AffiSep*-Matrix zu einer sterischen Beeinträchtigung der Bindungsdomäne von CD22-Fc.

Auch ein sialyliertes Protein mit einem apparenten Mw im Bereich um 40 kDa mit pIs zwischen 8-9 konnte mittels SNA identifiziert werden und ist ebenfalls in geringen Quantitäten im Eluat aus der Affinitätschromatographie von humanen Caseinen mit CD22-Fc nachweisbar (⇨ Abbildung 27, Abbildung 33). Dieses Protein könnte mit Laktadherin (Datenbanknummer Q08431) übereinstimmen. Auch Proteine im Molekulargewichtsbereich des Poly-Ig-Rezeptor *Precursors* oder der freien sekretorischen Komponente (Datenbanknummer P01833) wurden durch SNA nach Auftrennung humaner Caseine erkannt. Das Vorkommen von Laktoferrin und dem Poly-Ig-Rezeptor *Precursor* wird für alle drei Spezies beschrieben. Für Clusterin und Laktadherin konnten Sequenzen für bovine Homologe in den Datenbanken gefunden werden.

Der Vergleich von Coomassie-gefärbten, aufgetrennten humanen Caseinen und Molkenproteinen und dem Eluat der Affinitätschromatographie von humanen Molkenproteinen mit CD22-Fc weist aufgrund der apparenten Molekulargewichte und isoelektrischen Punkte auf  $\kappa$ -Casein, Laktoferrin, sIgA (freie sekretorische Komponente, leichte und schwere Kette) und  $\alpha$ -Laktalbumin als potentielle CD22-Liganden hin.

Da alle diese Moleküle glykosyliert und sialyliert sind, ist zu vermuten, dass sie in der Tat durch die Sialinsäure-abhängige Interaktion an CD22 binden.

Liganden, die mittels Affinitätschromatographie aus bovinen und Kamel-Caseinen isoliert wurden, wurden zu einem wesentlichen Teil auch mit SNA nach 2D-Elektrophoresen der bovinen und Kamel-Caseine detektiert. Eine weiterführende massenspektrometrische Analyse der Liganden konnte bisher nicht durchgeführt werden, da nicht genügend Material verfügbar war. Mittels präparativer Affinitätschromatographie müsste zunächst die Menge isolierter Liganden erhöht werden, da diese nur schwach detektierbar waren. Dadurch sollten weitere Liganden aus der Affinitätschromatographie von Caseinen und Molkenproteinen aller drei untersuchten Spezies mit CD22-Fc über ihren Peptidmassen-„Fingerabdruck“ analysierbar sein.

Neben der verwendeten massenspektrometrischen Analyse der Proteine über ihren Peptidmassen-„Fingerabdruck“ wäre auch der Einsatz anderer massenspektrometrischer

Techniken denkbar, um Modifikationen der aufgereinigten Milchglykoproteine und -peptide, insbesondere bei den Glykanstrukturen, zu identifizieren.

Eine weitere Möglichkeit zur Charakterisierung der Milchproteine wäre der Einsatz von Antikörpern, um sicher einzelne Spots bestimmten Proteinen zuordnen zu können.

#### **5.4 Einfluss von Milchglykoproteinen/-peptiden auf die B-Zell-Aktivierung**

Ungleichgewichte in der Immunantwort sind denkbare Ursachen für Autoimmunerkrankungen oder Allergien. Der Säugling verfügt in den ersten Lebenswochen über ein unentwickeltes Immunsystem, welches durch die Inhaltsstoffe der Muttermilch ausbalanciert und zur weiteren Reifung stimuliert wird. Diese Balance wird möglicherweise durch die andersartigen Eigenschaften der Inhaltsstoffe der Muttermilchersatznahrung gestört.

In Gegenwart eines Inhibitors der Sialinsäure-Bindung von CD22, dem BPC-Neu5Ac, lassen sich B-Zellen leichter aktivieren, wie durch eine erhöhte  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung gezeigt werden konnte (Kelm et al., 2002).

In dieser Arbeit wurde festgestellt, dass alle eingesetzten Caseine und Molkenproteine und ihre Peptide sowie Pflanzenproteinhydrolysate eher eine Dämpfung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung bewirkten und nicht eine erhöhte  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung wie durch das BPC-Neu5Ac ( $\varnothing$  4.6).

Es wird deutlich, dass das Modell, das für die Wirkung des Monosaccharids BPC-Neu5Ac postuliert wurde, nicht ohne weiteres für die getesteten Milchglykoproteine oder -peptide übernommen werden kann. Eine mögliche Erklärung liegt in den oligo- bis multivalenten Bindungen, die mit Peptiden und Proteinen möglich sind. Für die inhibitorische Funktion von CD22 scheint dessen Lokalisierung in der Nähe des BZR entscheidend zu sein. Weiterhin wird für die BZR-abhängigen Signalkaskaden postuliert, dass das initiale Signal durch in „lipid rafts“ entstehende Signalkomplexe ermöglicht wird (Pierce, 2002). Es ist nicht auszuschließen, dass die getesteten Milchglykoproteine/-peptide zu einer verstärkten Colokalisation von CD22 und dem BZR führen anstatt diese Interaktion zu inhibieren. In verschiedenen Modellen wurde bereits eine Vervielfältigung eines Signals durch eine Organisation zu oligomeren Strukturen beschrieben (Reth, 2001). Durch dieses „Clustering“ wird möglicherweise auch der Effekt von CD22 verstärkt und die  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung weiter gedämpft. Die Dämpfung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung scheint jedoch unabhängig von der Lektindomäne von CD22 zu sein, da die desialylierten Caseinhydrolysate sowie Pflanzenproteinhydrolysate die stärkste Dämpfung bewirkten ( $\varnothing$  Abbildung 23). Sialinsäuren tragen entscheidend zu der Oberflächenladung eines Moleküls bei und wirken sich aufgrund der sie umgebenden Hydrathüllen auf die Größe eines Moleküls aus. Nicht sialylierte Peptide werden möglicherweise weniger von der B-Zell-Oberfläche abgestoßen und können aufgrund ihrer Größe über ein extrazelluläres „Clustering“ zu einer intrazellulären Colokalisation führen. Sialylierte Moleküle können diese Aufgabe nur begrenzt übernehmen. Der Grad und die Art der Sialylierung spielt möglicherweise „indirekt“ eine wichtige Rolle.



Die Dämpfung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung durch die Caseinhydrolysate konnte durch Coinkubation mit BPC-Neu5Ac reduziert werden (⇨ Abbildung 24). Eine erhöhte  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung, wie durch BPC-Neu5Ac allein, konnte nicht erreicht werden. Diese Experimente zeigen zum einen, dass es sehr unwahrscheinlich ist, dass die Effekte der Milchhydrolysate einfach auf eine generelle Störung der Aktivierbarkeit der Zellen, z.B. durch blockierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle oder Antikörperbindungsstellen zurückzuführen ist. Zum anderen kann davon ausgegangen werden, dass es sich um einen Sialinsäure-unabhängigen Effekt handelt, möglicherweise auch um einen CD22-unabhängigen Effekt, da die Intensität der Dämpfung eher umgekehrt proportional zu dem Sialinsäuregehalt und der inhibitorischen Potenz gegenüber der Bindung von CD22 an IgM war. Postuliert werden könnte z.B. eine Interaktion der Caseinhydrolysate mit CD22, die unabhängig von der Lektindomäne ist. Aber auch Interaktionen mit einem anderen akzessorischen Molekül des BZR oder colokalisiertem Rezeptormolekül, welches einen dämpfenden Einfluss auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung hat, wäre denkbar. Auch eine Kombination beider Interaktionen ist nicht auszuschließen.

Alle eingesetzten Caseine und Molkenproteine, ihre Peptide sowie die Pflanzenproteinhydrolysate zeigten eher eine konzentrationsabhängige Dämpfung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung (⇨ 4.6.2). Die bovine Caseinhydrolysate zeigten bei niedrigeren Konzentrationen bereits die stärkste Dämpfung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung, während es bei humanen und Kamel-Caseinhydrolysaten höherer Konzentrationen bedarf, um dasselbe Niveau zu erreichen. Humane Milch enthält etwa 11 mg Protein/mL mit einem Anteil von etwa 40 % Caseinen. Die im B-Zell-Aktivierungstest eingesetzten Konzentrationen werden somit durch Muttermilchgabe nicht erreicht. Möglicherweise spielen daher die Effekte bei den niedrigeren Konzentrationen eine wesentlich kritischere Rolle. Die GPC-1-Subfraktion RPC-6 sowie die unfraktionierten, verdauten humanen Molkenproteine und Caseine bewirkten bei niedrigeren Konzentrationen bereits eine Dämpfung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung. Auch bei den RPC-Fractionen der GPC-2 verdauter Kamel-Caseine bewirkten die Peptide der RPC-3 eine starke Dämpfung, deren Intensität durch die weiteren Fraktionen abnahm.

Bei den GPC- und RPC-Fractionen von verdauten Molkenproteinen wurde beobachtet, dass neben der Dämpfung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung bei hohen Konzentrationen ein gegenläufiger Effekt, nämlich eine Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung bei niedrigen Konzentrationen eintritt (⇨ Abbildung 18). Dieses Phänomen, das bei GPC-1 und deren Subfraktion RPC-6 festgestellt werden konnte, scheint ebenfalls unabhängig von der Lektindomäne von CD22 zu sein, da die Auswirkungen der eingesetzten Fraktionen im B-Zell-Aktivierungstest nicht unbedingt mit den Ergebnissen der Bindungsstudien mit CD22 und dem Sialinsäuregehalt der Fraktionen korrelieren.

Die Effekte auf die B-Zell-Aktivierung sind möglicherweise auf die Größe und Hydrophobizität der Peptide zurückzuführen, da sowohl in der GPC-1 als auch in der RPC-6 große Moleküle und in letzterer vor allem stark hydrophobe, proteolytische Produkte

angereichert werden. Peptide/Proteine in den Milchproteinhydrolysaten könnten aber auch durch Fraktionierung verloren gehen oder angereichert werden, so dass sie verstärkt eine Dämpfung oder eben Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung bewirken. Auch synergistische Effekte wären möglich, da unfraktionierte, verdaute Milchproteine im allgemeinen die stärkste Dämpfung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung bewirkten. Diese Dämpfung war ausgeprägter als bei verdauten humanen Caseinen.

