

Identifizierung und Bedeutung von Lactoferrin als neuer Interaktionspartner von Polysialinsäuren

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Dr. med.
an der Medizinischen Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von: Rhea Veelken
geb. am 28.08.1991 in Erlangen

angefertigt: Medizinische Klinik für Gastroenterologie und Hepatologie
Universitätsklinikum Leipzig

Leibniz Institute für Farm Animal Biology (FBN) *
Institute of Reproductive Biology in Dummerstorf

Biochemisches Institut *
Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. med. Thomas Berg

Ko-Betreuer: PD Dr. biol. hom. Sebastian Peter Galuska *

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom: 13.10.2020

Meinen Eltern.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	4
1.1	Das Protein	4
1.2	Polysialinsäure (PolySia)	5
1.2.1	Struktureller Aufbau	5
1.2.2	Biosynthese	6
1.2.3	Eigenschaften und Funktion: PolySia auf Zelloberflächen	6
1.2.4	Eigenschaften und Funktion: PolySia in Körperflüssigkeiten	8
1.3	Das angeborene Immunsystem	8
1.3.1	Lactoferrin	9
1.3.2	NETose	10
1.4	Ziel der Arbeit	12
2	Publikation	13
3	Zusammenfassung der Arbeit	23
4	Literaturverzeichnis	27
5	Darstellung des eigenen Beitrages	31
6	Selbstständigkeitserklärung	32
7	Publikationsverzeichnis	33
8	Danksagung	34

1 Einleitung

Um die Komplexität eines Organismus zu verstehen, sind biochemische Substrate und die Abläufe auf zellulärer Ebene der Schlüssel zum Verständnis pathophysiologischer Vorgänge. Nicht nur stellt ihr Gleichgewicht die Weichen für das Bestehen eines gesunden Körpers, sondern eine Disbalance kann für ein Lebewesen zu einer folgenschweren Entkopplung fein regulierter Vorgänge führen, und somit schwere Krankheiten bedeuten.

1.1 Das Protein

Einer der wichtigsten Mitspieler in diesem Lebenskarussell ist das Protein. Proteine stellen Makromoleküle dar, die durch verschiedene Sequenzen der 21 Aminosäuren genetisch definiert werden. Ihre Funktion ist vielseitig. Sie determinieren nicht nur als Baustein die Struktur einer jeden Zelle, sondern fungieren als molekulares Schlüsselement an vorderster Front: Als Transportprotein verteilen sie körperwichtige Substanzen im Organismus, als Hormon steuern sie endokrinologische Vorgänge, als Energielieferant unterstützen sie lebensnotwendige Prozesse, als Enzym katalysieren sie chemische Reaktionen, als Regulator von Ionenkanälen und der osmotischen Hämostase beeinflussen sie die Zellerregbarkeit ob neuronal oder muskulär und als Antikörper spielen sie eine entscheidende Rolle in der Infektabwehr (Corfield 2017).

Unter anderem maßgeblich an diesen Abläufen beteiligt sind vor allem sogenannte Glykoproteine. Es ist bekannt, dass viele zellulär gebildete Proteine sich einer posttranslationalen Modifikation, der Glykosylierung, unterziehen, die im endoplasmatischen Retikulum als auch im Golgi-Apparat einer jeden Zelle im Organismus von Eukaryoten stattfindet. Biochemisch unterscheidet man zwei Formen der Glykosylierung. Zum einen existiert die sogenannte N-glykosidische Bindung bei der die Kohlenhydratgruppe N-Acetyl-Glukosamin an das Stickstoff-Atom der Amidgruppe von Asparagin gebunden wird. Sowohl das endoplasmatische Retikulum als auch der Golgi Apparat müssen hierfür durchlaufen werden. Zum anderen nutzt die O-glykosidische Bindung Hydroxygruppen von Serin, Threonin, Hydroxyprolin und Hydroxylysin um Kohlenhydratgruppen zu koppeln. Sie erfolgt fast ausschließlich im Golgi-Apparat (Spiro 2002).

Die gebundenen Kohlenhydratreste können entweder als Monosaccharide vorliegen, oder Di- und Oligosaccharide bis hin zu Polysacchariden bilden. Die entstehenden komplexen Glykan-Enden sind Komponenten von Glykolipiden, Lipopolysacchariden, Peptidoglykanen und Proteoglykanen. Sie erweitern das Spektrum der Proteinfunktion erneut erheblich. Zum einen dienen die Glykan-Strukturen der zellulären Kommunikation

indem sie in erster Instanz Prozesse wie Zell-Interaktion, Zell-Adhäsion und Zell-Migration erkennen, vermitteln und steuern. Außerdem determiniert die Glykosylierung Funktion und Wirkung von synthetisierten Proteinen. Hierdurch wird Diversität gewährleistet, welche zur Fortentwicklung im Zuge der Evolution entscheidend ist. Zudem verschafft es auf zellulärer Ebene Flexibilität um sich akuten Bedürfnissen anzupassen. Auch vermutet man, dass Glykosylierung die Stabilität eines Proteins erhöht, welche gerade für die Sekretion nach extrazellulär von Bedeutung ist (Varki and Sharon 2009).

Da Glykokonjugate eine entscheidende Rolle bei Erkennungs-, Proliferations- oder Abwehrprozessen spielen, ist ihr Stellenwert zentraler Gegenstand vieler Forschungsarbeiten.

Um das Zusammenspiel von Proteinen und Glykanen weiter zu verstehen, legt folgende Forschungsarbeit ihr besonderes Augenmerk auf das Polysaccharid Polysialinsäure (PolySia) und widmet sich der Frage nach Vorkommen, Interaktion und Funktion im Kontext immunologischer Fragestellungen.

1.2 Polysialinsäure (PolySia)

PolySia kann als saure Zuckerreste im Zuge der posttranslationalen Modifikation entstehen. Es handelt sich hierbei um ein Homopolymer, bestehend aus mehreren verknüpften Sialinsäuren (Finne 1982). Zu finden sind sie am terminalen Ende von komplexen N-Glykanen sowie O-Glykanen eines Glykoproteins (Colley, et al. 2014).

1.2.1 Struktureller Aufbau

Die Grundstruktur von PolySia wird am häufigsten von der N-Acetylneuraminsäuren (Neu5Ac) gebildet. Zu den seltenen, aber möglichen Einzelbausteinen aus denen PolySia auch gebildet werden kann, gehören die N-Glykolyneuraminsäure (Neu5Gc) und die Deaminoneuraminsäure (KDN). Diese wurden jedoch bisher nur in Seeigeln und Fischen nachgewiesen (Colley, et al. 2014; Mühlhoff, et al. 1998). In Säugern kommen jedoch ausschließlich Polymere aus Neu5Ac vor. Sialinsäuren sind α -Ketosäuren, die sich aus einem C9-Grundgerüst mit einer zusätzlichen Carboxylgruppe an der C1-Position sowie einer Ketogruppe an der C2-Position zusammensetzen (Angata and Varki 2002). Die glykosidische Bindung zwischen den einzelnen Neuraminsäuren erfolgt in Säugern durch eine α 2,8-Verknüpfung. Im Schnitt besitzt eine solche Kette zwischen 8 bis über 200 verknüpften Neu5Ac-Reste (Schauer 2004) (Abbildung 1).

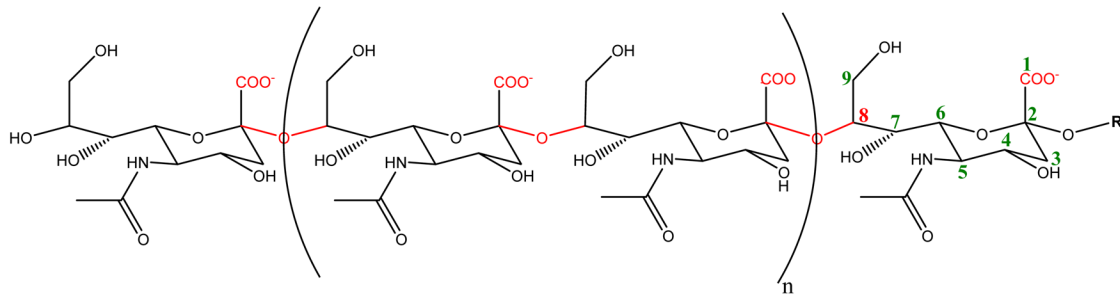


Abbildung 1. Darstellung einer PolySia-Kette. Die Neu5Ac-Reste sind über α 2,8-Verknüpfungen miteinander verbunden (Abbildung aus (Galuska, et al. 2017b); CC-BY).

1.2.2 Biosynthese

In Vertebraten sind die beiden Polysialyltransferasen ST8SialI und ST8SialIV, für die Biosynthese von PolySia-Ketten verantwortlich (Harduin-Lepers, et al. 2001; Kean 1991). Als Bestandteile der Golgi-Apparat assoziierten Transmembranproteine sind sie die einzigen α 2,8-Sialyltransferasen, die in der Lage sind, über das terminale Ende der Sialinsäuren mehr als 8 Sialinsäurereste zu verknüpfen (Angata, et al. 2000), um so bestimmte Proteine zu polysialylieren (Colley, et al. 2014). Dies liegt an der Besonderheit, dass diese beiden Polysialyltransferasen eine sogenannte Polysialyltransferasedomäne (PSTD) besitzen, welche sich durch eine lange Abfolge basischer Aminosäuren an diesem Loci definiert und die entstehende PolySia-Ketten kovalent binden kann (Nakata, et al. 2006).

Ogleich beide Transferasen nur durch Synergie die bestmögliche Polysialylierung von Molekülen erreichen, so können sie auch unabhängig voneinander arbeiten. Zudem sind sie befähigt durch Autopolysialylierung enzymeigener N-Glykane auf die Regulierung ihrer Enzymaktivität einzuwirken (Mühlenhoff, et al. 1996).

1.2.3 Eigenschaften und Funktion: *PolySia auf Zelloberflächen*

Im Zuge der weiteren PolySia-Forschung wurde bis dato an insgesamt neun Trägerproteinen die verhältnismäßig seltene posttranslationale Polysialylierung identifiziert (Galuska, et al. 2017b). Die bekanntesten unter ihnen, die Teile der Zellmatrix bilden, sind zum einen das neurale Adhäsionsmolekül NCAM (Finne 1982). Des Weiteren wurde z.B. das synaptische Zelladhäsionsmolekül SynCAM 1 (Galuska, et al. 2010), der Rezeptor Neuropilin-2 (Curreli, et al. 2007; Werneburg, et al. 2015), welcher auf dendritischen Zellen des Immunsystems zu finden ist, und der dendritische Zellchemokininrezeptor CCR7 (Kiermaier, et al. 2016), beschrieben. Die direkte Funktion variiert in Abhängigkeit der Kettenlänge von PolySia (Galuska, et al. 2015).

Charakteristisch für das PolySia-Molekül sind die deprotonierten und somit negativ geladenen Carboxylgruppen an der C1-Position der Neu5Ac-Untereinheit. Je nach Polysialylierungsgrad kann PolySia so zur größten strukturellen und dominierenden funktionellen Einheit eines Glykoproteins werden (Abbildung 2).