Auffällig ist, dass unverdaute Molkenproteine fast keinen Effekt auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung hatten, während die durch Proteolyse daraus gewonnenen Peptide eine ausgeprägte Dämpfung bewirkten (⇨ Abbildung 17). Diese gravierenden Unterschiede zeigen, welche Bedeutung die Hydrolyse von Milchproteinen auf deren modulierenden Effekt auf das Immunsystem haben kann. Auch im Säugling werden die Molkenproteine der Muttermilch partiell verdaut, allerdings wurde bereits auf die verringerte Aktivität der Verdauungsenzyme des Neugeborenen sowie das Vorkommen von Proteaseinhibitoren in der Muttermilch hingewiesen (⇨ 1.5.3). Es kann davon ausgegangen werden, dass in der Regel die Muttermilchproteine, beziehungsweise deren Verdauungsprodukte, für ein ausbalanciertes Immunsystem des Neugeborenen sorgen. Daher stellen unverdaute oder nur partiell verdaute Molkenproteine möglicherweise den „Idealfall“ dar. Für industriell hergestellte Säuglingsersatznahrungen stehen in der Regel jedoch nur bovine Produkte zur Verfügung. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die biologischen Wirkungen verdauter und unverdauter Molkenproteine wahrscheinlich sehr unterschiedlich zu bewerten sind und legen nahe, die beteiligten Mechanismen eingehender zu untersuchen.

## 5.5 Ausblick

Die Ergebnisse der Bindungsstudien von CD22 mit den Milchglykoproteinen/-peptiden sowie ihr Einsatz in den B-Zell-Aktivierungsexperimenten zeigen deutlich, dass verdaute und fraktionierte Milchproteine einer weitergehenden Charakterisierung bedürfen. Eine Identifizierung der Peptide/Proteine in den GPC- und RPC-Fractionen, ihrer tatsächlich gebundenen Sialinsäuren, der Art und Verknüpfung der Glykane und Sialinsäuren auf den Glykanen und damit ihrer Relevanz für die CD22-Bindung erfordert weitergehende Analysen.

Um festzustellen, ob es sich bei den dämpfenden Effekten vor allem der desialylierten Caseinhydrolysate auf das  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal tatsächlich um ein CD22-vermittelten Effekt handelt, ist es notwendig den Phosphorylierungsstatus der intrazellulären Domäne von CD22 und eine Rekrutierung von SHP-1 bei Daudi-Zellen, die mit den desialylierten Caseinhydrolysaten aber auch mit anderen Milchglykoproteinen/-peptiden inkubiert wurden, zu untersuchen.

Um den Einfluss der Milchglykoproteine/-peptide auf die Aktivierung/Dämpfung von B-Zellen des Neugeborenen zu testen, müssen die Milchglykoproteine/-peptide in einem B-Zell-Aktivierungstest mit neonatalen B-Zellen eingesetzt werden. Bei Neugeborenen ist der Anteil an membrangebundenem IgM sowie des Heterodimers  $\text{Ig}\alpha$  und  $\text{Ig}\beta$  im Vergleich zum

Erwachsenen erhöht (Macardle et al., 1997) und die Expression von CD22 auf neonatalen B-Zellen schwankt in Abhängigkeit von T-Zell-abhängiger/unabhängiger Stimulation (Viemann et al., 2000). Die unterschiedliche Expression von B-Zell-Molekülen bei adulten und neonatalen B-Zellen sorgt möglicherweise für die Diskrepanz in der humoralen Immunantwort. Sollten die Milchglykoproteine/-peptide ein extrazelluläres „Clustering“ der beteiligten Rezeptormoleküle (CD22) bewirken, welches zu einer veränderten intrazellulären Colokalisierung der an der Signaltransduktion beteiligten Moleküle führt, ist die Verfügbarkeit (Expression) der beteiligten Moleküle ein wichtiger Faktor bei der B-Zell-abhängigen Immunantwort.

Bindungs- und Interaktionsstudien von B-Zellen mit den Milchproteinen/-peptiden mittels Fluoreszenzmikroskopie könnten Aufschlüsse über die Lokalisierung von beteiligten, ausgewählten Molekülen geben. Bei B-Zell/B-Zell-Interaktionen wurde CD22 an den Zell-Zell-Kontaktflächen in „Clustern“ mit mIgM lokalisiert (Collins et al., 2004). Es konnte mehr CD22 an den Kontaktflächen bei B-Zellen mit B-Zellen als bei B-Zellen mit T-Zellen nachgewiesen werden. Es stellt sich daher die Frage, ob Milchproteine/-peptide möglicherweise ebenfalls zu einer veränderten Lokalisation von CD22 in der Zelle führen.

Anhand der gewählten Testsysteme konnten Unterschiede und Gemeinsamkeiten zwischen (Glyko-)Proteinen und Peptiden aus humaner, boviner und Kamel-Milch nachgewiesen werden. In den B-Zell-Aktivierungstests konnten, vor allem bei niedrigen Konzentrationen der eingesetzten Caseinhydrolysate, Unterschiede zwischen bovinen Caseinen und humanen / Kamel-Caseinen festgestellt werden. Die Zusammensetzungen und das Vorkommen von bestimmten Milchglykoproteinen/-peptiden können entweder die Induktion einer Toleranz oder eine Überempfindlichkeitsreaktion bewirken. Die Ergebnisse der B-Zell-Aktivierungstests lassen die Schlussfolgerung zu, dass die Aktivierbarkeit der B-Zellen durch humane Caseinhydrolysate einem „Status Quo“ entspricht. Deutliche Abweichungen in der Aktivierbarkeit der B-Zellen sei es durch desialylierte Caseinhydrolysate oder durch z.B. bovinen Caseinhydrolysate verhindern diesen „Status Quo“, führen zu Ungleichgewichten der Immunantwort und damit möglicherweise zu Überempfindlichkeitsreaktionen.



## 6 LITERATURVERZEICHNIS

- Adkins,B. (1999).** T-cell function in newborn mice and humans. **Immunol. Today** 20, S. 330-335.
- Anderson,L. und Anderson,N.G. (1977).** High resolution two-dimensional electrophoresis of human plasma proteins. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A** 74, S. 5421-5425.
- Anderson,N.G., Powers,M.T., und Tollaksen,S.L. (1982).** Proteins of human milk. I. Identification of major components. **Clin. Chem.** 28, S. 1045-1055.
- Arai,S. (2000).** Functional food science in Japan: state of the art. **Biofactors** 12, S. 13-16.
- Azuma,N., Kaminogawa,S., und Kamauchi,K. (1984).** Molecular Weight and Conformation of Human kappa-Casein and Its Interaction with Other Human Milk Proteins. **Agric. Biol. Chem.** 48, S. 771-776.
- Baenziger,J.U. (1979).** Structure of the oligosaccharide of human J chain. **J. Biol. Chem.** 254, S. 4063-4071.
- Barclay,N., Beyers,A.D., Birkeland,M.L., Brown,M.H., Davis,S.J., Somoza,C., und Williams,A.F. (1993).** The Leucocyte Antigen Facts Book. (London)(Academic Press).
- Bebbington,C.R. (1991).** Expression of Antibody Genes in Nonlymphoid Mammalian Cells. **METHODS** 2, S. 136-145.
- Bernard,H., Negroni,L., Chatel,J.M., Clement,G., Adel-Patient,K., Peltre,G., Creminon,C., und Wal,J.M. (2000).** Molecular basis of IgE cross-reactivity between human beta-casein and bovine beta-casein, a major allergen of milk. **Mol. Immunol.** 37, S. 161-167.
- Bernt,K.M. und Walker,W.A. (1999).** Human milk as a carrier of biochemical messages. **Acta Paediatr. Suppl** 88, S. 27-41.
- Berridge,M.J. (1995).** Inositol trisphosphate and calcium signaling. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** 766, S. 31-43.
- Berseth,C.L., Michener,S.R., Nordyke,C.K., und Go,V.L. (1990).** Postpartum changes in pattern of gastrointestinal regulatory peptides in human milk. **Am. J. Clin. Nutr.** 51, S. 985-990.
- Bertotto,A., Gerli,R., Fabietti,G., Crupi,S., Arcangeli,C., Scalise,F., und Vaccaro,R. (1990).** Human breast milk T lymphocytes display the phenotype and functional characteristics of memory T cells. **Eur. J. Immunol.** 20, S. 1877-1880.
- Bienenstock,J., Ernst,P.B., und Underdown,B.J. (1987).** The gastrointestinal tract as an immunologic organ--state of the art. **Ann. Allergy** 59, S. 17-20.
- Bosserhoff,A., Wallach,J., und Frank,R.W. (1989).** Micropreparative separation of peptides derived from sodium dodecyl sulphate-solubilized proteins. **J. Chromatogr.** 473, S. 71-77.
- Braesch-Andersen,S. und Stamenkovic,I. (1994).** Sialylation of the B lymphocyte molecule CD22 by alpha 2,6-sialyltransferase is implicated in the regulation of CD22-mediated adhesion. **J. Biol. Chem.** 269, S. 11783-11786.
- Brandtzaeg,P., Bjerke,K., Kett,K., Kvale,D., Rognum,T.O., Scott,H., Sollid,L.M., und Valnes,K. (1987).** Production and secretion of immunoglobulins in the gastrointestinal tract. **Ann. Allergy** 59, S. 21-39.
- Brantl,V., Teschemacher,H., Blasig,J., Henschen,A., und Lottspeich,F. (1981).** Opioid activities of beta-casomorphins. **Life Sci.** 28, S. 1903-1909.

- Brinkmann,V., Muller,S., und Heusser,C.H. (1992).** T cell dependent differentiation of human B cells: direct switch from IgM to IgE, and sequential switch from IgM via IgG to IgA production. **Mol. Immunol.** 29, S. 1159-1164.
- Brock,J.H., Pineiro,A., und Lampreave,F. (1978).** The effect of trypsin and chymotrypsin on the antibacterial activity of complement, antibodies, and lactoferrin and transferrin in bovine colostrum. **Ann. Rech. Vet.** 9, S. 287-294.
- Brugnoni,D., Airo,P., Graf,D., Marconi,M., Lebowitz,M., Plebani,A., Giliani,S., Malacarne,F., Cattaneo,R., Ugazio,A.G., und . (1994).** Ineffective expression of CD40 ligand on cord blood T cells may contribute to poor immunoglobulin production in the newborn. **Eur. J. Immunol.** 24, S. 1919-1924.
- Cambier,J.C., Pleiman,C.M., und Clark,M.R. (1994).** Signal transduction by the B cell antigen receptor and its coreceptors. **Annu. Rev. Immunol.** 12, S. 457-486.
- Campbell,M.A. und Klinman,N.R. (1995).** Phosphotyrosine-dependent association between CD22 and protein tyrosine phosphatase 1C. **Eur. J. Immunol.** 25, S. 1573-1579.
- Carlson,S.E. (1985).** N-acetylneuraminic acid concentrations in human milk oligosaccharides and glycoproteins during lactation. **Am J Clin Nutr** 41, S. 720-726.
- Charlwood,J., Hanrahan,S., Tyldesley,R., Langridge,J., Dwek,M., und Camilleri,P. (2002).** Use of proteomic methodology for the characterization of human milk fat globular membrane proteins. **Anal. Biochem.** 301, S. 314-324.
- Charlwood,J., Skehel,J.M., und Camilleri,P. (2000).** Analysis of N-linked oligosaccharides released from glycoproteins separated by two-dimensional gel electrophoresis. **Anal. Biochem.** 284, S. 49-59.
- Collins,B.E., Blixt,O., DeSieno,A.R., Bovin,N., Marth,J.D., und Paulson,J.C. (2004).** Masking of CD22 by cis ligands does not prevent redistribution of CD22 to sites of cell contact. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A** 101, S. 6104-6109.
- Coppa,G.V., Gabrielli,O., Pierani,P., und Giorgi,P.L. (1993).** Oligosaccharides in human milk and their role in bacterial adhesion. In: *New Perspectives in infant nutrition*, Georg Thieme Verlag, S. 43-49.
- Corfield,A.P., Higa,H., Paulson,J.C., und Schauer,R. (1983).** The specificity of viral and bacterial sialidases for alpha(2-3)- and alpha(2-6)-linked sialic acids in glycoproteins. **Biochim. Biophys. Acta** 744, S. 121-126.
- Cornish,A.L., Freeman,S., Forbes,G., Ni,J., Zhang,M., Cepeda,M., Gentz,R., Augustus,M., Carter,K.C., und Crocker,P.R. (1998).** Characterization of siglec-5, a novel glycoprotein expressed on myeloid cells related to CD33. **Blood** 92, S. 2123-2132.
- Crocker,P.R., Clark,E.A., Filbin,M.T., Gordon,S., Jones,Y., Kehrl,J.H., Kelm,S., Le Douarin,N.M., Powell,L., Roder,J., Schnaar,R., Sgroi,D., Stamenkovic,I., Schauer,R., Schachner,M., Tedder,T., van den Berg,T.K., van der Merwe,P.A., Watt,S.M., und Varki,A. (1998).** Siglecs - a family of sialic acid-binding lectins. **Glycobiol.** 8, S. Glycoforum 2 v-vi.
- Crocker,P.R. und Kelm,S. (1996).** Methods for studying the cellular binding properties of lectin-like receptors. In: *Weir's Handbook of Experimental Immunology*, Hrsg.: L.A.Herzenberg, D.M.Weir und C.Blackwell. (Cambridge) (Blackwell Science), S.166.1-166.11.
- Crocker,P.R. und Varki,A. (2001).** Siglecs, sialic acids and innate immunity. **Trends Immunol.** 22, S. 337-342.
- Crocker,P.R., Vinson,M., Kelm,S., und Drickamer,K. (1999).** Molecular analysis of sialoside binding to sialoadhesin by NMR and site-directed mutagenesis. **Biochem J** 341, S. 355-361.

- Cunningham,A.S. (1979).** Respiratory syncytial virus and sudden infant death. **N. Engl. J. Med.** *300*, S. 1440.
- Cyster,J.G. und Goodnow,C.C. (1997).** Tuning antigen receptor signaling by CD22: integrating cues from antigens and the microenvironment. **Immunity.** *6*, S. 509-517.
- DeFranco,A.L., Richards,J.D., Blum,J.H., Stevens,T.L., Law,D.A., Chan,V.W., Datta,S.K., Foy,S.P., Hourihane,S.L., Gold,M.R., und . (1995).** Signal transduction by the B-cell antigen receptor. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** *766*, S. 195-201.
- Diplomarbeit Bock, N.** Interaktionen von Milchkomponenten mit Siglecs. 01/2000. Agrar-und Ernährungswissenschaftliche Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.
- Dobbins,W.O., III (1986).** Human intestinal intraepithelial lymphocytes. **Gut** *27*, S. 972-985.
- Donnelly,W.J., McNeill,G.P., Buchheim,W., und McGann,T.C. (1984).** A comprehensive study of the relationship between size and protein composition in natural bovine casein micelles. **Biochim. Biophys. Acta** *789*, S. 136-143.
- Doody,G.M., Justement,L.B., Delibrias,C.C., Matthews,R.J., Lin,J.J., Thomas,M.L., und Fearon,D.T. (1995).** A role in B cell activation for CD22 and the protein tyrosine phosphatase SHP. **Science** *269*, S. 242-244.
- Durandy,A., Thuillier,L., Forveille,M., und Fischer,A. (1990).** Phenotypic and functional characteristics of human newborns' B lymphocytes. **J. Immunol.** *144*, S. 60-65.
- Edge,A.S. und Spiro,R.G. (1987).** Presence of an O-glycosidically linked hexasaccharide in fetuin. **J. Biol. Chem.** *262*, S. 16135-16141.
- Egge,H. (1993).** The diversity of oligosaccharides in human milk. In: New Perspectives in Infant Nutrition, Hrsg.: Renner, B. und G.Sawatzki.Georg Thieme Verlag), S. 12-26.
- Erickson,L.D., Tygrett,L.T., Bhatia,S.K., Grabstein,K.H., und Waldschmidt,T.J. (1996).** Differential expression of CD22 (Lyb8) on murine B cells. **Int. Immunol.** *8*, S. 1121-1129.
- Farah,Z. (1993).** Composition and characteristics of camel milk. **J. Dairy Res.** *60*, S. 603-626.
- Farah,Z. und Farah-Riesen,M. (1985).** Separation and characterization of major components of camel milk casein. **Milchwissenschaft (milk science international)** *40*, S. 669-671.
- Faria,A.M., Ficker,S.M., Speziali,E., Menezes,J.S., Stransky,B., Verdolin,B.A., Lahmann,W.M., Rodrigues,V.S., und Vaz,N.M. (1998).** Aging and immunoglobulin isotype patterns in oral tolerance. **Braz. J. Med. Biol. Res.** *31*, S. 35-48.
- Fiat,A.M., Jolles,J., Aubert,J.P., Loucheux-Lefebvre,M.H., und Jolles,P. (1980).** Localisation and importance of the sugar part of human casein. **Eur. J. Biochem.** *111*, S. 333-339.
- Fiat,A.M., Migliore-Samour,D., Jolles,P., Drouet,L., Sollier,C.B., und Caen,J. (1993).** Biologically active peptides from milk proteins with emphasis on two examples concerning antithrombotic and immunomodulating activities. **J. Dairy Sci.** *76*, S. 301-310.
- Floyd,H., Nitschke,L., und Crocker,P.R. (2000).** A novel subset of murine B cells that expresses unmasked forms of CD22 is enriched in the bone marrow: implications for B-cell homing to the bone marrow [In Process Citation]. **Immunology** *101*, S. 342-347.
- Gerlach,J., Ghosh,S., Jumaa,H., Reth,M., Wienands,J., Chan,A.C., und Nitschke,L. (2003).** B cell defects in SLP65/BLNK-deficient mice can be partially corrected by the absence of CD22, an inhibitory coreceptor for BCR signaling. **Eur. J. Immunol.** *33*, S. 3418-3426.
- Goldman,A.S., Garza,C., Nichols,B.L., und Goldblum,R.M. (1982).** Immunologic factors in human milk during the first year of lactation. **J Pediatr** *100*, S. 563-567.

- Goldman,A.S. und Goldblum,R.M. (1995).** Defense Agents in Milk. In: handbook of milk composition, Academic Press), S. 727-748.
- Görg, A.** Two-Dimensional Electrophoresis of Proteins using Immobilized pH Gradients. 1988. Freising-Weihenstephan, Germany, Technical University of Munich;  
<http://www.weihenstephan.de/blm/deg>.
- Green,E.D., Adelt,G., Baenziger,J.U., Wilson,S., und van Halbeek,H. (1988).** The asparagine-linked oligosaccharides on bovine fetuin. Structural analysis of N-glycanase-released oligosaccharides by 500-megahertz 1H NMR spectroscopy. **J. Biol. Chem.** 263, S. 18253-18268.
- Hanasaki,K., Powell,L.D., und Varki,A. (1995a).** Binding of human plasma sialoglycoproteins by the B cell-specific lectin CD22. Selective recognition of immunoglobulin M and haptoglobin. **J. Biol. Chem.** 270, S. 7543-7550.
- Hanasaki,K., Varki,A., und Powell,L.D. (1995b).** CD22-mediated cell adhesion to cytokine-activated human endothelial cells. Positive and negative regulation by alpha 2-6-sialylation of cellular glycoproteins. **J. Biol. Chem.** 270, S. 7533-7542.
- Hanisch,F.G. (1993).** Mucins in human milk, Structural and functional aspects. In: New Perspectives in infant nutrition, Georg Thieme Verlag), S. 32-38.
- Hanisch,F.G., Hacker,J., und Schrotten,H. (1993).** Specificity of S fimbriae on recombinant Escherichia coli: preferential binding to gangliosides expressing NeuGc alpha (2-3)Gal and NeuAc alpha (2-8)NeuAc. **Infect. Immun.** 61, S. 2108-2115.
- Harms,H.K. und Bertele-Harms,R.M. (1990).** Gastrointestinal Manifestations of Food Allergy in Childhood. In: Food allergy in infancy and childhood, Hrsg.: H.K.Harms und U.Wahn. (Berlin) (Springer, Heidelberg), S. 71-86.
- Hennet,T., Chui,D., Paulson,J.C., und Marth,J.D. (1998).** Immune regulation by the ST6Gal sialyltransferase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 95, S. 4504-4509.
- Heukeshoven,J. und Dernick,R. (1988).** Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels. **Electrophoresis** 9, S. 28-32.
- Hickman,S., Kornfeld,R., Osterland,C.K., und Kornfeld,S. (1972).** The structure of the glycopeptides of a human M-immunoglobulin. **J. Biol. Chem.** 247, S. 2156-2163.
- Hirmo,S., Kelm,S., Iwersen,M., Hotta,K., Goso,Y., Ishihara,K., Suguri,T., Morita,M., Wadstrom,T., und Schauer,R. (1998).** Inhibition of Helicobacter pylori sialic acid-specific haemagglutination by human gastrointestinal mucins and milk glycoproteins. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.** 20, S. 275-281.
- Hirmo,S., Kelm,S., Schauer,R., Nilsson,B., und Wadstrom,T. (1996).** Adhesion of Helicobacter pylori strains to alpha-2,3-linked sialic acids. **Glycoconj. J.** 13, S. 1005-1011.
- Holt,P.G. und Jones,C.A. (2000).** The development of the immune system during pregnancy and early life. **Allergy** 55, S. 688-697.
- Hombach,J., Leclercq,L., Radbruch,A., Rajewsky,K., und Reth,M. (1988).** A novel 34-kd protein co-isolated with the IgM molecule in surface IgM-expressing cells. **EMBO J.** 7, S. 3451-3456.
- Isolauri,E., Tahvanainen,A., Peltola,T., und Arvola,T. (1999).** Breast-feeding of allergic infants. **J. Pediatr.** 134, S. 27-32.
- Isolauri,E. und Turjanmaa,K. (1996).** Combined skin prick and patch testing enhances identification of food allergy in infants with atopic dermatitis. **J. Allergy Clin. Immunol.** 97, S. 9-15.