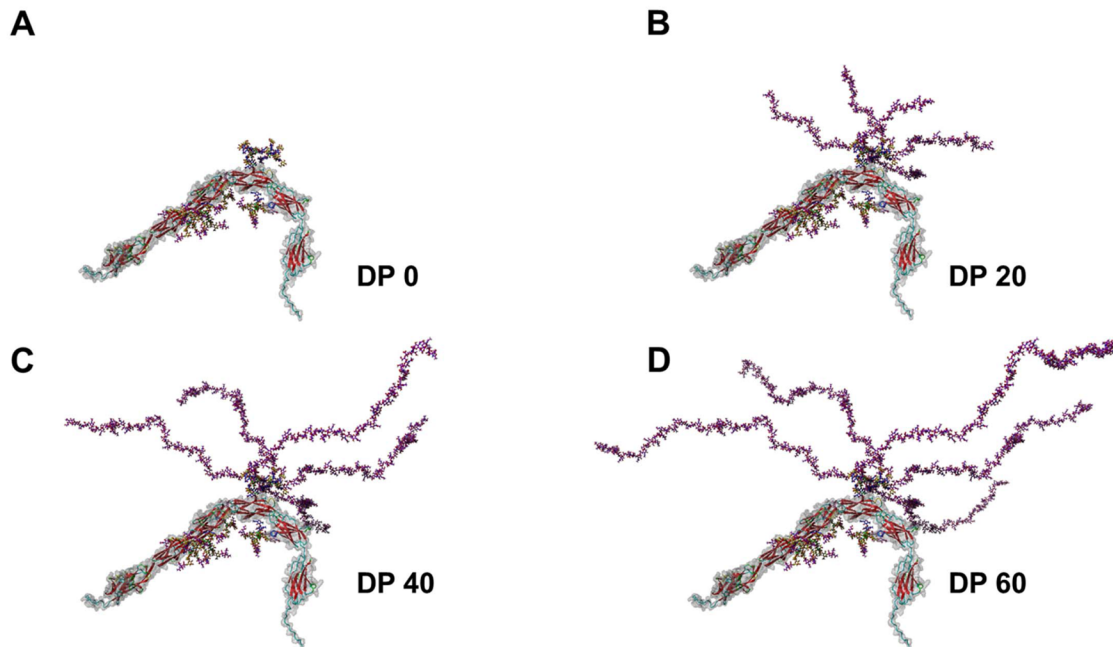


Abbildung 2. Darstellung von NCAM mit unterschiedlich langen PolySia-Ketten. Die 3D-Modelle zeigen NCAM dessen N-Glykane A) unpolysialyliert vorliegen oder B-D) 4 PolySia-Ketten mit unterschiedlichem Polysialylierungsgrad (degree of polymerization, DP) aufweisen (Abbildung aus (Galuska, et al. 2017b), CC-BY).

In direkter Abhängigkeit von der Kettenlänge verursachen sie eine potenziere negative Gesamtladung des Moleküls, wodurch folglich eine Hydrathülle entsteht, die das Protein „voluminöser“ werden lässt (Rutishauser, et al. 1988). Die beschriebenen biochemischen Charakteristika führen zu einer gegenseitigen Abstoßung von polysialylierten Proteinen, wodurch Zelladhäsion und Zell-Zell-Interaktion beeinflusst werden (Fujimoto, et al. 2001).

Über lange Zeit wurde vermutet, dass PolySia vor allem an NCAM gebunden auf Zelloberflächen in Wirbeltieren vorliegt und so je nach Polysialylierungsgrad einen wichtigen Faktor bei Zell-Zell-Interaktionen darstellt. Im Zuge weiterer Studien zeichnet sich auch eine regulatorische Rolle von PolySia in Hinblick auf immunologische Prozesse ab. So ist PolySia beispielsweise auf aktivierten dendritischen Zellen in Zusammenhang mit CCR7 detektiert worden (Kiermaier, et al. 2016). PolySia dient der Erkennung des CCR7-Liganden CCL21, um als regulative Einheit adäquate Zellreaktionen zu beeinflussen. Bei Mäusen mit unzureichender Polysialyltransferase führt der Verlust der Polysialylierung auf der Zelloberfläche zu einer gestörten

lymphatischen Homöostase und Unempfindlichkeit gegenüber entzündlichen Reizen (Kiermaier, et al. 2016).

1.2.4 Eigenschaften und Funktion: *PolySia in Körperflüssigkeiten*

PolySia konnte nicht nur membrangebunden auf Zelloberflächen nachgewiesen werden, sondern auch in löslicher Form. So wurden polysialylierte Proteine beispielsweise in Blut, Milch und Ejakulat gelöst detektiert (Gluer, et al. 1998; Simon, et al. 2013; Szecsi, et al. 1989). Vor circa 15 Jahren wurde das Membranprotein CD-36 als ungebundenes, polysialyliertes O-Glykan in der menschlichen Muttermilch entdeckt (Yabe, et al. 2003). Da die biochemische Synthese von PolySia ein hohes Maß an Energie bedarf, stellt sich die entscheidende Frage nach der Aufgabe und Wirkung von PolySia in diesen körpereigenen Substraten. Es wird vermutet, dass PolySia hier vor allem eine immunmodulatorische Rolle spielt und reversible Bindungen eingehen kann.

Die Körperflüssigkeiten wie Muttermilch und Ejakulat sind physiologische Substrate, die darauf ausgelegt sind, in fremde Organismen aufgenommen zu werden. Sie beinhalten u.a. Proteine, welche vom Gegenüber als fremd erkannt und von dessen Immunsystem attackiert werden könnten. Medizinisch schwerwiegende allergische Reaktionen wären die Folge. Aber auch pathogene Erreger können sich in den Flüssigkeiten befinden, die es wiederum schnell zu detektieren und zu bekämpfen gilt. Folgerichtig wäre eine Art Vermittler für das Immunsystem wichtig, der Immunkomponenten vor Ort organisiert und reguliert.

1.3 Das angeborene Immunsystem

In der Medizin wird das Immunsystem in zwei Komponenten eingeteilt. Es wird ein angeborenes von einem erworbenen Immunsystem unterschieden (Nicholson 2016).

Das sogenannte angeborene Immunsystem ist ein ab der Geburt vorhandener Komplex aus physikalischen, chemischen, zellulären und humoralen Abwehrmechanismen, welches ohne eine Form der Aktivierung durch Prägung oder Adaptation an spezifische Antigene, funktionsfähig ist. Die erste mechanische und chemische Barriere wird durch das Vorhandensein der intakten äußeren Haut und der Schleimhäute gebildet. Durch die Ziliarfunktion des Trachealepithels gepaart mit dem Hustenreflex, durch das saure Milieu mit niedrigem pH in Magen und vaginaler Flora, sowie durch die Symbiose mit anderen Mikroorganismen, wie sie im Darmtrakt zu finden sind, wird Krankheitserregern die Ausbreitung und die Vermehrung im Organismus erschwert. Schleimhäute sind außerdem in der Lage sogenannten Mukus zu produzieren, der Substanzen wie Mucine,

Lysozym und Lactoferrin enthält. Diese Stoffe besitzen die Fähigkeit enzymatisch bakterielle Zellwände zu zerstören (Nicholson 2016; Telang 2018).

So bildet das angeborene Immunsystem die erste Kaskade einer Entzündungsreaktion. Es arbeitet ohne immunologisches Gedächtnis, primär Entzündungsreiz orientiert und aggressiv. Vor allem bei Neugeborenen übernimmt es zu Beginn der Lebenszeit die Hauptaufgabe der Abwehrleistung, wobei hier Lactoferrin als wichtiger Teil der Muttermilch eine besondere Rolle einnimmt (Kimbrell and Beutler 2001).

1.3.1 Lactoferrin

Ein wichtiger molekularer Bestandteil des angeborenen Immunsystems sind multifunktionale Proteine wie beispielweise Lactoferrin.

Lactoferrin ist ein Glykoprotein aus der Familie der Transferrin-Proteine. Humanes Lactoferrin besitzt eine molekulare Größe von 78 kDa und besteht aus 691 Aminosäuren (Rosa, et al. 2017). Es wird vor allem von den Epithelzellen der Schleimhautoberfläche ausgeschieden und von exokrinen Drüsen sezerniert, sodass es unter anderem in Tränenflüssigkeit, Speichel, Schweiß (Park, et al. 2011; Rosa, et al. 2017) sowie Vaginalflüssigkeit, Ejakulat, Galle, Urin und Bronchialsekret gefunden werden kann (Masson, et al. 1965; Masson, et al. 1968). Außerdem ist es in den Granula der Neutrophilen Granulozyten, die es durch Degranulation abgeben können, gespeichert. Die wohl höchste Konzentration an sezerniertem Lactoferrin kommt in der humanen Muttermilch, dem Kolostrum, vor (Alexander, et al. 2012).

Neben vielen Funktionen, die Lactoferrin im Organismus erfüllt, ist wohl die Hauptfunktion der Kampf gegen die Invasion von Krankheitserregern, wie Bakterien, Viren, Pilze und Parasiten. Lange Zeit wurde davon ausgegangen, dass die eisenbindende Eigenschaft von Lactoferrin hauptverantwortlich für seine antimikrobielle Wirkung ist. Bakterien benötigen Eisen zum Wachsen. Wird Ihnen dieses Element in ihrer unmittelbaren Umgebung streitig gemacht, so sistiert ihr Replikationsvermögen (Gifford, et al. 2005).

Doch intensive Forschungsarbeiten zeigten, dass Lactoferrin ein multifunktionales Glykoprotein darstellt, welches durch viele andere Mechanismen seine antiinfektiöse und entzündungshemmende Funktion unterstreicht. In Zusammenarbeit mit den zellulären Komponenten des angeborenen Immunsystems wirkt es auch inflammationsfördernden Prozessen entgegen (Valenti and Antonini 2005).

Eine wichtige Rolle scheint hierbei eine Region des Lactoferrins einzunehmen, welche nach proteolytischer Spaltung entsteht und als das antimikrobielle Peptid namens Lactoferricin freigesetzt wird (Bellamy, et al. 1992; Kuwata, et al. 1998).

In Studien konnte gezeigt werden, dass Lactoferricin jedoch nicht ein einfaches Abspaltungsprodukt von Lactoferrin ist, sondern zu einem großen Anteil die funktionellen Domäne des Proteins Lactoferrin weiterträgt und zudem weitaus aktiver als Lactoferrin zu agieren scheint (Gifford, et al. 2005).

1.3.2 NETose

Den zellulären Anteil des angeborenen Immunsystems bilden die sogenannten Leukozyten. Sie werden in mehrere Zelllinien unterteilt. Eine Untergruppe stellen die Granulozyten dar, zu denen wiederum die neutrophilen Granulozyten zählen.

Obgleich sie in der Blutbahn zirkulieren, können sie Chemokin vermittelt ins entzündliche Gewebe abwandern (Kolaczkowska and Kubes 2013).

Beim Eindringen von Mikroorganismen fungieren sie als erste Verteidigungslinie. Dabei können sie über zwei Mechanismen eindringende Krankheitserreger bekämpfen: Entweder werden durch Freisetzen von antimikrobiellen Peptiden, lytischen Enzymen, beziehungsweise durch die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies pathogene Keime attackiert, sowie anschließend durch Phagozytose gänzlich beseitigt (Nathan 2006), oder sie produzieren Histon-beladene „Fangnetze“, sogenannte NETs (*neutrophile extracellular traps*), um Eindringlinge unschädlich zu machen.

NETs bestehen primär aus der DNA neutrophiler Granulozyten und umschließen als extrazelluläre Fasern in Kombination mit antimikrobiellen Proteinen, den Histonen, pathogene Mikroorganismen.

Histone sind basische Proteine, welche im eukaryotrischen Zellkern vorkommen und als Bestandteil des Chromatins zur Kondensierung der DNA-Stränge dienen. Die DNA-Helix liegt in Form von Chromosomen paarweise im Zellkern vor. Ihre kleinste Verpackungseinheit werden Nukleosomen genannt. Diese bestehen aus dem DNA-Strang sowie 8 Histonen, um die sich die DNA wickelt (Bartova, et al. 2008). Doch nicht nur für diese intrazelluläre Rolle sind Histone bekannt. Sie determinieren als zytotoxische Komponente in extrazellulärer Form die sogenannte NETose.

Die Induktion der NETs-Bildung wird durch Entzündungsreize vermittelt, wodurch es zur Dekondensation der intrazellulär befindlichen DNA kommt (Abbildung 3).

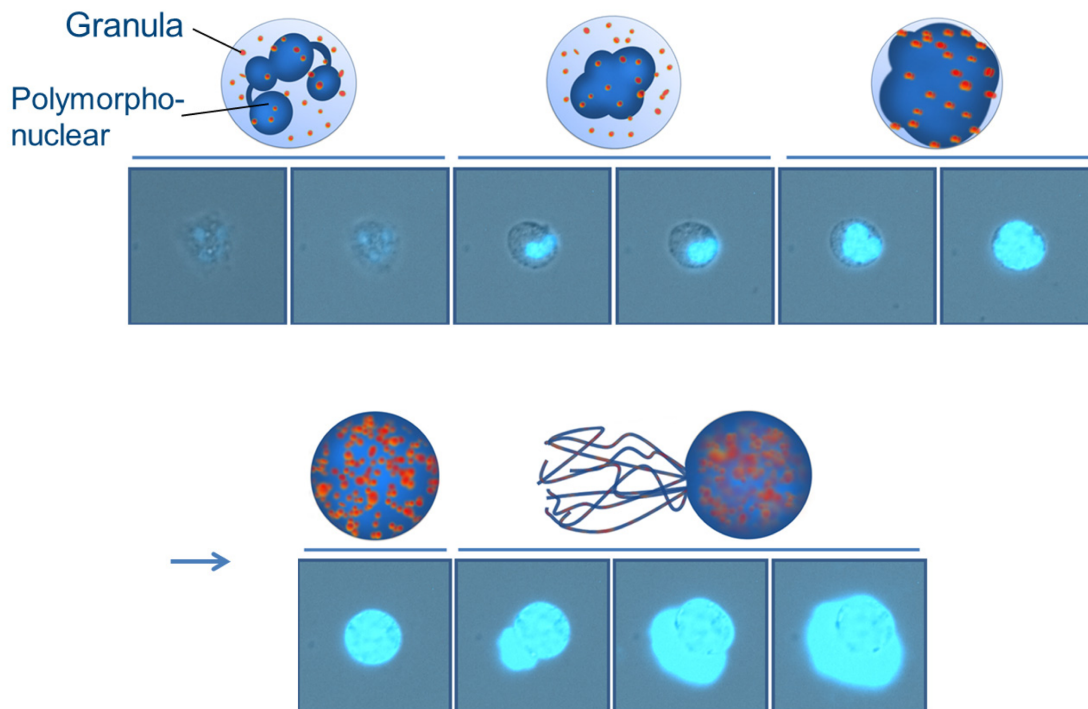


Abbildung 3. Ablauf der NETose. Die Abbildung zeigt den Verlauf der Bildung von NETs. Die DNA wurde mit DAPI visualisiert (blau) (Abbildung aus (Kühnle, et al. 2019b); CC-BY).

Sie verändert ihre Struktur und fusioniert zudem mit antimikrobiellen Komponenten wie Elastase und Lactoferrin, die in intrazellulär Granulaten gespeichert vorliegen (Fuchs, et al. 2007; Saffarzadeh, et al. 2012). Nach dieser Vermischung von zerfallenen Kernbestandteilen mit zytoplasmatischen Komponenten zerreißt die Plasmamembran, sodass NETs aus der Zelle explosionsartig freigesetzt werden. Vor allem durch die bakterizide Wirkung der Histone, welche weiterhin an die DNA-Stränge gekoppelt sind, werden Bakterien und auch Pilze, die sich bildlich gesprochen in diesem Netz verfangen, abgetötet (Baxevanis and Ouellette 2005; Brinkmann, et al. 2004; Fuchs, et al. 2007). Doch nicht nur pathogene Strukturen werden von NETs erreicht, sondern auch das umliegende möglicherweise gesunde Gewebe wird aufgrund einer überschießenden Aktivierung der neutrophilen Granulozyten durch die erhöhten Mengen an NETs dem schädlichen Effekt ausgesetzt (Bornhöfft and Galuska 2019; Saffarzadeh and Preissner 2013). Die hohe Konzentration der extrazellulären Histone sind für die körpereigenen Zellen giftig und können ohne regulatorische Gegenkomponente Autoimmunerkrankungen auslösen, oder auch Sepsis, Thrombosen und Unfruchtbarkeit begünstigen (Camicia, et al. 2014; Hashiba, et al. 2015; Ma and Kubes 2008). Es scheint

aus diesem Grund notwendig eine übermäßige NETs-Wirkung zu begrenzen, was unter anderem bedeutet die Zytotoxizität der extrazellulären Histone herab zu regulieren.

PolySia kann als regulatorischer Gegenpart zur Neutralisierung der Histon-Zytotoxizität, abhängig von der Kettenlänge der PolySia-Stränge, beitragen (Zlatina, et al. 2018). Neutrophile Granulozyten interagieren als zellulärer Bestandteil des angeborenen Immunsystems mit PolySia bei der NETose (Brinkmann, et al. 2004; Ermert, et al. 2009). Da NETose vor allem im Blutkreislauf stattfindet und PolySia in humanen Plasmaproben nachweisbar ist, konnte bestätigt werden, dass PolySia die negativen Ergebnisse von NETs reduziert und ab einer Kettenlänge von mehr als 40 Sialinsäureresten zytoprotektiv wirkt (Galuska, et al. 2017a; Galuska, et al. 2017c).

1.4 Ziel der Arbeit

Da PolySia in zahlreichen Körperflüssigkeiten nachgewiesen werden konnte, in denen es ebenfalls zur NETose kommt, sollte untersucht werden, ob PolySia alleine oder zusammen mit Interaktionspartnern eine Aktivierung von Neutrophilen moduliert.

Hierfür sollte PolySia zunächst samt potentiellen Interaktionspartnern aus humaner Muttermilch isoliert werden und mittels tryptischen In-Gelverdau und anschließender Analyse des Peptidfingerabdrucks eine Identifizierung der Bindungspartner erfolgen. Die Datenbankzuweisung dieser Partner sollte zudem durch Western Blots überprüft werden. Darüber hinaus war von Interesse, in welchen Körperflüssigkeiten PolySia mit diesen Interaktionspartnern interagiert und welchen Einfluss PolySia alleine und auf die Funktion seines Interaktionspartners während der NETose hat.

Somit war das übergeordnete Ziel der Arbeit neue PolySia-basierende Strategien zu ermitteln, welche die NETose beeinflussen.

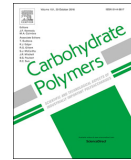
2 Publikation

Carbohydrate Polymers 208 (2019) 32–41



Contents lists available at ScienceDirect

Carbohydrate Polymers

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

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



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

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

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

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

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

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

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

ARTICLE INFO

Keywords:

Polysialic acid
Lactoferrin
Neutrophil extracellular trap
Innate immune system

ABSTRACT

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

1. Introduction

Polysialic acid (polySia) is a negatively charged polysaccharide that can be generated by two polysialyltransferases (ST8SialI and ST8SialIV) on distinct proteins in mammals (Colley, Kitajima, & Sato, 2014; Harduin-Lepers et al., 2008). The best studied and main polySia carrier is the neural cell adhesion molecule (NCAM) (Colley, 2010; Colley et al., 2014; Hildebrandt, Mühlenhoff, & Gerardy-Schahn, 2010). Many studies have demonstrated that polySia is involved in the development of the brain and may also contribute to the formation of other organs, such as the liver, the heart, and the reproductive tract (reviewed in (Galuska, Lutteke, & Galuska, 2017; Schnaar, Gerardy-Schahn, & Hildebrandt, 2014)). During organogenesis, polySia modulates several migration and differentiation processes on the cellular surface due to its anti-adhesive properties (Colley et al., 2014; Hildebrandt et al., 2010; Mühlenhoff, Rollenhagen, Werneburg, Gerardy-Schahn, & Hildebrandt,

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

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

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

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

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

¹ Contributed equally.

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

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

Available online 12 December 2018

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

A. Kühnle et al.

Carbohydrate Polymers 208 (2019) 32–41

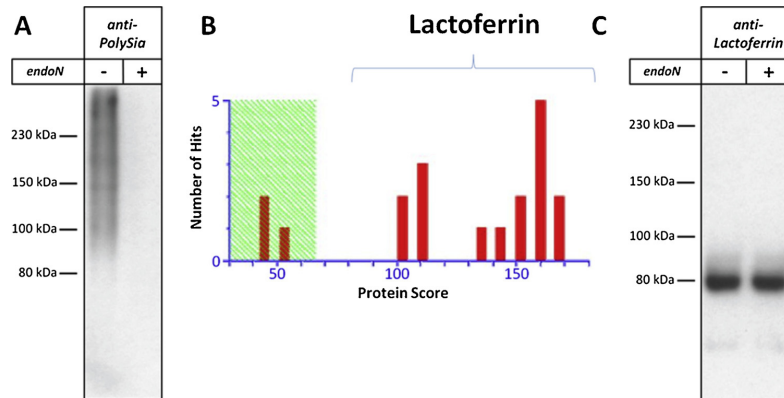


Fig. 1. Lactoferrin is co-precipitated with polySia. Using affinity precipitation (AP), polySia chains and putative carrier-/interacting proteins were isolated using human milk samples. (A) Purified samples were separated by SDS-PAGE for western blotting with or without endoN pre-treatment. Immunostaining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

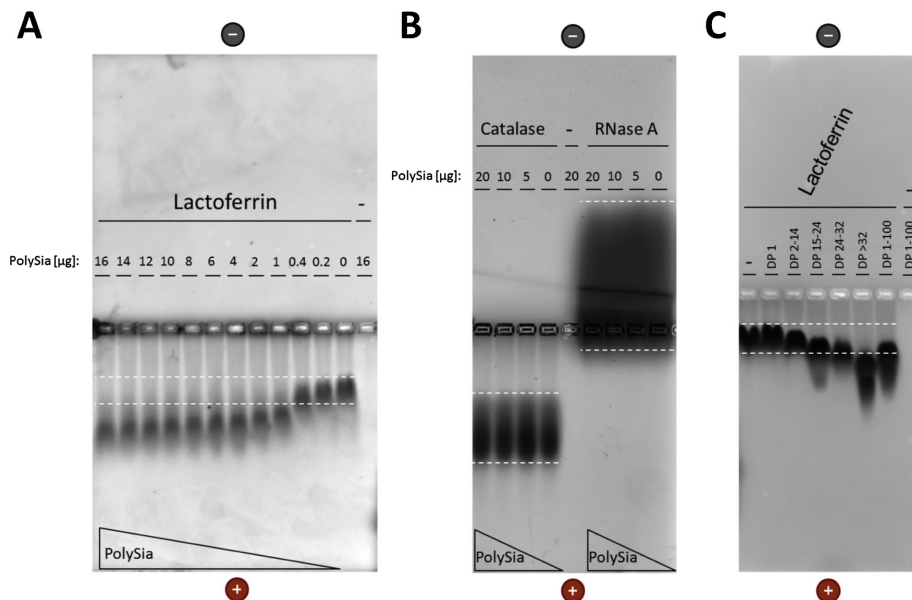


Fig. 2. The interaction between polySia and lactoferrin depends on the degree of polymerization. The interaction of polySia with (A) lactoferrin (8 μ g/line) and (B) control proteins catalase and RNase A (10 μ g/line) was analyzed using a native agarose gel system. Proteins were incubated with different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