- Jarvinen, K.M., Laine, S.T., Jarvenpaa, A.L., und Suomalainen, H.K. (2000).** Does low IgA in human milk predispose the infant to development of cow's milk allergy? *Pediatr. Res.* 48, S. 457-462.
- Jin, L., McLean, P.A., Neel, B.G., und Wortis, H.H. (2002).** Sialic acid binding domains of CD22 are required for negative regulation of B cell receptor signaling. *J. Exp. Med.* 195, S. 1199-1205.
- Justement, L.B. (2000).** Signal transduction via the B-cell antigen receptor: the role of protein tyrosine kinases and protein tyrosine phosphatases. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 245, S. 1-51.
- Kappeler, S., Farah, Z., und Puhan, Z. (1998).** Sequence analysis of *Camelus dromedarius* milk caseins. *J Dairy Res* 65, S. 209-222.
- Kelm, S., Brossmer, R., Isecke, R., Gross, H.J., Streng, K., und Schauer, R. (1998).** Functional groups of sialic acids involved in binding to siglecs (sialoadhesins) deduced from interactions with synthetic analogues. *Eur J Biochem* 255, S. 663-672.
- Kelm, S., Gerlach, J., Brossmer, R., Danzer, C.P., und Nitschke, L. (2002).** The ligand-binding domain of CD22 is needed for inhibition of the B cell receptor signal, as demonstrated by a novel human CD22-specific inhibitor compound. *J. Exp. Med.* 195, S. 1207-1213.
- Kelm, S., Pelz, A., Schauer, R., Filbin, M.T., Tang, S., de Bellard, M.E., Schnaar, R.L., Mahoney, J.A., Hartnell, A., Bradfield, P., und Crocker, P.R. (1994a).** Sialoadhesin, myelin-associated glycoprotein and CD22 define a new family of sialic acid-dependent adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily. *Curr. Biol.* 4, S. 965-972.
- Kelm, S. und Schauer, R. (1997).** Sialic acids in molecular and cellular interactions. *Int. Rev. Cytol.* 175, S. 137-240.
- Kelm, S., Schauer, R., und Crocker, P.R. (1996).** The sialoadhesins - A family of sialic acid-dependent cellular recognition molecules within the immunoglobulin superfamily. *Glycoconjugate J.* 13, S. 913-926.
- Kelm, S., Schauer, R., Manuguerra, J.C., Gross, H.J., und Crocker, P.R. (1994b).** Modifications of cell surface sialic acids modulate cell adhesion mediated by sialoadhesin and CD22. *Glycoconjugate J.* 11, S. 576-585.
- Kitagawa, H., Nakada, H., Fukui, S., Funakoshi, I., und Kawasaki, T. (1991).** Novel oligosaccharides with the sialyl-Le<sup>a</sup> structure in human milk. *Biochemistry* 30, S. 2869-2876.
- Kohler, H., Donarski, S., Stocks, B., Parret, A., Edwards, C., und Schrotten, H. (2002).** Antibacterial characteristics in the feces of breast-fed and formula-fed infants during the first year of life. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 34, S. 188-193.
- Kunz, C. und Lonnerdal, B. (1990a).** Casein and casein subunits in preterm milk, colostrum, and mature human milk. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 10, S. 454-461.
- Kunz, C. und Lonnerdal, B. (1990b).** Human-milk proteins: analysis of casein and casein subunits by anion-exchange chromatography, gel electrophoresis, and specific staining methods. *Am. J. Clin. Nutr.* 51, S. 37-46.
- Kyhse-Andersen, J. (1984).** Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods* 10, S. 203-209.
- Laemmli, U.K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, S. 680-685.
- Laiho, K., Ouwehand, A., Salminen, S., und Isolauri, E. (2002).** Inventing probiotic functional foods for patients with allergic disease. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 89, S. 75-82.

- Laissue, J.A. und Gebbers, J.O. (1992).** The intestinal barrier and the gut-associated lymphoid tissue. **Curr. Stud. Hematol. Blood Transfus.** S. 19-43.
- Lanoue, A., Batista, F.D., Stewart, M., und Neuberger, M.S. (2002).** Interaction of CD22 with alpha2,6-linked sialoglycoconjugates: innate recognition of self to dampen B cell autoreactivity? **Eur. J. Immunol.** 32, S. 348-355.
- Lanzavecchia, A. (1985).** Antigen-specific interaction between T and B cells. **Nature** 314, S. 537-539.
- Leprince, C., Draves, K.E., Geahlen, R.L., Ledbetter, J.A., und Clark, E.A. (1993).** CD22 associates with the human surface IgM-B-cell antigen receptor complex. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 90, S. 3236-3240.
- Li, E.W. und Mine, Y. (2004).** Immunoenhancing effects of bovine glycomacropptide and its derivatives on the proliferative response and phagocytic activities of human macrophagelike cells, U937. **J. Agric. Food Chem.** 52, S. 2704-2708.
- Liepke, C., Adermann, K., Raida, M., Magert, H.J., Forssmann, W.G., und Zucht, H.D. (2002).** Human milk provides peptides highly stimulating the growth of bifidobacteria. **Eur. J. Biochem.** 269, S. 712-718.
- Lindberg, T., Borulf, S., und Jakobsson, I. (1989).** Digestion of milk proteins in infancy. **Acta Paediatr. Scand. Suppl** 351, S. 29-33.
- Lindberg, T., Ohlsson, K., und Westrom, B. (1982).** Protease inhibitors and their relation to protease activity in human milk. **Pediatr. Res.** 16, S. 479-483.
- Lo, C.W. und Kleinman, R.E. (1996a).** Infant formula, past and future: opportunities for improvement. **Am J Clin Nutr** 63, S. 646S-650S.
- Lo, N.W. und Lau, J.T. (1996b).** Novel heterogeneity exists in the 5'-untranslated region of the beta-galactoside alpha 2,6-sialyltransferase mRNAs in the human B-lymphoblastoid cell line, louckes. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 228, S. 380-385.
- Lonnerdal, B. und Atkinson, S. (1995).** Nitrogenous Components of Milk. In: Handbook of milk composition, Hrsg.: R.G.Jensen. Academic Press), S. 351-494.
- Macardle, P.J., Weedon, H., Fusco, M., Nobbs, S., Ridings, J., Flego, L., Robertson, D.M., und Zola, H. (1997).** The antigen receptor complex on cord B lymphocytes. **Immunology** 90, S. 376-382.
- Machtinger, S. und Moss, R. (1986).** Cow's milk allergy in breast-fed infants: the role of allergen and maternal secretory IgA antibody. **J Allergy Clin Immunol** 77, S. 341-347.
- Marvin, L.F., Parisod, V., Fay, L.B., und Guy, P.A. (2002).** Characterization of lactosylated proteins of infant formula powders using two-dimensional gel electrophoresis and nanoelectrospray mass spectrometry. **Electrophoresis** 23, S. 2505-2512.
- May, A.P., Robinson, R.C., Vinson, M., Crocker, P.R., und Jones, E.Y. (1998).** Crystal structure of the N-terminal domain of sialoadhesin in complex with 3' sialyllactose at 1.85 angstrom resolution. **Mol. Cell** 1, S. 719-728.
- Meisel, H. (1986).** Chemical characterization and opioid activity of an exorphin isolated from in vivo digests of casein. **FEBS Lett.** 196, S. 223-227.
- Migliore-Samour, D., Floc'h, F., und Jolles, P. (1989).** Biologically active casein peptides implicated in immunomodulation. **J. Dairy Res.** 56, S. 357-362.
- Miller, F. (1971).** Glycopeptides of human immunoglobulins. II. Contribution to the antigenicity of the heavy chain. **Immunochemistry.** 8, S. 99-111.