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

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

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

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

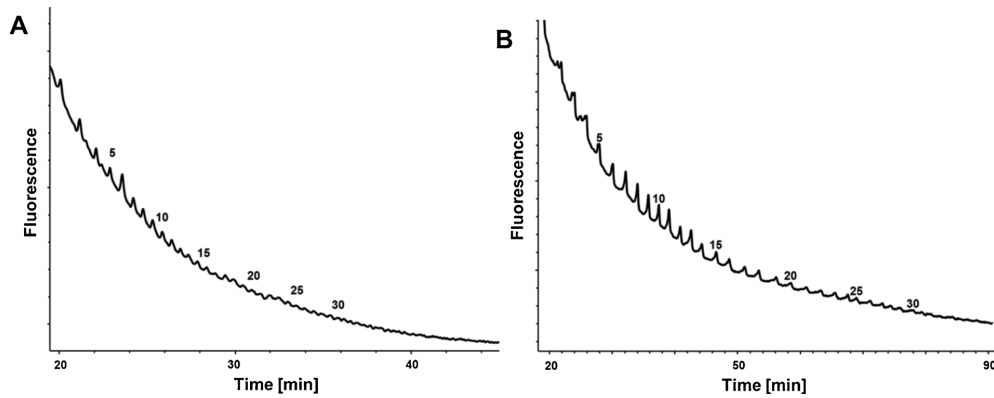


Fig. 3. PolySia can consist of more than 30 sialic acid residues in human milk and serum. PolySia from human milk and serum was isolated by AP using inactive endoN coupled to magnetic beads. The polySia fraction was used for “mild” DMB labeling. Resulting fluorescently labelled sialic acid polymers of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

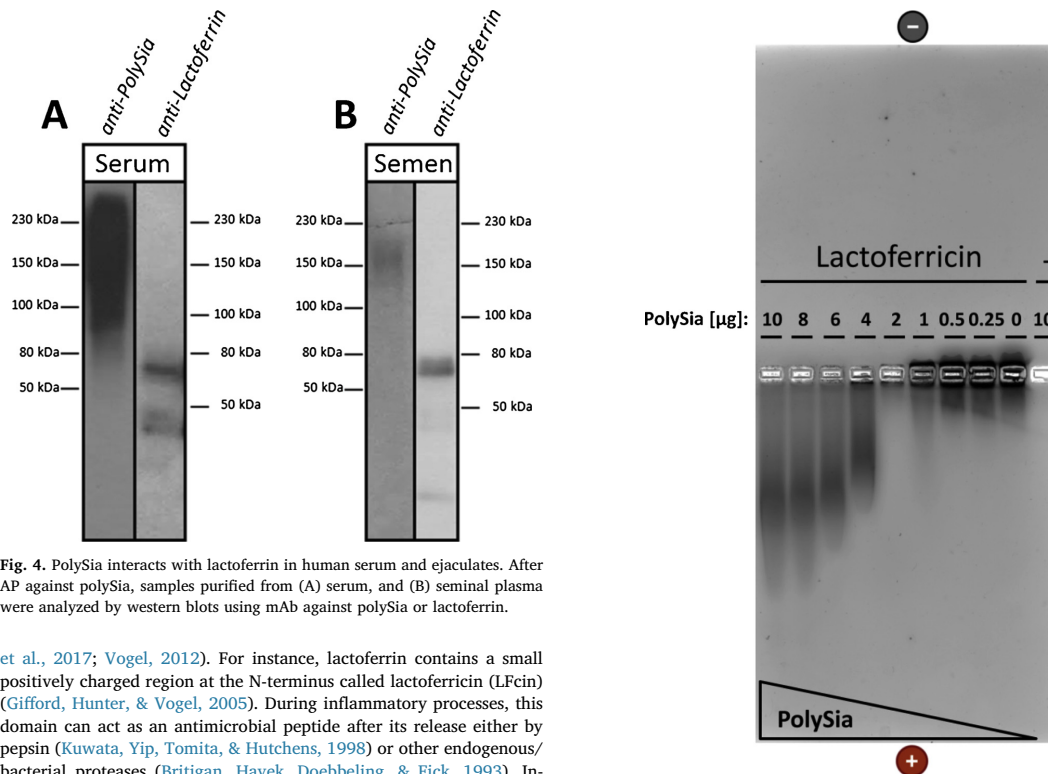


Fig. 4. PolySia interacts with lactoferrin in human serum and ejaculates. After AP against polySia, samples purified from (A) serum, and (B) seminal plasma were analyzed by western blots using mAb against polySia or lactoferrin.

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

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

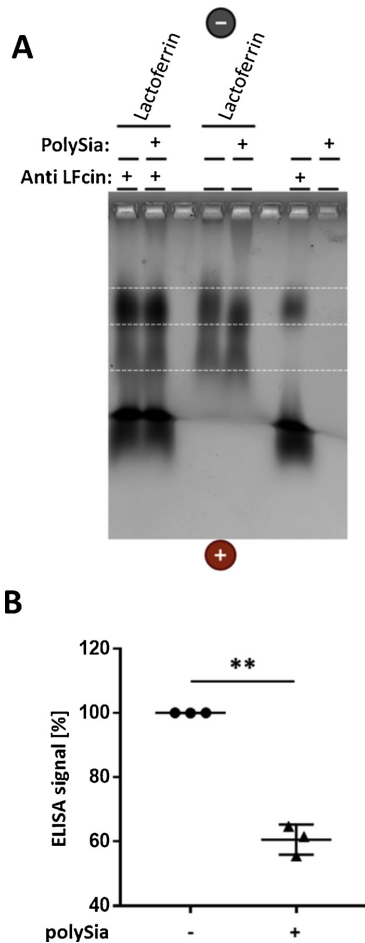


Fig. 6. PolySia binds LfCin domain of lactoferrin. A) The interaction of polySia with lactoferrin was tested in the presence of an antibody against LfCin. Different sample settings were loaded and separated by electrophoresis: lactoferrin 5 $\mu\text{g}/\text{lane}$; antibody 1 $\mu\text{g}/\text{lane}$;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

2. Material and methods

2.1. Materials

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

2.2. Human milk, semen and blood samples

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

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

2.3. Isolation of polySia and western blotting

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

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

2.4. Glycoproteomics approach

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

2.5. Native agarose gel electrophoresis

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

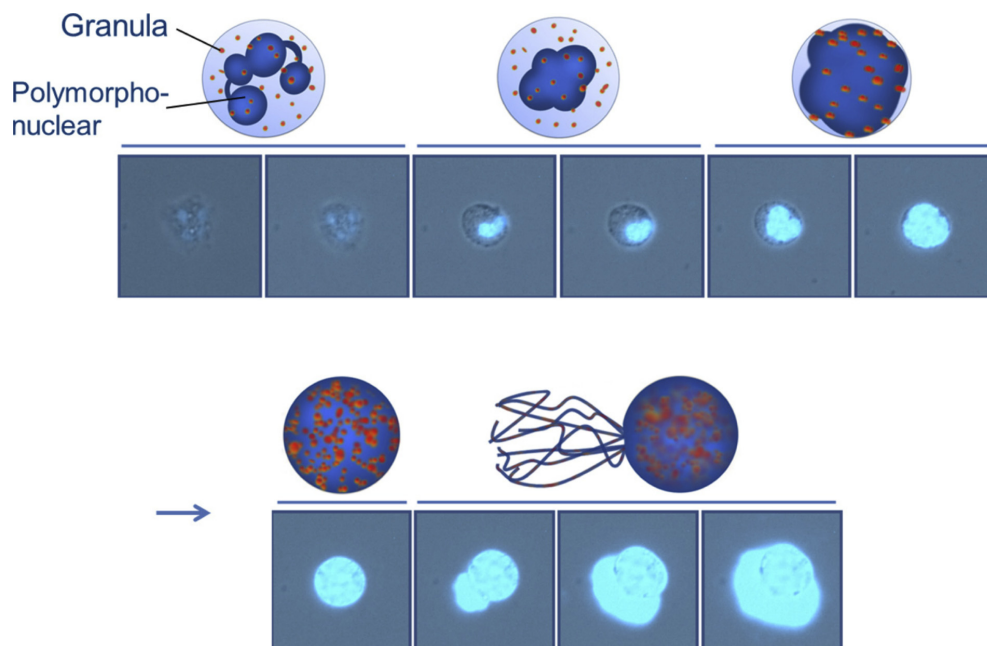


Fig. 7. Visualization of NET formation. The schematic and observed formation of NET is displayed. An important part of the visualized process is a reconstruction of the DNA, which will, inter alia, be decondensed. During a late process, the nucleus membrane disintegrates. As a consequence, antimicrobial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

2.6. Competitive ELISA

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

2.7. HPLC analysis

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

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

2.8. NETose - live cell imaging microscopy

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

2.9. NETose - fluorescence detection of neutrophils

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

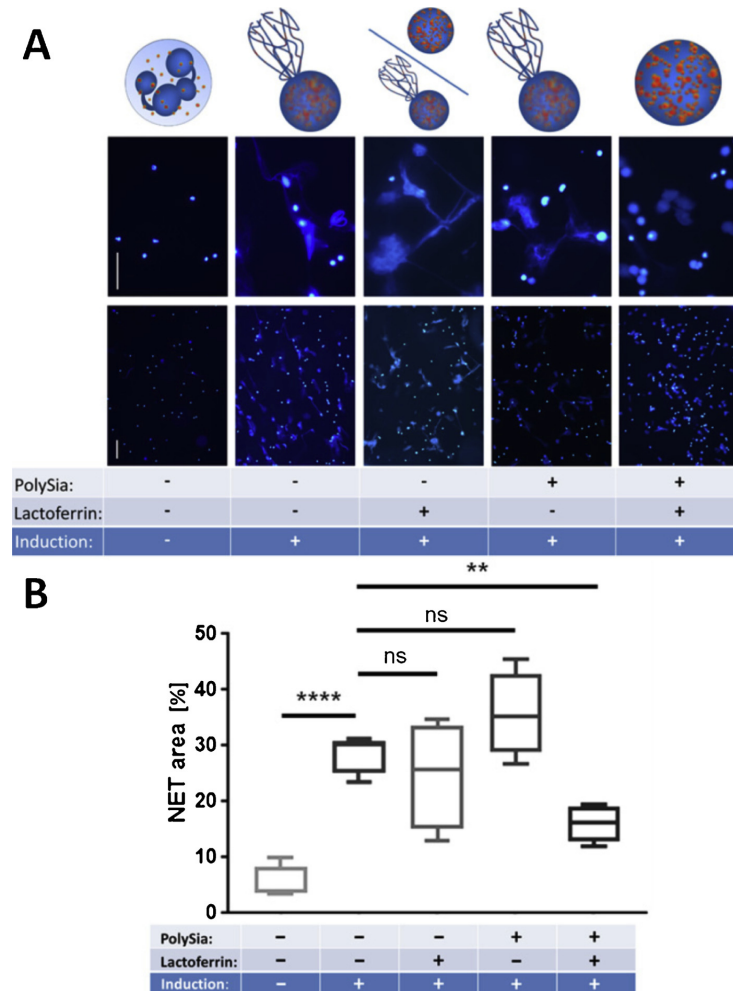


Fig. 8. PolySia supports the inhibition capacity of lactoferrin for the release of NET fibers. Neutrophils were stimulated using PMA. In a parallel test-setting, lactoferrin and/or polySia was added. Neutrophils and NETs were monitored by fluorescence microscopy (A). The DNA fibers were stained with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