- Minikiewicz,P., Slangen,C.J., Lagerwerf,F.M., Haverkamp,J., Rollema,H.S., und Visser,S. (1996).** Reversed-phase high-performance liquid chromatographic separation of bovine kappa-casein macropeptide and characterization of isolated fractions. **J. Chromatogr. A** 743, S. 123-135.
- Miyauchi,H., Kaino,A., Shinoda,I., Fukuwatari,Y., und Hayasawa,H. (1997).** Immunomodulatory effect of bovine lactoferrin pepsin hydrolysate on murine splenocytes and Peyer's patch cells. **J. Dairy Sci.** 80, S. 2330-2339.
- Molle,D. und Leonil,J. (1995).** Heterogeneity of the bovine kappa-casein caseinomacropeptide, resolved by liquid chromatography on-line with electrospray ionization mass spectrometry. **J Chromatogr. A** 708, S. 223-230.
- Moneret-Vautrin,D.A. (1999).** Cow's milk allergy. **Allerg Immunol (Paris)** 31, S. 201-210.
- Montreuil,J. (1993).** The saga of human milk gynolactose. In: New Perspectives in infant nutrition, Georg Thieme Verlag), S. 3-11.
- Moro,G.E., Warm,A., Arslanoglu,S., und Miniello,V. (2002).** Management of bovine protein allergy: new perspectives and nutritional aspects. **Ann. Allergy Asthma Immunol.** 89, S. 91-96.
- Nascimento de Araujo,A.N. und Giugliano,L.G. (2001).** Lactoferrin and free secretory component of human milk inhibit the adhesion of enteropathogenic Escherichia coli to HeLa cells. **BMC. Microbiol.** 1, S. 25.
- Nath,D., van der Merwe,P.A., Kelm,S., Bradfield,P., und Crocker,P.R. (1995).** The amino-terminal immunoglobulin-like domain of sialoadhesin contains the sialic acid binding site. Comparison with CD22. **J. Biol. Chem.** 270, S. 26184-26191.
- Newburg,D.S. und Neubauer,S.H. (1995).** Carbohydrates in milks: Analysis, quantities, and significance. In: Handbook of Milk Composition, Hrsg.: R.G.Jensen.Academic Press Inc), S. 273-349.
- Niggemann,B., Binder,C., Klettke,U., und Wahn,U. (1999).** In vivo and in vitro studies on the residual allergenicity of partially hydrolysed infant formulae. **Acta Paediatr** 88, S. 394-398.
- Nilsson,B., Norden,N.E., und Svensson,S. (1979).** Structural studies on the carbohydrate portion of fetuin. **J. Biol. Chem.** 254, S. 4545-4553.
- Nitschke,L., Carsetti,R., Ocker,B., Kohler,G., und Lamers,M.C. (1997).** CD22 is a negative regulator of B-cell receptor signalling. **Curr. Biol** 7, S. 133-143.
- Nitschke,L., Floyd,H., Ferguson,D.J., und Crocker,P.R. (1999).** Identification of CD22 ligands on bone marrow sinusoidal endothelium implicated in CD22-dependent homing of recirculating B cells. **J Exp Med** 189, S. 1513-1518.
- Ogra,P.L., Losonsky,G.A., und Fishaut,M. (1983).** Colostrum-derived immunity and maternal-neonatal interaction. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** 409, S. 82-95.
- Okeefe,T.L., Williams,G.T., Davies,S.L., und Neuberger,M.S. (1996).** Hyperresponsive B cells in CD22-deficient mice. **Science** 274, S. 798-801.
- Oliver,A.M., Martin,F., und Kearney,J.F. (1999).** IgM<sup>high</sup>CD21<sup>high</sup> lymphocytes enriched in the splenic marginal zone generate effector cells more rapidly than the bulk of follicular B cells. **J. Immunol.** 162, S. 7198-7207.
- Otipoby,K.L., Andersson,K.B., Draves,K.E., Klaus,S.J., Farr,A.G., Kerner,J.D., Perlmutter,R.M., Law,C.L., und Clark,E.A. (1996).** CD22 regulates thymus-independent responses and the lifespan of B cells. **Nature** 384, S. 634-637.

- Patel,N., Brinkman-Van der Linden,E.C.M., Altmann,S.W., Balasubramanian,S., Timans,C.S., Peterson,D., Bazan,J.F., Varki,A., und Kastelein,R.A. (1999).** OB-BP1/Siglec-6 - A leptin- and sialic acid-binding protein of the immunoglobulin superfamily. **J. Biol. Chem.** 427, S. 22729-22738.
- Patton,S. (1978).** Milk secretion at the cellular level: a unique approach to the mechanism of exocytosis. **J. Dairy Sci.** 61, S. 643-650.
- Patton,S. (1994).** Detection of large fragments of the human milk mucin MUC-1 in feces of breast-fed infants. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.** 18, S. 225-230.
- Patton,S., Huston,G.E., Jenness,R., und Vaucher,Y. (1989).** Differences between individuals in high-molecular weight glycoproteins from mammary epithelia of several species. **Biochim. Biophys. Acta** 980, S. 333-338.
- Peaker,C.J. und Neuberger,M.S. (1993).** Association of CD22 with the B cell antigen receptor. **Eur. J. Immunol.** 23, S. 1358-1363.
- Peterson,J.A., Patton,S., und Hamosh,M. (1998).** Glycoproteins of the human milk fat globule in the protection of the breast-fed infant against infections. **Biol. Neonate.** 74, S. 143-162.
- Pierce,S.K. (2002).** Lipid rafts and B-cell activation. **Nat. Rev. Immunol.** 2, S. 96-105.
- Pleiman,C.M., D'Ambrosio,D., und Cambier,J.C. (1994).** The B-cell antigen receptor complex: structure and signal transduction. **Immunol. Today** 15, S. 393-399.
- Poe,J.C., Fujimoto,M., Jansen,P.J., Miller,A.S., und Tedder,T.F. (2000).** CD22 forms a quaternary complex with SHIP, Grb2, and Shc. A pathway for regulation of B lymphocyte antigen receptor-induced calcium flux. **J. Biol. Chem.** 275, S. 17420-17427.
- Portelli,J., Gordon,A., und May,J.T. (1998).** Effect of compounds with antibacterial activities in human milk on respiratory syncytial virus and cytomegalovirus in vitro. **J Med Microbiol** 47, S. 1015-1018.
- Powell,L.D., Jain,R.K., Matta,K.L., Sabesan,S., und Varki,A. (1995).** Characterization of sialyloligosaccharide binding by recombinant soluble and native cell-associated CD22 - Evidence for a minimal structural recognition motif and the potential importance of multisite binding. **J. Biol. Chem.** 270, S. 7523-7532.
- Powell,L.D. und Varki,A. (1994).** The oligosaccharide binding specificities of CD22  $\beta$ , a sialic acid-specific lectin of B cells. **J. Biol. Chem.** 269, S. 10628-10636.
- Pritchett,T.J. und Paulson,J.C. (1989).** Basis for the potent inhibition of influenza virus infection by equine and guinea pig alpha 2-macroglobulin. **J. Biol. Chem.** 264, S. 9850-9858.
- Raju,T.S., Briggs,J.B., Borge,S.M., und Jones,A.J. (2000).** Species-specific variation in glycosylation of IgG: evidence for the species-specific sialylation and branch-specific galactosylation and importance for engineering recombinant glycoprotein therapeutics. **Glycobiol.** 10, S. 477-486.
- Razi,N. und Varki,A. (1998).** Masking and unmasking of the sialic acid-binding lectin activity of CD22 (Siglec-2) on B lymphocytes. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A** 95, S. 7469-7474.
- Restani,P., Beretta,B., Fiocchi,A., Ballabio,C., und Galli,C.L. (2002).** Cross-reactivity between mammalian proteins. **Ann. Allergy Asthma Immunol.** 89, S. 11-15.
- Restani,P., Gaiaschi,A., Plebani,A., Beretta,B., Cavagni,G., Fiocchi,A., Poiesi,C., Velona,T., Ugazio,A.G., und Galli,C.L. (1999).** Cross-reactivity between milk proteins from different animal species. **Clin. Exp. Allergy** 29, S. 997-1004.
- Restani,P., Velona,T., Plebani,A., Ugazio,A.G., Poiesi,C., Muraro,A., und Galli,C.L. (1995).** Evaluation by SDS-PAGE and immunoblotting of residual antigenicity in hydrolysed protein formulas. **Clin. Exp. Allergy** 25, S. 651-658.

- Reth,M. (2001).** Oligomeric antigen receptors: a new view on signaling for the selection of lymphocytes. **Trends Immunol.** 22, S. 356-360.
- Roberfroid,M.B. (2000).** Prebiotics and probiotics: are they functional foods? **Am. J. Clin. Nutr.** 71, S. 1682S-1687S.
- Roberton,D.M., Paganelli,R., Dinwiddie,R., und Levinsky,R.J. (1982).** Milk antigen absorption in the preterm and term neonate. **Arch. Dis. Child** 57, S. 369-372.
- Rudloff,S. und Kunz,C. (1997).** Protein and nonprotein nitrogen components in human milk, bovine milk, and infant formula: quantitative and qualitative aspects in infant nutrition. **J Pediatr Gastroenterol Nutr** 24, S. 328-344.
- Rudloff,S., Stefan,C., Pohlentz,G., und Kunz,C. (2002).** Detection of ligands for selectins in the oligosaccharide fraction of human milk. **Eur. J. Nutr.** 41, S. 85-92.
- Saiki,R.K., Scharf,S., Faloona,F., Mullis,K.B., Horn,G.T., Erlich,H.A., und Arnheim,N. (1985).** Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science** 230, S. 1350-1354.
- Saito,T. und Itoh,T. (1992).** Variations and distributions of O-glycosidically linked sugar chains in bovine kappa-casein. **J. Dairy Sci.** 75, S. 1768-1774.
- Sanchez,M., Misulovin,Z., Burkhardt,A.L., Mahajan,S., Costa,T., Franke,R., Bolen,J.B., und Nussenzweig,M. (1993).** Signal transduction by immunoglobulin is mediated through Ig alpha and Ig beta. **J. Exp. Med.** 178, S. 1049-1055.
- Sato,S., Miller,A.S., Inaoki,M., Bock,C.B., Jansen,P.J., Tang,M.L.K., und Tedder,T.F. (1996).** CD22 is both a positive and negative regulator of B lymphocyte antigen receptor signal transduction: Altered signaling in CD22- deficient mice. **Immunity.** 5, S. 551-562.
- Savilahti,E. (1972).** Immunoglobulin-containing cells in the intestinal mucosa and immunoglobulins in the intestinal juice in children. **Clin. Exp. Immunol.** 11, S. 415-425.
- Savilahti,E. und Kuitunen,M. (1992).** Allergenicity of cow milk proteins. **J Pediatr** 121, S. S12-S20.
- Schamel,W.W. und Reth,M. (2000).** Monomeric and oligomeric complexes of the B cell antigen receptor. **Immunity.** 13, S. 5-14.
- Schauer,R. (1985).** Sialic acids and their role as biological masks. **Trends Biochem. Sci.** 10, S. 357-360.
- Schauer,R. und Kamerling,J.P. (1997).** Chemistry, biochemistry and biology of sialic acids. In: Glycoproteins II, Hrsg.: J.Montreuil, J.F.G.Vliegthart und H.Schachter. (Amsterdam) (Elsevier), S. 243-402.
- Schlimme,E. und Buchheim,W. (1995).** Milch und ihre Inhaltsstoffe, Chemische und physikalische Grundlagen. (Gelsenkirchen)(Verlag Th. Mann).
- Schreiber,R.A. und Walker,W.A. (1988).** The gastrointestinal barrier: antigen uptake and perinatal immunity. **Ann. Allergy** 61, S. 3-12.
- Schroten,H., Lethen,A., Hanisch,F.G., Plogmann,R., Hacker,J., Nobis-Bosch,R., und Wahn,V. (1992).** Inhibition of adhesion of S-fimbriated Escherichia coli to epithelial cells by meconium and feces of breast-fed and formula-fed newborns: mucins are the major inhibitory component. **J Pediatr Gastroenterol Nutr** 15, S. 150-158.
- Schroten,H., Stapper,C., Plogmann,R., Kohler,H., Hacker,J., und Hanisch,F.G. (1998).** Fab-independent antiadhesion effects of secretory immunoglobulin A on S- fimbriated Escherichia coli are mediated by sialyloligosaccharides. **Infect. Immun.** 66, S. 3971-3973.