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

2.10. Quantification of NETosis area and statistical analyses

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

2.11. Statistical analysis

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

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

3. Results and discussion

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

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

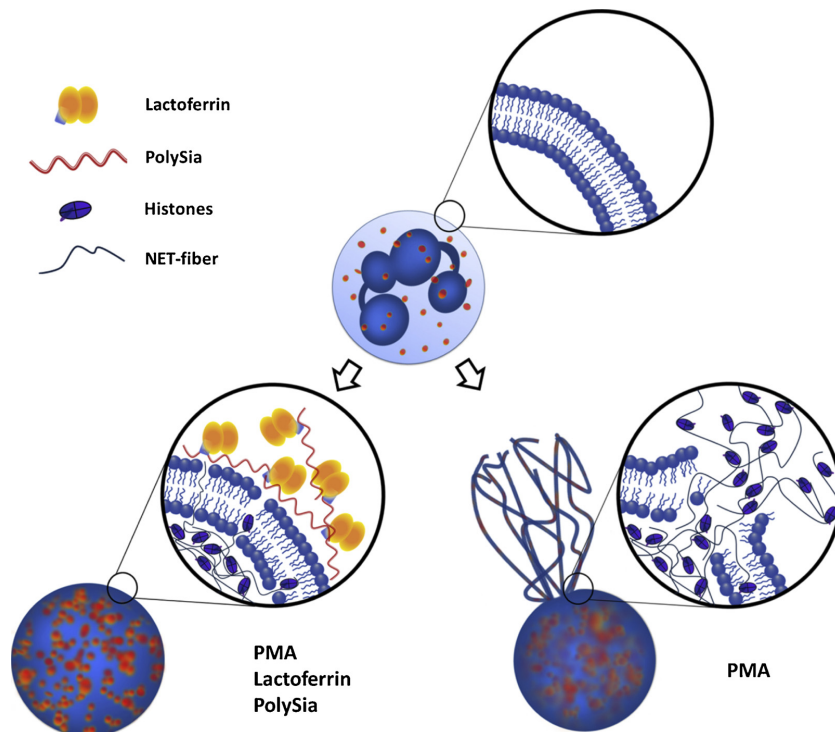


Fig. 9. Proposed working model. Before stimulation, the lipid bilayer is completely intact. After stimulation, the whole cell is filled with chromatin fibers. With the addition of lactoferrin (LFcin domain in blue) and polySia, the complex of both molecules stabilizes the cell membrane integrity. Otherwise,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

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

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

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

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

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

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

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

3.3. Lactoferrin also interacts with polySia in blood and ejaculates

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

4. Conclusion

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

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

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

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

Declarations of interests

None.

Acknowledgments

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

Appendix A. Supplementary data

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

References

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

- Biochimica Et Biophysica Acta*, 257(2) 314–8.
- Bathina, S., & Das, U. N. (2015). Brain-derived neurotrophic factor and its clinical implications. *Archives of Medical Science*, 11(6), 1164–1178.
- Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D. S., ... Zychlinsky, A. (2004). Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*, 303(5663), 1532–1535.
- Brinkmann, V., & Zychlinsky, A. (2007). Beneficial suicide: Why neutrophils die to make NETs. *Nature Reviews Microbiology*, 5(8), 577–582.
- Brinkmann, V., & Zychlinsky, A. (2012). Neutrophil extracellular traps: Is immunity the second function of chromatin? *Journal of Cell Biology*, 198(5), 773–783.
- Britigan, B. E., Hayek, M. B., Doebbeling, B. N., & Fick, R. B., Jr. (1993). Transferrin and lactoferrin undergo proteolytic cleavage in the *Pseudomonas aeruginosa*-infected lungs of patients with cystic fibrosis. *Infection and Immunity*, 61(12), 5049–5055.
- Britigan, B. E., Lewis, T. S., Waldschmidt, M., McCormick, M. L., & Krieg, A. M. (2001). Lactoferrin binds CpG-containing oligonucleotides and inhibits their immunostimulatory effects on human B cells. *Journal of Immunology*, 167(5), 2921–2928.
- Bullen, J. J., Rogers, H. J., & Leigh, L. (1972). Iron-binding proteins in milk and resistance to *Escherichia coli* infection in infants. *British Medical Journal*, 1(5792) 69–71.
- Camicia, G., Pozner, R., & de Larranaga, G. (2014). Neutrophil extracellular traps in sepsis. *Shock*, 42(4), 286–294.
- Chen, Y., Zheng, Z., Zhu, X., Shi, Y., Tian, D., Zhao, F., & Wang, B. (2015). Lactoferrin Promotes Early Neurodevelopment and Cognition in Postnatal Piglets by Upregulating the BDNF Signaling Pathway and Polysialylation. *Mol. Neurobiol.* 52(1), 256–269.
- Colley, K. J. (2010). Structural basis for the polysialylation of the neural cell adhesion molecule. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 663, 111–126.
- Colley, K. J., Kitajima, K., & Sato, C. (2014). Polysialic acid: Biosynthesis, novel functions and applications. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 49(6), 498–532.
- Fuchs, T. A., Abed, U., Goosmann, C., Hurwitz, R., Schulze, I., Wahn, V., ... Zychlinsky, A. (2007). Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *Journal of Cell Biology*, 176(2), 231–241.
- Galuska, S. P., Rollenhagen, M., Kaup, M., Eggers, K., Oltmann-Norden, I., Schiff, M., & Geyer, H. (2010). Synaptic cell adhesion molecule SynCAM 1 is a target for polysialylation in postnatal mouse brain Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 107(7) Synaptic cell adhesion molecule SynCAM 1 is a target for polysialylation in postnatal mouse brain Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 107: 22, (pp. 10250–10255).
- Galuska, C. E., Dambon, J. A., Kühnle, A., Bornhoff, K. F., Prem, G., Zlatina, K., ... Galuska, S. P. (2017). Artificial polysialic acid chains as sialidase-resistant molecular anchors to accumulate particles on neutrophil extracellular traps. *Frontiers in Immunology*, 8, 1229.
- Galuska, S. P., Galuska, C. E., Tharmalingam, T., Zlatina, K., Prem, G., Husejnov, F. C. O., ... Carrington, S. D. (2017). In vitro generation of polysialylated cervical mucus by bacterial polysialyltransferases to counteract cytotoxicity of extracellular histones. *FEBS Journal*, 284(11), 1688–1699.
- Galuska, C. E., Lutteke, T., & Galuska, S. P. (2017). Is polysialylated NCAM not only a regulator during brain development but also during the formation of other organs? *Biology (Basel)*, 6(2).
- Gifford, J. L., Hunter, H. N., & Vogel, H. J. (2005). Lactoferricin: A lactoferrin-derived peptide with antimicrobial, antiviral, antitumor and immunological properties. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62(22), 2588–2598.
- Gluer, S., Wunder, M. A., Schelp, C., Radtke, E., & Gerardy-Schahn, R. (1998). Polysialylated neural cell adhesion molecule serum levels in normal children. *Pediatric Research*, 44(6), 915–919.
- Hänsch, M., Simon, P., Schön, J., Kaese, M., Braun, B. C., Jewgenow, K., ... Galuska, S. P. (2014). Polysialylation of NCAM correlates with onset and termination of seasonal spermatogenesis in roe deer. *Glycobiology*, 24(6), 488–493.
- Harduin-Lepers, A., Petit, D., Mollicone, R., Delannoy, P., Petit, J. M., & Oriol, R. (2008). Evolutionary history of the alpha2,8-sialyltransferase (ST8Sia) gene family: Tandem duplications in early deuterostomes explain most of the diversity found in the vertebrate ST8Sia genes. *BMC Evolutionary Biology*, 8, 258.
- Haselhorst, T., Stummeyer, K., Mühlhoff, M., Schaper, W., Gerardy-Schahn, R., & von Itzstein, M. (2006). Endosialidase NF appears to bind polySia DP5 in a helical conformation. *Chembiochem*, 7(12), 1875–1877.
- Hashiba, M., Huq, A., Tomino, A., Hirakawa, A., Hattori, T., Miyabe, H., ... Takeyama, N. (2015). Neutrophil extracellular traps in patients with sepsis. *Journal of Surgical Research*, 194(1), 248–254.
- Hildebrandt, H., Mühlhoff, M., & Gerardy-Schahn, R. (2010). Polysialylation of NCAM. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 663, 95–109.
- Inoue, S., & Inoue, Y. (2001). Developmental profile of neural cell adhesion molecule glycoforms with a varying degree of polymerization of polysialic acid chains. *Journal of Biological Chemistry*, 276(34), 31863–31870.
- Inoue, S., & Inoue, Y. (2003). Ultrasensitive analysis of sialic acids and oligo/polysialic acids by fluorometric high-performance liquid chromatography. *Methods in Enzymology*, 362, 543–560.
- Kamemori, N., Takeuchi, T., Sugiyama, A., Miyabayashi, M., Kitagawa, H., Shimizu, H., ... Harada, E. (2008). Trans-endothelial and trans-epithelial transfer of lactoferrin into the brain through BBB and BCSFB in adult rats. *Journal of Veterinary Medical Science*, 70(3), 313–315.
- Kanato, Y., Kitajima, K., & Sato, C. (2008). Direct binding of polysialic acid to a brain-derived neurotrophic factor depends on the degree of polymerization. *Glycobiology*, 18(12), 1044–1053.
- Kim, R., Yokota, H., & Kim, S. H. (2000). Electrophoresis of proteins and protein-protein complexes in a native agarose gel. *Analytical Biochemistry*, 282(1), 147–149.