- Schwertmann,A., Schrotten,H., Hacker,J., und Kunz,C. (1999).** S-fimbriae from *Escherichia coli* bind to soluble glycoproteins from human milk. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.** 28, S. 257-263.
- Sgroi,D., Koretzky,G.A., und Stamenkovic,I. (1995).** Regulation of CD45 engagement by the B-cell receptor CD22. **Proc Natl Acad Sci U S A** 92, S. 4026-4030.
- Shibuya,N., Goldstein,I.J., Broekaert,W.F., Nsimba-Lubaki,M., Peeters,B., und Peumans,W.J. (1987).** The elderberry (*Sambucus nigra* L.) bark lectin recognizes the Neu5Ac(alpha 2-6)Gal/GalNAc sequence. **J. Biol. Chem.** 262, S. 1596-1601.
- Simmons,D.L. (1993).** Cloning cell surface molecules by transient expression in mammalian cells. In: Cellular interactions in development: a practical approach, Hrsg.: D.A.Hartley. (Oxford, UK) (Oxford University Press), S. 93-128.
- Sjoberg,E.R., Powell,L.D., Klein,A., und Varki,A. (1994).** Natural ligands of the B cell adhesion molecule CD22  $\beta$  can be masked by 9-O-acetylation of sialic acids. **J. Cell Biol.** 126, S. 549-562.
- Slade,H.B. und Schwartz,S.A. (1987).** Mucosal immunity: the immunology of breast milk. **J. Allergy Clin. Immunol.** 80, S. 348-358.
- Smith,K.G., Tarlinton,D.M., Doody,G.M., Hibbs,M.L., und Fearon,D.T. (1998).** Inhibition of the B cell by CD22: a requirement for Lyn. **J Exp. Med.** 187, S. 807-811.
- Sorva,R., Makinen-Kiljunen,S., und Juntunen-Backman,K. (1994).** Beta-lactoglobulin secretion in human milk varies widely after cow's milk ingestion in mothers of infants with cow's milk allergy. **J. Allergy Clin. Immunol.** 93, S. 787-792.
- Speer,C.P. und Hein Kreikenbaum,H. (1993).** [Immunologic importance of breast milk] Immunologische Bedeutung der Muttermilch. **Monatsschr. Kinderheilkd.** 141, S. 10-20.
- Speer,C.P., Schatz,R., und Gahr,M. (1985).** [Function of breast milk macrophages]. **Monatsschr. Kinderheilkd.** 133, S. 813-817.
- Spiro,R.G. und Bhojroo,V.D. (1974).** Structure of the O-glycosidically linked carbohydrate units of fetuin. **J. Biol. Chem.** 249, S. 5704-5717.
- Spitzauer,S. (1999).** Allergy to mammalian proteins: at the borderline between foreign and self? **Int. Arch. Allergy Immunol.** 120, S. 259-269.
- Stamenkovic,I. und Seed,B. (1990).** The B-cell antigen CD22 mediates monocyte and erythrocyte adhesion. **Nature** 345, S. 74-77.
- Stamenkovic,I., Sgroi,D., Aruffo,A., Sy,M.S., und Anderson,T. (1991).** The lymphocyte-B adhesion molecule CD22 interacts with leukocyte common antigen CD45RO on T-cells and  $\alpha$ -2-6 sialyltransferase, CD75, on B-cells. **Cell** 66, S. 1133-1144.
- Stavnezer,J. (1996).** Immunoglobulin class switching. **Curr. Opin. Immunol.** 8, S. 199-205.
- Stoddart,A., Ray,R.J., und Paige,C.J. (1997).** Analysis of murine CD22 during B cell development: CD22 is expressed on B cell progenitors prior to IgM. **Int. Immunol.** 9, S. 1571-1579.
- Streng,K., Schauer,R., Bovin,N., Hasegawa,A., Ishida,H., Kiso,M., und Kelm,S. (1998).** Glycan specificity of myelin-associated glycoprotein and sialoadhesin deduced from interactions with synthetic oligosaccharides. **Eur J Biochem** 258, S. 677-685.
- Strobel,S. (1992).** Dietary manipulation and induction of tolerance. **J. Pediatr.** 121, S. S74-S79.
- Strobel,S. (2002).** Oral tolerance, systemic immunoregulation, and autoimmunity. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** 958, S. 47-58.

- Strobel,S. und Mowat,A.M. (1998).** Immune responses to dietary antigens: oral tolerance. **Immunol. Today** 19, S. 173-181.
- Stromqvist,M., Falk,P., Bergstrom,S., Hansson,L., Lonnerdal,B., Normark,S., und Hernell,O. (1995).** Human milk kappa-casein and inhibition of Helicobacter pylori adhesion to human gastric mucosa. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.** 21, S. 288-296.
- Sutton,B.J. und Gould,H.J. (1993).** The human IgE network. **Nature** 366, S. 421-428.
- Szefalusi,Z., Loibichler,C., Pichler,J., Reisenberger,K., Ebner,C., und Urbanek,R. (2000).** Direct evidence for transplacental allergen transfer. **Pediatr. Res.** 48, S. 404-407.
- Tilg,H., Dinarello,C.A., und Mier,J.W. (1997).** IL-6 and APPs: anti-inflammatory and immunosuppressive mediators. **Immunol. Today** 18, S. 428-432.
- Tomasi,T.B. (1989).** Regulation of the mucosal IGA response--an overview. **Immunol. Invest** 18, S. 1-15.
- Tomita,M., Bellamy,W., Takase,M., Yamauchi,K., Wakabayashi,H., und Kawase,K. (1991).** Potent antibacterial peptides generated by pepsin digestion of bovine lactoferrin. **J Dairy Sci** 74, S. 4137-4142.
- Towbin,H., Staehelin,T., und Gordon,J. (1979).** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A** 76, S. 4350-4354.
- Vaarala,O., Saukkonen,T., Savilahti,E., Klemola,T., und Akerblom,H.K. (1995).** Development of immune response to cow's milk proteins in infants receiving cow's milk or hydrolyzed formula. **J Allergy Clin Immunol** 96, S. 917-923.
- Van den Driessche M. und Veereman-Wauters,G. (2002).** Functional foods in pediatrics. **Acta Gastroenterol. Belg.** 65, S. 45-51.
- van der Merwe,P.A., Crocker,P.R., Vinson,M., Barclay,A.N., Schauer,R., und Kelm,S. (1996).** Localization of the putative sialic acid-binding site on the immunoglobulin superfamily cell-surface molecule CD22. **J. Biol. Chem.** 271, S. 9273-9280.
- van der Velden,V., Laan,M.P., Baert,M.R., de Waal,M.R., Neijens,H.J., und Savelkoul,H.F. (2001).** Selective development of a strong Th2 cytokine profile in high-risk children who develop atopy: risk factors and regulatory role of IFN-gamma, IL-4 and IL-10. **Clin. Exp. Allergy** 31, S. 997-1006.
- van Halbeek,H., Vliegthart,J.F., Fiat,A.M., und Jolles,P. (1985).** Isolation and structural characterization of the smaller-size oligosaccharides from desialylated human kappa-casein. Establishment of a novel type of core for a mucin-type carbohydrate chain. **FEBS Lett.** 187, S. 81-88.
- Varki,A. (1997).** Sialic acids as ligands in recognition phenomena. **FASEB J.** 11, S. 248-255.
- Viemann,D., Schlenke,P., Hammers,H.J., Kirchner,H., und Kruse,A. (2000).** Differential expression of the B cell-restricted molecule CD22 on neonatal B lymphocytes depending upon antigen stimulation. **Eur. J. Immunol.** 30, S. 550-559.
- Vinson,M., Strijbos,P.J., Rowles,A., Facci,L., Moore,S.E., Simmons,D.L., und Walsh,F.S. (2001).** Myelin-associated glycoprotein interacts with ganglioside GT1b. A mechanism for neurite outgrowth inhibition. **J. Biol. Chem.** 276, S. 20280-20285.
- Vinson,M., van der Merwe,P.A., Kelm,S., May,A., Jones,E.Y., und Crocker,P.R. (1996).** Characterization of the sialic acid-binding site in sialoadhesin by site-directed mutagenesis. **J. Biol. Chem.** 271, S. 9267-9272.
- Wal,J.M. (2002).** Cow's milk proteins/allergens. **Ann. Allergy Asthma Immunol.** 89, S. 3-10.

- Walker, W.A. (1978).** Antigen handling by the gut. *Arch. Dis. Child* 53, S. 527-531.
- Walker, W.A. (1979).** Gastrointestinal host defence: importance of gut closure in control of macromolecular transport. *Ciba Found. Symp.* S. 201-219.
- Walker, W.A. (1986).** Antigen handling by the small intestine. *Clin. Gastroenterol.* 15, S. 1-20.
- Walker, W.A. (1987).** Pathophysiology of intestinal uptake and absorption of antigens in food allergy. *Ann. Allergy* 59, S. 7-16.
- Walker, W.A. und Isselbacher, K.J. (1974).** Uptake and transport of macromolecules by the intestine. Possible role in clinical disorders. *Gastroenterology* 67, S. 531-550.
- Weiner, H.L. (2001).** Oral tolerance: immune mechanisms and the generation of Th3-type TGF-beta-secreting regulatory cells. *Microbes. Infect.* 3, S. 947-954.
- Wilson, G.L., Fox, C.H., Fauci, A.S., und Kehrl, J.H. (1991b).** cDNA cloning of the B cell membrane protein CD22: a mediator of B-B cell interactions. *J. Exp. Med.* 173, S. 137-146.
- Wilson, G.L., Fox, C.H., Fauci, A.S., und Kehrl, J.H. (1991a).** cDNA cloning of the B cell membrane protein CD22: a mediator of B-B cell interactions. *J. Exp. Med.* 173, S. 137-146.
- Wilson, N.L., Schulz, B.L., Karlsson, N.G., und Packer, N.H. (2002).** Sequential analysis of N- and O-linked glycosylation of 2D-PAGE separated glycoproteins. *J. Proteome. Res.* 1, S. 521-529.
- Wirt, D.P., Adkins, L.T., Palkowetz, K.H., Schmalstieg, F.C., und Goldman, A.S. (1992).** Activated and memory T lymphocytes in human milk. *Cytometry* 13, S. 282-290.
- Wold, A.E., Mestecky, J., Tomana, M., Kobata, A., Ohbayashi, H., Endo, T., und Eden, C.S. (1990).** Secretory immunoglobulin A carries oligosaccharide receptors for Escherichia coli type 1 fimbrial lectin. *Infect. Immun.* 58, S. 3073-3077.
- Xanthou, M., Bines, J., und Walker, W.A. (1995).** Human milk and intestinal host defense in newborns: an update. *Adv. Pediatr.* 42, S. 171-208.
- Yamauchi, K., Azuma, N., Kobayashi, H., und Kaminogawa, S. (1981).** Isolation and properties of human kappa-casein. *J. Biochem. (Tokyo)* 90, S. 1005-1012.
- Yohannan, J., Wienands, J., Coggeshall, K.M., und Justement, L.B. (1999).** Analysis of tyrosine phosphorylation-dependent interactions between stimulatory effector proteins and the B cell co-receptor CD22. *J. Biol. Chem.* 274, S. 18769-18776.
- Yoshioka, H., Iseki, K., und Fujita, K. (1983).** Development and differences of intestinal flora in the neonatal period in breast-fed and bottle-fed infants. *Pediatrics* 72, S. 317-321.
- Zaccai, N.R., Maenaka, K., Maenaka, T., Crocker, P.R., Brossmer, R., Kelm, S., und Jones, E.Y. (2003).** Structure-guided design of sialic Acid-based siglec inhibitors and crystallographic analysis in complex with sialoadhesin. *Structure. (Camb.)* 11, S. 557-567.
- Zheng, S.G., Wang, J.H., Koss, M.N., Quismorio, F., Jr., Gray, J.D., und Horwitz, D.A. (2004).** CD4+ and CD8+ regulatory T cells generated ex vivo with IL-2 and TGF-beta suppress a stimulatory graft-versus-host disease with a lupus-like syndrome. *J. Immunol.* 172, S. 1531-1539.



## 7 ZUSAMMENFASSUNG

Die Entwicklung des Immunsystems des Neugeborenen wird durch die Inhaltsstoffe der Muttermilch ausbalanciert und zur weiteren Reifung stimuliert. Ungleichgewichte in der Immunantwort sind denkbare Ursachen für Autoimmunerkrankungen oder Allergien und können durch die andersartigen Eigenschaften der Inhaltsstoffe der Muttermilchersatznahrung entstehen. Die molekularen Mechanismen der immunstimulierenden und –suppressiven Wirkung der Milchinhaltsstoffe sind teilweise noch ungeklärt. Ein bekannter Mechanismus bei der Regulation der humoralen Immunantwort läuft über CD22, das die B-Zellrezeptor-vermittelte Immunantwort dämpft. Daran ist die Sialinsäure-abhängige Bindung von CD22 an einen *cis*-Liganden auf der B-Zelle entscheidend beteiligt.

Ziel dieser Arbeit war es, Wechselwirkungen von Milchproteinen/-peptiden mit CD22 zu untersuchen. Dabei stand insbesondere die Frage im Vordergrund, ob es Spezies-abhängige Unterschiede gibt. Im Laufe der Arbeit wurden Fc-Chimären von CD22 sowie CD22-Fc Mutanten mit defekter Sialinsäure-Bindungsstelle hergestellt, ein Mikrotiterplattentest mit IgM als sialyliertes Zielmolekül für CD22-Fc sowie eine Affinitätschromatographie mit CD22-Fc entwickelt, um CD22-spezifische Liganden aus der Milch zu isolieren. Das Sialinsäurederivat BPC-Neu5Ac wurde auf seine Eignung als CD22-spezifisches Elutionsreagenz getestet und in der Affinitätschromatographie eingesetzt.

In den Bindungs- und Inhibitionsstudien mit verschiedenen Milchproteinen und -peptiden wurden humane Caseine als potenteste Inhibitoren der Sialinsäure-abhängigen Bindung von CD22-Fc an IgM identifiziert, die besser waren als unverdaute Kamel-Caseine und deutlich besser als bovine Caseine und humane Molkenproteine. Es konnte nachgewiesen werden, dass proteolytischer Verdau der Caseine die Potenz, die Bindung von CD22 an IgM zu inhibieren, reduziert, während bei humanen Molkenproteinen nach Proteolyse die inhibitorische Potenz stieg.

Im Rahmen der Charakterisierung der Caseine und Molkenproteine über Lektinbindung, Molekulargewicht und isoelektrischen Punkt sowie durch die Affinitätschromatographie mit CD22-Fc konnten bei humanen Caseine die meisten sialylierten Proteine und auch die meisten CD22-spezifischen Liganden identifiziert werden. Es wurden nicht nur die Caseine ( $\kappa$ -Casein) als Bindungspartner nachgewiesen, sondern auch Proteine der Milchfettkugelchenmembran wie Clusterin und Laktoferrin.

Aufgrund der Ergebnisse der Bindungstestdaten wurden ausgewählte Milchglykoproteine und ihre Präparationen im B-Zell-Aktivierungstest eingesetzt. Dabei wurde festgestellt, dass alle eingesetzten Caseine und Molkenproteine, ihre Peptide sowie Pflanzenproteinhydrolysate eher eine Dämpfung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung bewirkten und nicht eine erhöhte  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung wie durch das Sialinsäurederivat BPC-Neu5Ac. Die durch Proteine oder Peptide möglichen oligo- bis multivalenten Bindungen führen zu anderen Effekten als das

BPC-Neu5Ac, welches durch Blockierung der Lektinbindungsdomäne von CD22 eine Rekrutierung an den B-Zell-Rezeptor hemmt und CD22 aus seiner inhibitorischen Funktion auf das intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal entlässt.

Diese Ergebnisse ergeben ein differenziertes Bild der Regulation des Immunsystems durch Milchproteine/-peptide und zeigen deutliche Unterschiede zwischen den Milchproteinen der untersuchten Spezies. Es ergeben sich daraus folgende Ansätze für weitere Untersuchungen, um die aufgeworfenen Fragen zu beantworten: Durch Identifizierung der Glykoproteine/-peptide der Milchproteinpräparationen, der Art und Verknüpfung der Glykane und Sialinsäuren auf den Glykanen und damit ihrer Relevanz für die CD22-Bindung sollten die Milchproteinpräparationen genauer charakterisiert werden. Mittels präparativer Affinitätschromatographie von humanen, bovinen und Kamel-Caseinen sowie Molkenproteinen isolierte CD22-Liganden sollten massenspektrometrisch eingehender untersucht werden. Der Phosphorylierungsstatus der intrazellulären Domäne von CD22 und eine Rekrutierung von SHP-1 bei B-Zellen, die mit Hydrolysaten verschiedener Milchproteine inkubiert wurden, sollte genauer untersucht werden, um festzustellen, ob es sich bei den dämpfenden Effekten der getesteten Hydrolysate auf das  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal um ein CD22-vermittelten Effekt handelt.

## 8 SUMMARY

The development of the neonatal immune system is well balanced by breast milk components leading to an appropriate maturation of the immune system. Poorly balanced support of the developing immune system may lead to autoimmune diseases or allergies. Different properties of milk formula components could be the reason for deviations from this balance.

Little is known about the molecular mechanisms leading to stimulating or suppressing effects of milk components on the immune system. One mechanism known to regulate B-cell receptor-mediated cell activation is the inhibitory effect of CD22. Sialic acid-dependent interaction of CD22 on the B-cell surface seems to be critical for its negative regulatory function.

The aim of this work was to analyze interactions of milk glycoproteins and peptides with CD22. One major question was, whether such interactions are species-dependent.

In the course of this work Fc-chimeras of CD22 and CD22-Fc mutants lacking sialic acid binding activity were produced. Furthermore, a microtitre plate assay using IgM as a sialylated target for CD22 and a CD22-specific affinity chromatography procedure have been developed in order to isolate binding partners of CD22 from milk. A potent inhibitor of CD22, the sialic acid derivative BPC-Neu5Ac, was applied as elution reagent for the affinity chromatography.

Binding- and inhibition studies with different milk proteins and -peptides were performed. In these experiments human caseins were identified as potential inhibitors of the sialic acid-dependent interaction of CD22 with IgM. They inhibited better than undigested camel caseins and significantly better than human whey proteins and caseins from bovine milk. Proteolytic digestion of caseins reduced the potency to inhibit binding of CD22 to IgM, whereas the inhibitory potencies of whey proteins increased after digestion with protease.

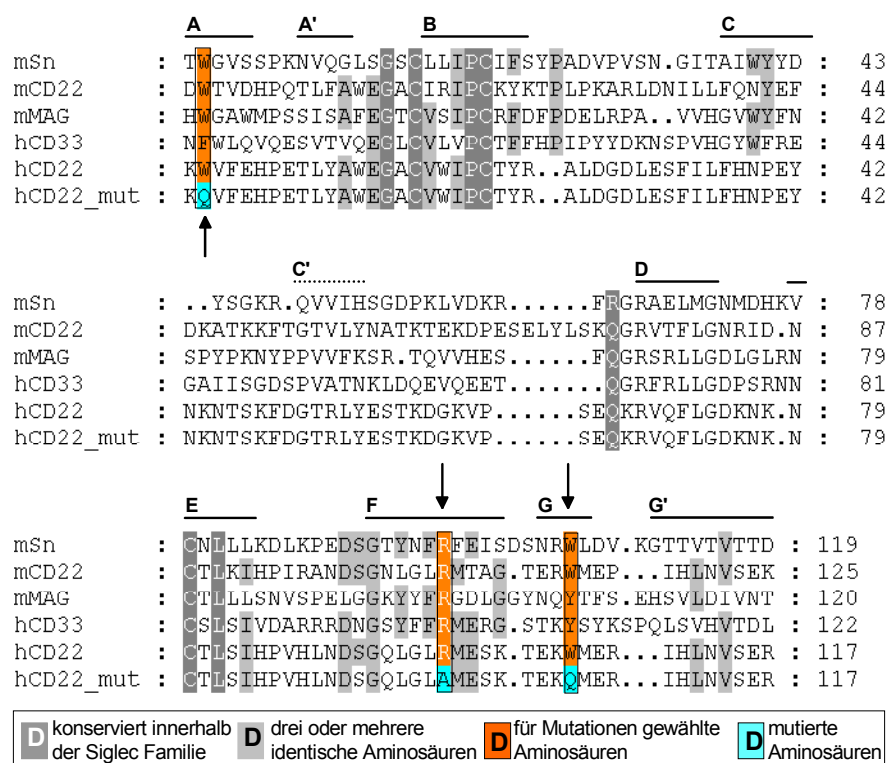
Whey proteins and caseins were characterized by lectin binding, molecular weight and isoelectric point and by CD22-specific affinity chromatography. Most of the sialylated proteins and CD22-specific binding partners were identified in human caseins. Caseins ( $\kappa$ -casein) as well as milk fat globular membrane proteins like clusterin and lactoferrin were identified in isolated ligands of CD22.