- Knight, J. S., & Kaplan, M. J. (2012). Lupus neutrophils: NET⁺ gain in understanding lupus pathogenesis. *Current Opinion in Rheumatology*.
- Kuwata, H., Yip, T. T., Tomita, M., & Hutchens, T. W. (1998). Direct evidence of the generation in human stomach of an antimicrobial peptide domain (lactoferricin) from ingested lactoferrin. *Biochimica Et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1429(1), 129–141.
- Legrand, D. (2016). Overview of lactoferrin as a natural immune modulator. *Journal of Pediatrics*, 173, S10–S15.
- Legrand, D., Ellass, E., Carpentier, M., & Mazurier, J. (2005). Lactoferrin: A modulator of immune and inflammatory responses. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62(22), 2549–2559.
- Lenman, A., Liaci, A. M., Liu, Y., Frangmyr, L., Frank, M., Blaum, B. S., ... Arnberg, N. (2018). Polysialic acid is a cellular receptor for human adenovirus 52. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(18), E4264–E4273.
- Levay, P. F., & Viljoen, M. (1995). Lactoferrin: A general review. *Haematologica*, 80(3), 252–267.
- Lonnerdal, B. (2009). Nutritional roles of lactoferrin. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, 12(3), 293–297.
- Ma, A. C., & Kubes, P. (2008). Platelets, neutrophils, and neutrophil extracellular traps (NETs) in sepsis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 6(3), 415–420.
- Metzboutigue, M. H., Jolles, J., Mazurier, J., Schoentgen, F., Legrand, D., Spik, G., ... Jolles, P. (1984). Human lactotransferrin - amino-acid sequence and structural comparisons with other transferrins. *European Journal of Biochemistry*, 145(3), 659–676.
- Mühlenhoff, M., Rollenhagen, M., Werneburg, S., Gerardy-Schahn, R., & Hildebrandt, H. (2013). Polysialic acid: versatile modification of NCAM, SynCAM 1 and neuropilin-2. *Neurochemical Research*, 38(6), 1134–1143.
- N'Soukpoe-Kossi, C. N., Ragi, C., & Tajmir-Riahi, H. A. (2007). DNA interaction with RNase A alters protein conformation. *DNA and Cell Biology*, 26(1), 28–35.
- Nagae, M., Ikeda, A., Hane, M., Hanashima, S., Kitajima, K., Sato, C., ... Yamaguchi, Y. (2013). Crystal structure of anti-polysialic acid antibody single chain Fv fragment complexed with octasialic acid: Insight into the binding preference for polysialic acid. *Journal of Biological Chemistry*, 288(47), 33784–33796.
- Nazir, S., Nasir, M., Yasmeen, A., & Usman, S. (2017). Review study on lactoferrin: A multifunctional protein. *Sky Journal of Food Science*, 6(2), 014–020.
- Okubo, K., Kamiya, M., Urano, Y., Nishi, H., Herter, J. M., Mayadas, T., ... Hirahashi, J. (2016). Lactoferrin suppresses neutrophil extracellular traps release in inflammation. *EBioMedicine*, 10, 204–215.
- Phillipson, M., & Kubes, P. (2011). The neutrophil in vascular inflammation. *Nature Medicine*, 17(11), 1381–1390.
- Rutishauser, U. (2008). Polysialic acid in the plasticity of the developing and adult vertebrate nervous system. *Nature Reviews Neuroscience*, 9(1), 26–35.
- Saffarzadeh, M., & Preissner, K. T. (2013). Fighting against the dark side of neutrophil extracellular traps in disease: Manoeuvres for host protection. *Current Opinion in Hematology*, 20(1), 3–9.
- Saffarzadeh, M., Juenemann, C., Queisser, M. A., Lochnit, G., Barreto, G., Galuska, S. P., ... Preissner, K. T. (2012). Neutrophil extracellular traps directly induce epithelial and endothelial cell death: A predominant role of histones. *PLoS One*, 7(2), e32366.
- Sato, C., & Kitajima, K. (2013). Disialic, oligosialic and polysialic acids: Distribution, functions and related disease. *Journal of Biochemistry*, 154(2), 115–136.
- Schnaar, R. L., Gerardy-Schahn, R., & Hildebrandt, H. (2014). Sialic acids in the brain: Gangliosides and polysialic acid in nervous system development, stability, disease, and regeneration. *Physiological Reviews*, 94(2), 461–518.
- Shimazaki, K., Nam, M. S., Harakawa, S., Tanaka, T., Omata, Y., Saito, A., ... Suzuki, N. (1996). Monoclonal antibody against bovine lactoferrin(R) and its epitopic site. *Journal of Veterinary Medical Science*, 58(12), 1227–1229.
- Simon, P., Bäumner, S., Busch, O., Röhrich, R., Kaese, M., Richterich, P., ... Galuska, S. P. (2013). Polysialic acid is present in mammalian semen as a post-translational modification of the neural cell adhesion molecule NCAM and the polysialyltransferase ST8SialII. *Journal of Biological Chemistry*, 288(26), 18825–18833.
- Simon, P., Feuerstacke, C., Kaese, M., Saboor, F., Middendorff, R., & Galuska, S. P. (2015). Polysialylation of NCAM characterizes the proliferation period of contractile elements during postnatal development of the epididymis. *PLoS One*, 10(3), e0123960.
- Stummeyer, K., Dickmanns, A., Mühlenhoff, M., Gerardy-Schahn, R., & Ficner, R. (2005). Crystal structure of the polysialic acid-degrading endosialidase of bacteriophage K1F. *Nature Structural and Molecular Biology*, 12(1), 90–96.
- Szecs, P. B., Dalgaard, D., Stakemann, G., Wagner, G., & Foltmann, B. (1989). The concentration of pepsinogen C in human semen and the physiological activation of zymogen in the vagina. *Biology of Reproduction*, 40(3), 653–659.
- Ulm, C., Saffarzadeh, M., Mahavadi, P., Müller, S., Prem, G., Saboor, F., ... Galuska, S. P. (2013). Soluble polysialylated NCAM: A novel player of the innate immune system in the lung. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 70(19), 3695–3708.
- Ulloa, P. E., Solis, C. J., De la Paz, J. F., Alaurant, T. G., Caruffo, M., Hernandez, A. J., & Feijoo, C. G. (2016). Lactoferrin Decreases the Intestinal Inflammation Triggered by a Soybean Meal-Based Diet in Zebrafish. *J. Immunol Res.* 1639720.
- Urban, C. F., Reichard, U., Brinkmann, V., & Zychlinsky, A. (2006). Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. *Cellular Microbiology*, 8(4), 668–676.
- van de Looij, Y., Ginot, V., Chatagner, A., Toulotte, A., Somme, E., Huppi, P. S., ... Sizonenko, S. V. (2014). Lactoferrin during lactation protects the immature hypoxic-ischemic rat brain. *Annals of Clinical and Translational Neurology*, 1(12), 955–967.
- Villanueva, E., Yalavarthi, S., Berthier, C. C., Hodgins, J. B., Khandpur, R., Lin, A. M., ... Kaplan, M. J. (2011). Netting neutrophils induce endothelial damage, infiltrate tissues, and expose immunostimulatory molecules in systemic lupus erythematosus. *Journal of Immunology*, 187(1), 538–552.
- Vogel, H. J. (2012). Lactoferrin, a bird's eye view. *Biochemistry and Cell Biology-Biochimie et Biologie Cellulaire*, 90(3), 233–244.
- Wang, B. (2016). Molecular determinants of milk lactoferrin as a bioactive compound in early neurodevelopment and cognition. *Journal of Pediatrics*, 173(Suppl), S29–36.
- Weinhold, B., Seidenfaden, R., Rockle, I., Mühlenhoff, M., Schertzinger, F., Conzelmann, S., ... Hildebrandt, H. (2005). Genetic ablation of polysialic acid causes severe neurodevelopmental defects rescued by deletion of the neural cell adhesion molecule. *Journal of Biological Chemistry*, 280(52), 42971–42977.
- Xu, J., Zhang, X., Pelayo, R., Monestier, M., Ammollo, C. T., Semeraro, F., ... Esmon, C. T. (2009). Extracellular histones are major mediators of death in sepsis. *Nature Medicine*, 15(11), 1318–1321.
- Yabe, U., Sato, C., Matsuda, T., & Kitajima, K. (2003). Polysialic acid in human milk. CD36 is a new member of mammalian polysialic acid-containing glycoprotein. *Journal of Biological Chemistry*, 278(16), 13875–13880.
- Zlatina, K., Lutteke, T., & Galuska, S. P. (2017). Individual impact of distinct polysialic acid chain lengths on the cytotoxicity of histone H1, H2A, H2B, H3 and H4. *Polymers*, 9(12), 720.
- Zlatina, K., Saftenberger, M., Kühnle, A., Galuska, C. E., Gartner, U., Rebl, A., ... Galuska, S. P. (2018). Polysialic acid in human plasma can compensate the cytotoxicity of histones. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(6).

3 Zusammenfassung der Arbeit

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades *Dr. med.*

Identifizierung und Bedeutung von Lactoferrin als neuer Interaktionspartner von Polysialinsäuren

eingereicht von: Rhea Veelken

geb. am 28.08.1991 in Erlangen

angefertigt: Medizinische Klinik für Gastroenterologie und Hepatologie
Universitätsklinikum Leipzig

Leibniz Institute für Farm Animal Biology (FBN) *
Institute of Reproductive Biology, Dummerstorf

Biochemisches Institut *
Justus-Liebig-Universität Gießen

betreut von: Prof. Dr. med. Thomas Berg
PD Dr. biol. hom. Sebastian Peter Galuska *

eingereicht: August 2019

NETs (neutrophile extracellular traps) bestehen primär aus der DNA neutrophiler Granulozyten und umschließen als extrazelluläre Fasern in Kombination mit antimikrobiellen Proteinen pathogene Mikroorganismen. Die Bildung von NETs muss jedoch einer strengen Regulierung unterliegen, da eine übermäßige Formierung dieser Chromatin-Netze zahlreiche pathophysiologische Auswirkungen haben kann. Interessanterweise kommt PolySia im Blut, Ejakulat und der Muttermilch vor. Flüssigkeiten, in denen solch regulative Mechanismen greifen müssen. Zunächst sollten potentielle Interaktionspartner von PolySia identifiziert werden, welche immunregulatorische Eigenschaften besitzen. Hierfür wurde PolySia mittels einer enzymatisch inaktiven Endoneuraminidase (iEndoN), die an Magnetpartikel gekoppelt wurde, aus Muttermilch isoliert. Dies ist möglich, da EndoN neben dem aktiven Zentrum, das die Spaltung von PolySia vermittelt, eine Bindungsdomäne für Sialinsäurepolymere besitzt. Die Präzipitation wurde per Western Blot gegen PolySia kontrolliert und zeigt eine für polysialylierte Proteine typische diffuse Bande, die über einen großen kDa-Bereich geht. Dieser ist nicht länger vorhanden, wenn zuvor PolySia mittels aktiver EndoN degradiert wurde.

Um in der Folge mit PolySia interagierende Proteine zu detektieren, wurde die Analyse der Proben in einem glykoproteomischen Ansatz fortgesetzt. Nach tryptischen In-Gel-Verdau, anschließender Trennung der resultierenden Peptide sowie massenspektrometrischer Analyse der Peptidfingerabdrücke mit einem MALDI-TOF-MS und anschließender Datenbanksuche wurde Lactoferrin im Präzipitat nachgewiesen. Die Identifizierung konnte mit Western Blots gegen Lactoferrin bestätigt werden. Da der Einsatz von EndoN bei Lactoferrin keinen Einfluss auf die Größe bzw. das Wandern im SDS-Gel hatte, kann man davon ausgehen, dass Lactoferrin kein PolySia-Träger, sondern ein Interaktionspartner von PolySia ist.

Die Interaktion zwischen Polysia und Lactoferrin wurde auch in Serum und Ejakulatsflüssigkeit überprüft. Es zeigte sich, dass Lactoferrin bei der Aufarbeitung von Proben durch Affinitätspräzipitation in Hinblick auf das Molekül PolySia aus den genannten Körperflüssigkeiten mitisoliert wurde.

In weiteren Versuchsansätzen wurde die Interaktion zwischen PolySia und Lactoferrin nochmals näher charakterisiert. Hierfür wurde ein natives Agarosegelsystem verwendet. Die Ergebnisse ergaben, dass Lactoferrin in Abhängigkeit der Kettenlänge von PolySia die Migrationscharakteristika von Lactoferrin beeinflusst und es somit zur Interaktion kommt.

HPLC Analysen zur Erfassung der Kettenlängen von PolySia in der menschlichen Muttermilch und Serum bestätigte das Vorhandensein der notwendigen Kettenlängen für die gefundene Verbindung. Hierfür wurden die PolySia-Ketten mit einem fluoreszierenden Reagenz gekoppelt und anschließend in Abhängigkeit zum Polymerisationsgrad mittels Anionenaustauscher-Chromatographie getrennt.

Um die strukturelle Beschreibung des PolySia-Lactoferrin-Komplexes weiter zu eruieren, wurde nach der potentiellen Bindungsstelle von PolySia am Lactoferrin Protein gesucht. Da Lactoferrin mit Lactoferricin eine basische Domäne hat, wurde eine Interaktion von Lactoferricin und PolySia ebenfalls mit nativen Agarosegelen untersucht. Die Analysen zeigten, dass PolySia auch die Migration von Lactoferricin beeinflusst. Zudem wurde die Interaktion zwischen Lactoferrin und einem Antikörper gegen Lactoferricin durch PolySia in einem kompetitiven ELISA inhibiert. Die Ergebnisse erlauben die Vermutung, dass PolySia das Protein Lactoferrin im Bereich der basischen Lactoferricin-Domäne binden könnte. Eine Anschlussstudie, bei der dreidimensionale Interaktionssimulationen durchgeführt wurden, bestätigte nochmals diese Ergebnisse (Kühnle, et al. 2019a).