Due to their inhibitory properties in the CD22 binding assays milk glycoproteins and peptides were used in a B-cell activation assays. In contrast to the increased  $\text{Ca}^{2+}$ -mobilisation observed in presence of BPC-Neu5Ac, the  $\text{Ca}^{2+}$ -mobilisation was clearly reduced in the presence of caseins and whey proteins or peptides derived from these proteins. Sialylation of the milk proteins appears to reduce these effects strongly. Obviously, the interaction of milk glycoproteins and -peptides lead to different effects than BPC-Neu5Ac, which reduces the inhibitory function of CD22.

This finding could be due to oligo- or multivalent binding not possible for BPC-Neu5Ac or indicate a mechanism independent of the sialic acid binding site for the milk glycoproteins and -peptides.

The results presented in this work provide a differentiated perspective for the regulation of the immune system by milk glycoproteins and -peptides and clearly demonstrate species-dependent differences between milk proteins. To address the consequences of these observations the following issues should be investigated: A complete characterization of the milk protein preparations by identification of the glycoprotein and -peptide components involved the type and linkage of glycans and specifically the sialic acids on these glycans. Isolated CD22-specific ligands isolated by affinity chromatography of human, bovine and camel caseins and also whey proteins should be analyzed in detail, e.g. by mass spectrometry. The intracellular mechanism of the milk proteins on B-cell activation should be investigated in detail, i.e. the participation of CD22 in this process by analysis of the phosphorylation of CD22 and the recruitment of SHP-1.

### III Anhang



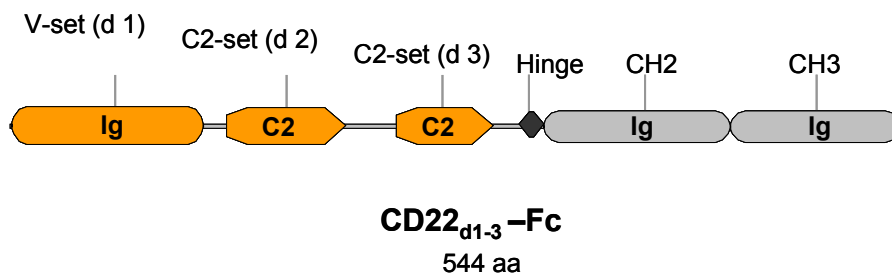
**Abbildung 35** Aminosäure-Alignment der V-set Domäne verschiedener Siglecs

Dargestellt ist ein Aminosäure-Alignment der für die Sialinsäure-Bindung entscheidenden Bereiche der V-set Domäne verschiedener Siglecs. Die für die ortsgerichtete Mutagenese von humanem CD22 ausgewählten Aminosäuren wurden bei allen aufgeführten Siglecs schwarz umrandet. Die innerhalb der Siglec-Familie konservierten Aminosäuren sind weiß auf grau (orange) unterlegt.

```

+22 MHLgLGgPWgLLLLLVLEgYLAgFSgDSS (Signalpeptid)
      → d1
1  KwVFEHPETL YAWEGACVWI PCTYRALDGD LESFILFHNP EYNKNTSKFD
51  GTRLYESTKD GKVPSEQKRV QFLGDKNKNC TLSIHPVHLN DSGQLGLRME
      ←           → d2
101 SKTEKMERI HLNVSERPFP PHIQLPPEIQ ESQEVTLTCL LNFSCYGYPI
151 QIQWLLEGVP MRQAAVTSTS LTIKSVFTRS ELKFSPQWSH HGKIVTCQLQ
      ←           → d3
201 DADGKFLSND TVQLNVKHTP KLEIKVTPSD AIVREGDSVT MTCEVSSSNP
251 EYTTVSWLKD GTSgLKKQNTF TLNLREVTKD QSGKYCCQVS NDVGPGRSEE
      → hinge
301 VFLQVQYATG TEPKSCDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS
351 RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS
401 VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS
451 RDELTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSgGSF
501 FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSL S PGK*

```



**Abbildung 36** Darstellung der Aminosäuresequenz und der Domänen-Organisation von CD22-Fc

Die mutierten Aminosäuren von CD22-Fc wurden unterstrichen, die ersten drei Domänen von CD22 wurden durch Pfeile gekennzeichnet und die *N*-Glykosylierungsstellen in der Sequenz hell und unterstrichen dargestellt.

#### IV      **Wissenschaftliche Poster und Vorträge**

##### Poster und Vorträge

- |         |          |   |
|---------|----------|---|
| 04.2002 | V1       | <p>„Isolierung von Liganden Kohlenhydrat-bindender Proteine“</p> <p><u>Nadine Bock</u>;</p> <p>Fachmesse Analytika, München, Germany</p>  |
| 07.2002 | P1       | <p>“Synthetic sialic acid analogues binding to Siglecs with high affinity and selectivity”</p> <p><u>Sørge Kelm</u>, Nadine Bock, Karen Streng, Reinhard Brossmer</p> <p>XXI<sup>st</sup> International Carbohydrate Symposium</p> <p>Cairns, Australia</p>   |
| 11.2002 | V2<br>P2 | <p>“The sialic acid binding activity of human CD22; analysis with an optical biosensor and a fluorimetric based solid-phase binding assay”</p> <p><u>Nadine Bock</u>, Sørge Kelm</p> <p>13<sup>th</sup> Joint Meeting of the Netherlands and German Society of Glycobiology and the Group Lillois de Glycobiologie</p> <p>Münster/Raesfeld, Germany</p> |
| 11.2003 | P3       | <p>“Immobilized <i>Vibrio cholerae</i> Sialidase – a Practical Tool for Glycoprotein Processing and Analysis”</p> <p><u>Nadine Bock</u>, Simone Cartellieri, Jürgen Kuballa, Sørge Kelm</p> <p>14<sup>th</sup> Joint Meeting of the Netherlands and German Society of Glycobiology and the Group Lillois de Glycobiologie</p> <p>Lille, France</p>      |

## V Curriculum Vitae

	<p><b>Nadine Bock</b> geboren am 30.06.1976 in Kiel, ledig</p>
10.06.1995	<p><b>Abitur</b> am Gymnasium Altenholz</p>
10.1995-11.2000	<p><b>Studium</b> der Ökotrophologie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel Fachrichtung: Ernährungswissenschaften Diplomarbeit im Fach Ernährungslehre zu dem Thema: „Interaktionen von Milchkomponenten mit Siglecs“ Gutachter: Dr. habil. S. Kelm und Dr. habil. R. Schindler durchgeführt am Biochemischen Institut der Medizinischen Fakultät Universität zu Kiel Abschluss: Diplom-Ökotrophologin</p>
01.2001- 09.2004	<p>Wissenschaftliche Mitarbeiterin der Universität Bremen am Fachbereich 2 (Biologie / Chemie) <b>Doktorarbeit</b> zu dem Thema: „Interaktionen von CD22 mit Milchglykoproteinen und mögliche Auswirkungen auf die Regulation der B-Zell-Aktivierung“ Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Sørge Kelm und Dr. med. habil. Günther Boehm durchgeführt am Centrum für Biomolekulare Interaktionen in Bremen / Fachbereichs 2 der Universität Bremen</p>



## VI Danksagung

Im Zusammenhang mit dieser Arbeit danke ich

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Sørge Kelm, für das Angebot, die Arbeit an dem Themengebiet „CD22 und Milchglykokonjugate“ in Bremen zu vertiefen, die hervorragenden, „neu geschaffenen“ Arbeitsbedingungen sowie seine Betreuung und sein persönliches Engagement im Zusammenhang mit dieser Arbeit jetzt und während der vergangenen Jahre.

Herrn Dr. med. habil. Günther Boehm für die Übernahme des Koreferats, und dass er trotz seines vollen Terminkalenders als „Milch- und Säuglingsexperte“ fungiert.

Allen meinen früheren und aktuellen Kollegen der AG Kelm für die schöne Arbeitsatmosphäre, für den morgendlichen Schnack beim Kännchen, die gemeinschaftliche Zusammenarbeit bei unseren „Lehre“-Projekten und jegliche Hilfe in Theorie und Praxis.

speziell Nazila für die unermüdliche Kultivierung meiner Zelllinien.

Karen und Frank für ihre Hilfe bei der Korrektur dieser Arbeit.

der Arbeitsgruppe Beyersmann, vor allem Monica Cox, für ihre Bereitwilligkeit, unserer neuen Gruppe beim Integrieren in den Fachbereich mit Rat und Tat (und Kaffee) zur Seite zu stehen.

Dr. Lars Nitschke vom Institut für Immunologie und Virologie der Universität Würzburg für die freundliche Aufnahme in Würzburg und seine Hilfe bei den Calcium-Messungen.

Christian Linden für seine (ausdauernde) technische Betreuung bei den Calcium-Messungen am FACS.

dem Team von Milupa Research in Friedrichsdorf für die Bereitstellung der verwendeten Milchproben und für die intensiven und motivierenden Diskussionen.

speziell Marko Mank für die Unterstützung bei der Etablierung der geeigneten MALDI-Probenvorbereitung, für die Durchführung der MALDI-TOF-Messungen und seine detaillierte Ergebnissauswertung.

Marco Euler (Milupa Research ) für die immer so „prompte“ Bereitstellung der Proben.

dem Team der Firma GALAB für die *AffiSep*CD22-Säulen und die *GlycoCleave*VCS und Frau Dr. Simone Cartellieri für die telefonischen Methodendiskussionen.

meinen lieben Eltern, meiner Schwester, meiner „Großfamilie“, Fazila und Katja, weil sie immer für mich da waren und mich unterstützt haben.

Frank, weil es dich gibt und weil ich immer mit dir sein mag.

## **VII Erklärung**

Ich erkläre, dass ich diese Arbeit ohne unerlaubte fremde Hilfe angefertigt habe, keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe, die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Ich erkläre des weiteren, dass die vorliegende Arbeit weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Bremen, den