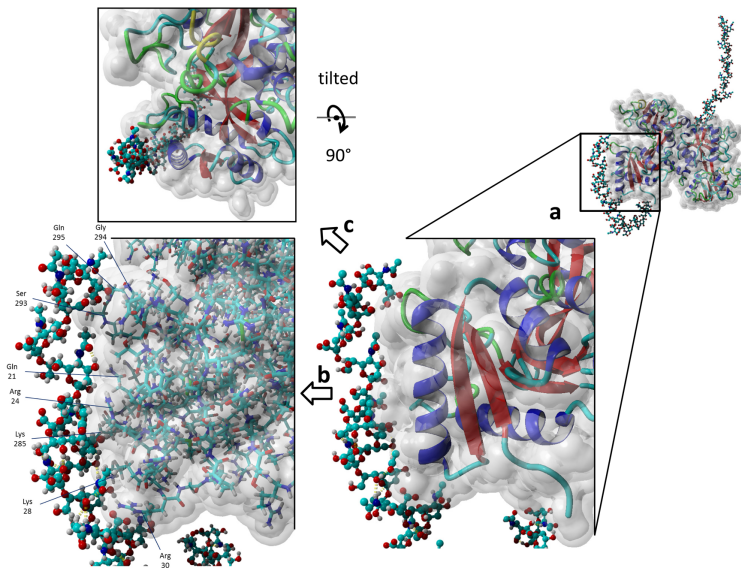


Abbildung 4. Darstellung der Interaktionsdomäne von Lactoferrin. PolySia interagiert bei *MolecularDynamic*-Simulationen mit der Lactoferricin beinhaltenden Domäne von Lactoferrin (Abbildung aus (Kühnle, et al. 2019a), CC-BY).

Interessanterweise zeigen Ergebnisse von Okuba *et al.*, dass Lactoferrin die Freisetzung von NETs inhibiert, indem es eine Art „Hülle“ um aktivierte Neutrophile bildet (Okubo, et al. 2016). Aufbauend auf diesen und unseren Ergebnissen sollte die Hypothese untersucht werden, ob Lactoferrin als prominenter Bindungspartner von PolySia die Bildung von NETs beeinflusst.

Als funktioneller Ansatz wurde ein Zell-experimenteller Versuchsaufbau gewählt, bei dem Neutrophile zur Bildung von NETs stimuliert wurden. Ohne Lactoferrin und PolySia kam es zur Bildung von NET-Fasern. PolySia alleine hatte auf die Freisetzung von NETs keinen Effekt und auch die von uns gewählten Konzentrationen an Lactoferrin zeigten keinen statisch signifikanten Einfluss. Wendete man jedoch Lactoferrin zusammen mit PolySia an, wurde festgestellt, dass eine solche Interaktion die Freisetzung von NETs hemmt und somit PolySia die Effizienz von Lactoferrin erhöht. Lineare PolySia-Ketten bewirken vermutlich eine Vernetzung der Lactoferrin-Kapsel auf der Zelloberfläche der neutrophilen Granulozyten, wodurch eine Stabilisierung dieser Kapsel erreicht wird. Der letzte Schritt der NETose, also das explosionsartige Freisetzen der intrazellulär entstandenen Konglomerate, ist gehemmt.

Es konnte somit zum ersten Mal gezeigt werden, dass eine Interaktion des Kohlenhydrat PolySia mit Lactoferrin als neu beschriebenen Bindungspartner die Kapazität von Lactoferrin erhöht, um die Freisetzung von NET-Fasern zu inhibieren.

Da PolySia und Lactoferrin offensichtlich in mehreren Körperflüssigkeiten miteinander interagieren, könnte der beschriebene Effekt ein natürliches Modulationssystem der NETose darstellen. Über diese Befunde könnten sich neue Strategien zur Behandlung

von NETs-getriggerten Krankheiten wie Thrombose, Sepsis und Unfruchtbarkeit entwickeln.

Weiterhin könnten diese PolySia abhängigen Mechanismen bei Entzündungsreaktionen im Rahmen von Leberzirrhosen eine Rolle spielen. Die Leberzirrhose, insbesondere im Stadium der akuten Dekompensation und des akut auf chronischen Leberversagens, weist eine lokale (Gewebe) und systemische Inflammationsreaktion auf. Die aktuelle Forschung fokussiert sich darauf pro- und antiinflammatorische Prozesse zu entschlüsseln, um dadurch neue therapeutische Angriffspunkte zu erkennen. Dieser Aspekt wird gerade im Rahmen eines klinischen Folgeprojektes der hier vorgestellten Arbeit an der Universität Leipzig (Klinik für Gastroenterologie und Hepatologie, Klinikdirektor (komm.): Prof. Dr. med. Th. Berg) untersucht.

4 Literaturverzeichnis

- Alexander, D. B., M. Iigo, K. Yamauchi, M. Suzui, and H. Tsuda
2012 Lactoferrin: an alternative view of its role in human biological fluids. *Biochem Cell Biol* 90(3):279-306.
- Angata, K., M. Suzuki, J. McAuliffe, Y. Ding, O. Hindsgaul, and M. Fukuda
2000 Differential biosynthesis of polysialic acid on neural cell adhesion molecule (NCAM) and oligosaccharide acceptors by three distinct alpha 2,8-sialyltransferases, ST8Sia IV (PST), ST8Sia II (STX), and ST8Sia III. *J Biol Chem* 275(24):18594-601.
- Angata, T., and A. Varki
2002 Chemical diversity in the sialic acids and related alpha-keto acids: an evolutionary perspective. *Chem Rev* 102(2):439-69.
- Bartova, E., J. Krejci, A. Harnicarova, G. Galiova, and S. Kozubek
2008 Histone modifications and nuclear architecture: a review. *J Histochem Cytochem* 56(8):711-21.
- Baxevanis, Andreas D., and B. F. Francis Ouellette
2005 *Bioinformatics : a practical guide to the analysis of genes and proteins*. Hoboken, N.J.: Wiley.
- Bellamy, W., M. Takase, K. Yamauchi, H. Wakabayashi, K. Kawase, and M. Tomita
1992 Identification of the bactericidal domain of lactoferrin. *Biochim Biophys Acta* 1121(1-2):130-6.
- Bornhöfft, Kim F., and Sebastian P. Galuska
2019 Glycans as Modulators for the Formation and Functional Properties of Neutrophil Extracellular Traps: Used by the Forces of Good and Evil. *Frontiers in Immunology* 10(959).
- Brinkmann, V., U. Reichard, C. Goosmann, B. Fauler, Y. Uhlemann, D. S. Weiss, Y. Weinrauch, and A. Zychlinsky
2004 Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303(5663):1532-5.
- Camicia, G., R. Pozner, and G. de Larranaga
2014 Neutrophil extracellular traps in sepsis. *Shock* 42(4):286-94.
- Colley, K. J., K. Kitajima, and C. Sato
2014 Polysialic acid: biosynthesis, novel functions and applications. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 49(6):498-532.
- Corfield, A.
2017 Eukaryotic protein glycosylation: a primer for histochemists and cell biologists. *Histochem Cell Biol* 147(2):119-147.
- Curreli, S., Z. Arany, R. Gerardy-Schahn, D. Mann, and N. M. Stamatos
2007 Polysialylated neuropilin-2 is expressed on the surface of human dendritic cells and modulates dendritic cell-T lymphocyte interactions. *J Biol Chem* 282(42):30346-56.
- Ermert, D., C. F. Urban, B. Laube, C. Goosmann, A. Zychlinsky, and V. Brinkmann
2009 Mouse neutrophil extracellular traps in microbial infections. *J Innate Immun* 1(3):181-93.
- Finne, J.
1982 Occurrence of unique polysialosyl carbohydrate units in glycoproteins of developing brain. *J Biol Chem* 257(20):11966-70.
- Fuchs, T. A., U. Abed, C. Goosmann, R. Hurwitz, I. Schulze, V. Wahn, Y. Weinrauch, V. Brinkmann, and A. Zychlinsky
2007 Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol* 176(2):231-41.
- Fujimoto, I., J. L. Bruses, and U. Rutishauser
2001 Regulation of cell adhesion by polysialic acid. Effects on cadherin, immunoglobulin cell adhesion molecule, and integrin function and

- independence from neural cell adhesion molecule binding or signaling activity. *J Biol Chem* 276(34):31745-51.
- Galuska, C. E., J. A. Dambon, A. Kuhnle, K. F. Bornhofft, G. Prem, K. Zlatina, T. Lutteke, and S. P. Galuska
2017a Artificial Polysialic Acid Chains as Sialidase-Resistant Molecular-Anchors to Accumulate Particles on Neutrophil Extracellular Traps. *Front Immunol* 8:1229.
- Galuska, C. E., T. Lutteke, and S. P. Galuska
2017b Is Polysialylated NCAM Not Only a Regulator during Brain Development But also during the Formation of Other Organs? *Biology (Basel)* 6(2).
- Galuska, C. E., K. Maass, and S. P. Galuska
2015 Mass Spectrometric Analysis of Oligo- and Polysialic Acids. *Methods Mol Biol* 1321:417-26.
- Galuska, S. P., C. E. Galuska, T. Tharmalingam, K. Zlatina, G. Prem, F. C. Husejnov, P. M. Rudd, W. F. Vann, C. Reid, J. Vionnet, M. E. Gallagher, F. A. Carrington, S. L. Hassett, and S. D. Carrington
2017c In vitro Generation of Polysialylated Cervical Mucins by Bacterial Polysialyltransferases to Counteract Cytotoxicity of Extracellular Histones. *FEBS J*.
- Galuska, S. P., M. Rollenhagen, M. Kaup, K. Eggers, I. Oltmann-Norden, M. Schiff, M. Hartmann, B. Weinhold, H. Hildebrandt, R. Geyer, M. Muhlenhoff, and H. Geyer
2010 Synaptic cell adhesion molecule SynCAM 1 is a target for polysialylation in postnatal mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(22):10250-5.
- Gifford, J. L., H. N. Hunter, and H. J. Vogel
2005 Lactoferricin: a lactoferrin-derived peptide with antimicrobial, antiviral, antitumor and immunological properties. *Cell Mol Life Sci* 62(22):2588-98.
- Gluer, S., M. A. Wunder, C. Schelp, E. Radtke, and R. Gerardy-Schahn
1998 Polysialylated neural cell adhesion molecule serum levels in normal children. *Pediatr Res* 44(6):915-9.
- Harduin-Lepers, A., V. Vallejo-Ruiz, M. A. Krzewinski-Recchi, B. Samyn-Petit, S. Julien, and P. Delannoy
2001 The human sialyltransferase family. *Biochimie* 83(8):727-37.
- Hashiba, M., A. Huq, A. Tomino, A. Hirakawa, T. Hattori, H. Miyabe, M. Tsuda, and N. Takeyama
2015 Neutrophil extracellular traps in patients with sepsis. *J Surg Res* 194(1):248-54.
- Kean, E. L.
1991 Sialic acid activation. *Glycobiology* 1(5):441-7.
- Kiermaier, E., C. Mousson, C. T. Veldkamp, R. Gerardy-Schahn, I. de Vries, L. G. Williams, G. R. Chaffee, A. J. Phillips, F. Freiberger, R. Imre, D. Taleski, R. J. Payne, A. Braun, R. Forster, K. Mechtler, M. Muhlenhoff, B. F. Volkman, and M. Sixt
2016 Polysialylation controls dendritic cell trafficking by regulating chemokine recognition. *Science* 351(6269):186-90.
- Kimbrell, D. A., and B. Beutler
2001 The evolution and genetics of innate immunity. *Nat Rev Genet* 2(4):256-67.
- Kolaczowska, E., and P. Kubes
2013 Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol* 13(3):159-75.
- Kuhnle, A., T. Lutteke, K. F. Bornhofft, and S. P. Galuska
2019a Polysialic Acid Modulates the Binding of External Lactoferrin in Neutrophil Extracellular Traps. *Biology (Basel)* 8(2).
- Kuhnle, A., R. Veelken, C. E. Galuska, M. Saftenberger, M. Verleih, H. C. Schuppe, S. Rudloff, C. Kunz, and S. P. Galuska

- 2019b Polysialic acid interacts with lactoferrin and supports its activity to inhibit the release of neutrophil extracellular traps. *Carbohydr Polym* 208:32-41.
- Kuwata, H., T. T. Yip, M. Tomita, and T. W. Hutchens
1998 Direct evidence of the generation in human stomach of an antimicrobial peptide domain (lactoferricin) from ingested lactoferrin. *Biochim Biophys Acta* 1429(1):129-41.
- Ma, A. C., and P. Kubes
2008 Platelets, neutrophils, and neutrophil extracellular traps (NETs) in sepsis. *J Thromb Haemost* 6(3):415-20.
- Masson, P., J. F. Heremans, and J. Prignot
1965 Immunohistochemical localization of the iron-binding protein lactoferrin in human bronchial glands. *Experientia* 21(10):604-5.
- Masson, P. L., J. F. Heremans, and J. Ferin
1968 Presence of an Iron-binding protein (lactoferrin) in the genital tract of the human female. I. Its immunohistochemical localization in the endometrium. *Fertil Steril* 19(5):679-89.
- Mühlenhoff, M., M. Eckhardt, A. Bethe, M. Frosch, and R. Gerardy-Schahn
1996 Autocatalytic polysialylation of polysialyltransferase-1. *Embo J* 15(24):6943-50.
- Mühlenhoff, M., M. Eckhardt, and R. Gerardy-Schahn
1998 Polysialic acid: three-dimensional structure, biosynthesis and function. *Curr Opin Struct Biol* 8(5):558-64.
- Nakata, D., L. Zhang, and F. A. Troy, 2nd
2006 Molecular basis for polysialylation: a novel polybasic polysialyltransferase domain (PSTD) of 32 amino acids unique to the alpha2,8-polysialyltransferases is essential for polysialylation. *Glycoconj J* 23(5-6):423-36.
- Nathan, C.
2006 Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol* 6(3):173-82.
- Nicholson, L. B.
2016 The immune system. *Essays Biochem* 60(3):275-301.
- Okubo, K., M. Kamiya, Y. Urano, H. Nishi, J. M. Herter, T. Mayadas, D. Hirohama, K. Suzuki, H. Kawakami, M. Tanaka, M. Kurosawa, S. Kagaya, K. Hishikawa, M. Nangaku, T. Fujita, M. Hayashi, and J. Hirahashi
2016 Lactoferrin Suppresses Neutrophil Extracellular Traps Release in Inflammation. *EBioMedicine* 10:204-15.
- Park, J. H., G. T. Park, I. H. Cho, S. M. Sim, J. M. Yang, and D. Y. Lee
2011 An antimicrobial protein, lactoferrin exists in the sweat: proteomic analysis of sweat. *Exp Dermatol* 20(4):369-71.
- Rosa, L., A. Cutone, M. S. Lepanto, R. Paesano, and P. Valenti
2017 Lactoferrin: A Natural Glycoprotein Involved in Iron and Inflammatory Homeostasis. *Int J Mol Sci* 18(9).
- Rutishauser, U., A. Acheson, A. K. Hall, D. M. Mann, and J. Sunshine
1988 The neural cell adhesion molecule (NCAM) as a regulator of cell-cell interactions. *Science* 240(4848):53-7.
- Saffarzadeh, M., C. Juenemann, M. A. Queisser, G. Lochnit, G. Barreto, S. P. Galuska, J. Lohmeyer, and K. T. Preissner
2012 Neutrophil extracellular traps directly induce epithelial and endothelial cell death: a predominant role of histones. *PLoS One* 7(2):e32366.
- Saffarzadeh, M., and K. T. Preissner
2013 Fighting against the dark side of neutrophil extracellular traps in disease: manoeuvres for host protection. *Curr Opin Hematol* 20(1):3-9.
- Schauer, R.

- 2004 Sialic acids: fascinating sugars in higher animals and man. *Zoology (Jena)* 107(1):49-64.
- Simon, P., S. Bäumner, O. Busch, R. Röhrich, M. Kaese, P. Richterich, A. Wehrend, K. Müller, R. Gerardy-Schahn, M. Mühlenhoff, H. Geyer, R. Geyer, R. Middendorff, and S. P. Galuska
2013 Polysialic Acid Is Present in Mammalian Semen as a Post-translational Modification of the Neural Cell Adhesion Molecule NCAM and the Polysialyltransferase ST8Siall. *J Biol Chem* 288(26):18825-33.
- Spiro, R. G.
2002 Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology* 12(4):43R-56R.
- Szecsí, P. B., D. Dalgaard, G. Stakemann, G. Wagner, and B. Foltmann
1989 The concentration of pepsinogen C in human semen and the physiological activation of zymogen in the vagina. *Biol Reprod* 40(3):653-9.
- Telang, S.
2018 Lactoferrin: A Critical Player in Neonatal Host Defense. *Nutrients* 10(9).
- Valenti, P., and G. Antonini
2005 Lactoferrin: an important host defence against microbial and viral attack. *Cell Mol Life Sci* 62(22):2576-87.
- Varki, A., and N. Sharon
2009 Historical Background and Overview. *In* *Essentials of Glycobiology*. nd, A. Varki, R.D. Cummings, J.D. Esko, H.H. Freeze, P. Stanley, C.R. Bertozzi, G.W. Hart, and M.E. Etzler, eds. Cold Spring Harbor (NY).
- Werneburg, S., M. Mühlenhoff, M. Stangel, and H. Hildebrandt
2015 Polysialic acid on SynCAM 1 in NG2 cells and on neuropilin-2 in microglia is confined to intracellular pools that are rapidly depleted upon stimulation. *Glia*.
- Yabe, U., C. Sato, T. Matsuda, and K. Kitajima
2003 Polysialic acid in human milk. CD36 is a new member of mammalian polysialic acid-containing glycoprotein. *J Biol Chem* 278(16):13875-80.
- Zlatina, K., M. Saftenberger, A. Kuhnle, C. E. Galuska, U. Gartner, A. Rebl, M. Oster, A. Vernunft, and S. P. Galuska
2018 Polysialic Acid in Human Plasma Can Compensate the Cytotoxicity of Histones. *Int J Mol Sci* 19(6).

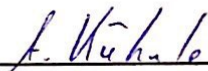
5 Darstellung des eigenen Beitrages

Die Antragstellerin war maßgeblich beteiligt an der Ausgestaltung der Hypothese sowie Ausarbeitung des Arbeitsprogrammes, Einbringen von eigenen Ergebnissen in die weitere Versuchsplanung, Auswertung der Befunde und Darstellung sowie Interpretation der Daten. Insbesondere folgende experimentelle Arbeiten wurden durchgeführt: Bestätigung von PolySia in humaner Muttermilch mittels Western Blot, Identifizierung von Lactoferrin als Interaktionspartner von PolySia mittels Proteomics Ansatz durch MALDI-TOF-MS, Bestätigung von Lactoferrin als Interaktionspartner von PolySia mittels Western Blot, Kettenlängenbestimmung von PolySia in humaner Muttermilch mittels HPLC Analyse, Detektierung von Lactoferrin als Interaktionspartner von PolySia in Milch-, Serum- sowie Ejakulatproben.

Leipzig, 15.07.2019
Ort, Datum


Unterschrift Rhea Veelken

Bayreuth, 12.07.2019
Ort, Datum


Unterschrift Andrea Kühnle

Dammesdorf, 8.7.19
Ort, Datum


Unterschrift Christina Galuska

Hamburg, 2.7.19
Ort, Datum


Unterschrift Max Saftenberger

Dammesdorf, 8.7.2019
Ort, Datum


Unterschrift Sebastian Galuska

6 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar eine Vergütung oder geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Die aktuellen gesetzlichen Vorgaben in Bezug auf die Zulassung der klinischen Studien, die Bestimmungen des Tierschutzgesetzes, die Bestimmungen des Gentechnikgesetzes und die allgemeinen Datenschutzbestimmungen wurden eingehalten. Ich versichere, dass ich die Regelungen der Satzung der Universität Leipzig zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis kenne und eingehalten habe.

Leipzig, 15.07.2019

Ort, Datum



Unterschrift Rhea Veelken

7 Publikationsverzeichnis

A. Kühnle, R. Veelken, C. E. Galuska, M. Saftenberger, M. Verleih, H. C. Schuppe, S. Rudloff, C. Kunz, and S. P. Galuska

Polysialic acid interacts with lactoferrin and supports its activity to inhibit the release of neutrophil extracellular traps. Carbohydr Polym 208:32-41, 2019.

8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei den Personen bedanken, die in besonderer Weise am Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Ich danke meinem Betreuer Prof. Dr. med. Thomas Berg für das Interesse an dem Forschungsschwerpunkt der Dr. Arbeit, die Möglichkeit neue Projektideen in seiner Forschungsgruppe umsetzen zu können, sowie für die Unterstützung neben dem Berufsleben als Ärztin in Weiterbildung Erfahrungen im Bereich der Wissenschaft sammeln zu können.

Besonders möchte ich meinem Ko-Betreuer PD Dr. hom. biol. Sebastian Peter Galuska in der Danksagung hervorheben, der anfangs mit seiner Nachwuchs-AG im Kellergeschoss des Biochemischen Institutes der Justus-Liebig-Universität Gießen wissenschaftliches Interesse förderte, kreative Versuchsideen unterstützte und effektiv anleitete. Viele Dank für das entgegengebrachte Vertrauen und die ungebrochene Loyalität als Mentor – noch heute.

Mit einem großen Lächeln und den besten Erinnerungen denke ich an die arbeitsintensive Zeit im Labor in Gießen zurück. Ich danke Dr. rer. nat. Christina Galuska, Werner Mink und Siegfried Kühnhardt für die Lust am Basteln, Reparieren und Korrigieren, ohne sie wären sicherlich mehr Versuche frustriert verlaufen. Danke den weiteren Doktoranden für die gegenseitige Unterstützung, aufmunternden Gesten und unzähligen gemeinsamen Stunden der Versuchsplanung und –durchführung. Nur so konnte jeder sein Promotionsvorhaben motiviert voranbringen. Insbesondere möchte ich ein großes Dankeschön an Andrea Kühnle aussprechen für die Arbeitskooperation bei diesem spannenden Projekt.

Kaya Veelken danke ich für immer weise und wohltuende Worte als große Schwester, du bist mein Vorbild. Ein besonders großer Dank geht außerdem an meine Eltern für ihre bedingungslose Unterstützung, niemals fehlende Fürsorge und immer fortwährendes Interesse. Ohne ihre Förderung wäre mir so manche Möglichkeit verwehrt geblieben. Auch möchte ich Maximilian Brunotte danken für den ewigen Zusammenhalt beim Thema Dr. Arbeit. Trotz einiger Höhen und Tiefen bescherten uns unsere Promotionsprojekte eine besondere Zeit.